

# Revista de Microbiologia



**SBM**

São Paulo — Brasil

Sociedade  
Brasileira de  
Microbiologia

Volume 13 Número 1 Jan.-Mar. 1982

## **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.

REVISTA DE MICROBIOLOGIA  
Dep. de Microbiologia - ICB II - USP  
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 - Cid. Universitária  
CEP 05508-900 - São Paulo - SP - BRASIL  
Site: [www.revmicro.igb.usp.br](http://www.revmicro.igb.usp.br)

# Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia

Volume 13 Janeiro-Março 1982 Número 1

Rev. Microbiol. (S. Paulo), 13 (1)

## CONTEÚDO

Sinval M. de Melo  
Margarida D. M. Camargos  
& José Noronha Peres

Margarida D. M. Camargos  
José Noronha Peres  
& Sinval M. de Melo

Sânia Maria Tauk  
& Valdemir Gambale

Roberto M. Yanaguita  
Carlos Almeida Santa Rosa  
Raimundo Rolim Rosa  
& José Giometti

Sonia Presa Salzberg  
Pilar Rodriguez Massaguer  
& Antonio de Melo Serrano

Sirdeia M. P. Furlanetto  
Claudete R. Paula  
Walderez Gambale  
& Dirceu do Nascimento

Sérgio O. P. da Costa  
Maria Christina Bonato  
& Marisa Bianco

Sérgio O. P. da Costa  
Maria Christina M. Bonato  
& Marisa Bianco

Regina Maria S. T. Decarlis  
Deise P. Felcão  
Helga V. L. Maffei  
& Celso Pavan

1 Marcadores de virulência de *Pseudomonas aeruginosa*.  
I. Provas "in vitro": tipos piocinicos e atividade hemolítica

6 Marcadores de virulência de *Pseudomonas aeruginosa*.  
II - Provas "in vitro": atividade hemolítica e sensibilidade ao cloreto de benzalcônio (CB)

12 Efeitos da agitação, pH, tempo e nutrientes na produção de biomassa de *Candida guilliermondii* em meio de vinhaça e melado

22 Prevalência de aglutininas anti-leptospiras em equinos mantidos para produção de soros terapêuticos

26 Estudo epidemiológico e microbiológico de um surto de intoxicação alimentar

31 Ocorrência de bolores e leveduras em sucos de laranja ao natural

35 Instabilidade do caráter protease (gelatinase) em *Proteus mirabilis*. I - Estudo de estirpes recém isoladas

46 Instabilidade do caráter protease (gelatinase) em *Proteus mirabilis*. II - Comportamento de células excretoras e não excretoras de protease na presença de gelatina

50 *Yersinia enterocolitica* isolada de criança com diarréia crônica, em Botucatu SP

## CONTENTS

Markers of virulence of *Pseudomonas aeruginosa*.  
I - Tests "in vitro": hemolysin production related to pyocin type

Markers of virulence of *Pseudomonas aeruginosa*.  
II - Tests "in vitro" hemolysin titers compared with sensitivity to benzalkonium chloride

Effect of agitation, pH, time and nutrients on biomass production of *Candida guilliermondii* in vinasse and molasses media

The prevalence of leptospiral agglutinins in horses used for therapeutic sera production

Epidemiological and microbiological studies of an outbreak of food-borne intoxication

Ocurrence of molds and yeasts in natural orange juices

Instability of the protease (gelatinase) trait in *Proteus mirabilis*. I - A study of newly isolated strains

Instability of the protease (gelatinase) trait in *Proteus mirabilis*. II - Behavior of protease-excreting and non-excreting cells in the presence of gelatin

*Yersinia enterocolitica* isolated from a child with chronic diarrhoea, in Botucatu SP Brazil

Flávio Zelante Cláudio M. de Campos Maria Regina Lorenzetti & Paulo S. Cunha	53	Análise comparativa da eficiência entre dois meios de cultura para o isolamento e quantificação de espécies do gênero <i>Neisseria</i> , isoladas da língua e da saliva	<i>Comparative efficiency of trypicase soy agar Vancomycin and Levine's media for the isolation and identification of <i>Neisseria</i> on tongue and saliva</i>
Jan Dirk van Elsas Mônica Teresa P. R. Rodrigues Pereira & Elisa G. C. Penido	57	Espectro de especificidade de hospedeiros de dois grupos de fagos de <i>Bacillus</i> do solo	<i>Host range specificity of two groups of soil-isolated <i>Bacillus</i> phages</i>
Jussara P. do Nascimento José Roberto S. Chaves & Marguerite S. Pereira	65	Hemólise radial simples: teste sensitiivo para detecção de anti-corpo para vírus Influenza B	<i>Single radial haemolysis: a sensitive test for the detection of antibody to Influenza B virus</i>
Sonia Presa Salzberg & Adly Ibrahim	70	Purificação parcial do vírus da Encefalite Eqüina do Oeste (WEE) utilizando o procedimento de fracionamento	<i>Partial purification of western equine encephalitis virus by fractionation procedures</i>
Maria Ligia C. Rosa & Flávio Alterthum	77	Ação da nistatina sobre <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em diferentes estados fisiológicos	<i>The effects of nystatin on <i>Saccharomyces cerevisiae</i> in different physiological conditions</i>
Armando A. H. Vieira	83	Excreção de matéria orgânica dissolvida (MOD) na coluna fótica, por populações fitoplancônticas marinhas da região de Ubatuba	<i>Excretion of dissolved organic matter (DOM) in the photic column by marine phytoplanktonic population from Ubatuba region</i>
Informação Técnico-Científica	95		

## Transformações

A Revista de Microbiologia teve que passar por modificações, de seu formato, para ajustar-se à crescente elevação de custos de produção e ao aumento do número de artigos, submetidos para publicação.

O novo formato permitirá economia da ordem de 10-15%, na produção gráfica, embora nada signifique no momento, quanto à composição, isto é a produção de "matrizes" ou "artes", como se usa dizer na linguagem gráfica.

É preciso reconhecer a ajuda financeira concedida pelo CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e FINEP - Financiadora de Estudos e Projetos, através de seu programa conjunto, de apoio a revistas científicas e a auxílios indiretos, concedidos pela CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior, nos últimos anos.

A Revista de Microbiologia já passou por difíceis tempos, quando a grande luta era estimular o aperfeiçoamento da matéria publicada, em forma e conteúdo. Hoje, o caminho é mais fácil, mas muito ainda deverá acontecer.

Através de estímulo editorial, foi possível reduzir o volume de palavras, sem comprometimento do conteúdo e da pertinência, passando-se de 6-8 artigos para 13-15, por número. A meta desejada é 20-25 por fascículo.

A Revista de Microbiologia é indexada por inúmeros veículos especializados. Consequentemente, quanto mais qualidade, pertinência, pontualidade e rapidez puderem ser imprimidas, tanto maior será a receptividade e circulação, nacional e internacional das informações.

Lamentavelmente, as boas transformações, às vezes, são acompanhadas de mudanças não necessariamente aceitas, com facilidade, por todos. Nestas últimas, encontra-se a atual modificação no formato e composição da Revista de Microbiologia, cujo objetivo é de aumentar a capacidade de publicação de artigos, com os recursos que puderem ser obtidos.

# Marcadores de virulência de *Pseudomonas aeruginosa*. I — Provas “in vitro”: tipos piocínicos e atividade hemolítica\*

Sinval Martins de Melo

Dept.<sup>o</sup> de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas UFMG, Caixa Postal 2486  
30000 Belo Horizonte MG, Brasil

Margarida Diniz Melo Camargos

Dept.<sup>o</sup> de Ciências Biológicas UCMG, Caixa Postal 2686  
30000 Belo Horizonte MG, Brasil

& José Noronha Peres

Dept.<sup>o</sup> de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas UFMG

## Resumo

A virulência de 145 amostras de *Pseudomonas aeruginosa*, isoladas de quatro serviços do Hospital das Clínicas da UFMG, previamente tipificadas pela produção de piocina, foi investigada quanto à capacidade para produzir “hemolisina”. Do Berçário, foram estudadas 57 amostras e 46 destas (80,7%), pertencentes a um mesmo tipo piocínico, apresentaram título hemolítico baixo, isto é, igual ou menor que 1:8, enquanto as outras, pertencentes a tipos diferentes, tiveram títulos que variaram de 1:32—1:256. Do Centro de Tratamento Intensivo (CTI), foram estudadas 28 amostras. Duas destas apresentaram título hemolítico intermediário (1:16) e os restantes (92,8%), cuja maioria pertence a um grupo não tipável pela produção de piocina, mostraram títulos altos. Da Clínica Cirúrgica, 17 amostras pertencentes a cinco tipos diferentes mostraram títulos variáveis. Da Clínica Urológica, 43 amostras, com predominância de não tipáveis, variaram quanto à capacidade de produzir “hemolisina”.

## Summary

*Markers of virulence of Pseudomonas aeruginosa. I — Tests “in vitro”: hemolysin production related to pyocin type*

The virulence of 145 strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from four wards of the Hospital das Clínicas da UFMG, previously typed according to their production of pyocin, was investigated in reference to their capacity to produce “hemolysin”. From the Nursery, of 57 strains of a single pyocin type that were examined, 46 of them (80.7%) showed hemolysin titers of 1:8 or less, while the other 11 strains, of various pyocin types, showed titers between 1:32 and 1:256. Of 28 strains isolated from the Intensive Care Unit, only 2 of them showed hemolysin titers as low as 1:16, the remainder (92.8%) showing titers of 1:32 upward (these were not related to pyocin production “typing groups”). In the cases of 17 strains from the Surgical Unit (5 pyocin production “types”) and 43 strains from the Urological Unit (mostly not “pyocin typed”), there were wide variations in hemolysin titers that could not be correlated significantly with pyocin types.

\* Trabalho realizado no Dept.<sup>o</sup> de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas UFMG, com auxílio da CAPES e FINEP.

## Introdução

Liu (7) obteve "hemolisina" de diversas espécies de *Pseudomonas*, com o emprego da técnica introduzida por Birch-Hirschfeld (5). Liu verificou que a atividade hemolítica não permite a distinção entre espécies de *Pseudomonas*, mas muitas das patogênicas para animais, como *Ps. aeruginosa*, apresentaram atividade hemolítica alta, enquanto para as não patogênicas essa atividade era nula ou baixa. Mais tarde, Liu, Abe & Bates (8), usando duas amostras de *Ps. aeruginosa*, com morfologia colonial e tipos sorológicos diferentes, isolaram seis frações com características próprias. A fração II, insolúvel em clorofórmio, não dialisável, termoestável em pH 3.0, apresentava atividade hemolítica e toxicidade para células HeLa e animais. Berk (3), estudando a "hemolisina" de *Ps. aeruginosa*, assinala que a atividade ótima se dá em pH 6.0 e que o composto pode ser purificado por precipitação com sulfato de amônia (50% de saturação) e através de coluna de Sephadex G-25. Mediante uma série de fracionamentos em coluna, Berk (4) obteve fração, com atividade hemolítica, sem propriedade dermonecrosante para animais, porém ainda tóxica para camundongos. Ramos (10), considerando incompletas as pesquisas sobre purificação e reconhecimento da natureza química da "hemolisina" de *Ps. aeruginosa* e sua importância como fator de patogenicidade, realizou investigações que lhe permitiram obter uma fração purificada contendo ramnose e ácidos graxos — palmitíco n beta hidroxidecanóico e beta hidrodecanóico. Al-Dujaili & Harris (1) realizaram pesquisas no sentido de encontrar marcador ou marcadores de virulência "in vitro", que permitissem separar as amostras de *Ps. aeruginosa* em "ambientais" e "infectantes". Os autores, com base em suas investigações, sugerem que a produção de hemolisina possa ser adequado marcador de virulência. Al-Dujaili (2) verificou que a "hemolisina", entre outras substâncias elaboradas por *Ps. aeruginosa*, exibia maior atividade para macrófagos alveolares do que as isoladas do meio ambiente e questiona se a habilidade de *Ps. aeruginosa* para iniciar infecção do trato respiratório não poderia estar relacionada ao grau de produção de "hemolisina".

Sendo a atividade hemolítica um provável fator de virulência para *Ps. aeruginosa*, julgou-se importante determinar os títulos hemolíticos das amostras isoladas de serviços hospitalares por Melo & Peres (9) e compará-los com os tipos piocínicos das mesmas.

## Material e Métodos

**Produção de hemolisina** — A "hemolisina", fração II de Liu (citolisina), foi produzida e extraída segundo técnica de Liu, Abe & Bates (8), modificada, que consistiu no seguinte: utilizou-se como meio de produção o agar extrato de carne com glicose e triptona (AEGT), enriquecido com 1% de glicose, preparado no nosso laboratório e o AEGT (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) também adicionado de 1% de glicose (p/v). Volume de 0,1ml de cultura pura de 24h em meio 81 (6) era espalhado, com zaragatoa estéril, sobre celofane colocado na superfície do meio de produção. A placa era incubada por 48h a 37°C. A massa de células era colhida com 3,0ml de água destilada estéril e centrifugada a 5000Rpm durante 1h a 5°C. O sobrenadante era colhido, ajustado a pH 3.0 com HCl 0,1N e aquecido por 15min, em banho-maria. Em seguida, ajustava-se o pH para 7.0. Esse extracto bruto, desprovido de qualquer atividade enzimática, foi utilizado no presente trabalho, sob a denominação de "hemolisina".

**Determinação da atividade hemolítica** — Inicialmente, testou-se o efeito em hemácias humanas, de coelho, cobaio e pombo, utilizando-se suspensão de 1%, em solução salina isotônica. Como não se observou variação da atividade citolítica, frente a hemácias de diferentes espécies e pela facilidade de obtenção, trabalhamos com hemácias de cobaio, na concentração de 1% e densidade ótica, em torno de 300 unidades Klett-Summerson (filtro verde).

Diluições sucessivas de 1:2 a 1:256 em tampão fosfato, de pH 5.9 a 6.2, no volume de 0,5ml, eram feitas com a "hemolisina", em tubos de sorologia (3). A cada diluição acrescentava-se 0,5ml de suspensão padronizada de hemácias, deixava-se à temperatura ambiente, procedendo-se à leitura após 2 horas, por não ocorrer modificação além desse tempo.

Consideram-se positivas as diluições que apresentaram 100% de hemólise. A quantificação de "hemolisina" foi dada pela maior diluição mostrando hemólise total, variando de 1:4 a 1:512.

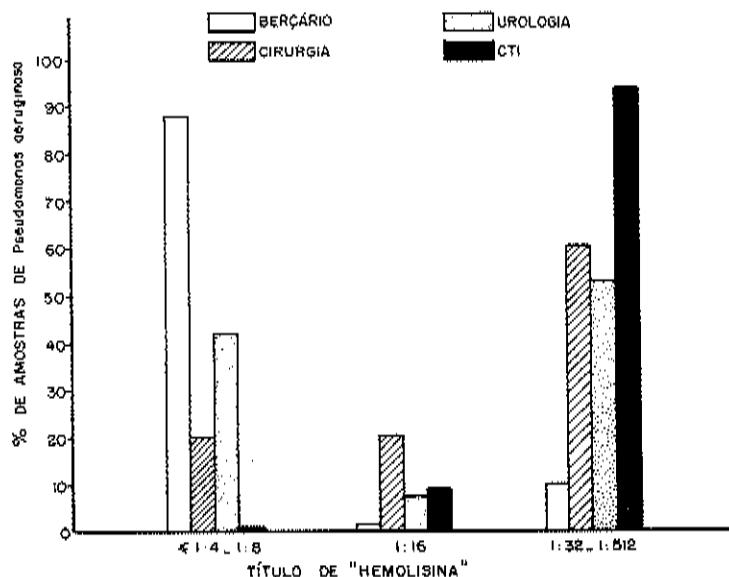
## Resultados

Os resultados da quantificação da atividade hemolítica, das amostras de *Ps. aeruginosa*, encontram-se na Figura 1: as amostras de *Ps. aeruginosa*, oriundas do Berçário, apresentam menor atividade hemolítica do que aos dos demais serviços.

Os títulos de atividade hemolítica foram correlacionados com os tipos piocínicos, previamente determinados por Melo & Peres (9), pois, sendo estes marcadores epidemiológicos, seria interessante conhecer sua correlação com um provável marcador de virulência, o que é mostrado na Tabela 1. Verifica-se que as amostras de *Ps. aeruginosa*, pertencentes ao tipo piocínico 373112, predominante no "ambiente" (ar, pia, água de incubadora, mamadeira, e solução de "Milton") e de origem "humana" (orofaringe e fezes de recém-nascidos, orofaringe de enfermeira), apresentaram fraca atividade hemolítica, ou seja, um título inferior ou igual a 1:8. No entanto, ocorreu grande variação do título hemolítico, entre os tipos piocínicos não predominantes.

As amostras ambientais de *Ps. aeruginosa*, isoladas do CTI (ralos, pias de enfermaria e das instalações sanitárias) apresentaram heterogeneidade de tipos, enquanto que as de origem "humana" (escarro de pacientes, mãos e orofaringe de enfermeiros) constituem um grupo de amostras não tipáveis. Entre as 28 amostras analisadas, apenas duas apresentaram título hemolítico de 1:16, enquanto para as demais o título foi igual ou superior a 1:32.

Figura 1 — Título de "hemolisina" de amostras de *Pseudomonas aeruginosa*



Da Clínica Cirúrgica, foram analisadas 17 amostras de *Ps. aeruginosa*, sendo uma de origem "ambiental", isolada de pia e outras de origem "humana" (ferida cirúrgica, mãos e orofarínge de enfermeiras e urinas de pacientes). Dez amostras pertenceram ao tipo piocínico 611231 e seis entre estas tiveram título hemolítico igual ou maior que 1:32.

Da Clínica Urológica, foram estudadas 43 amostras de *Ps. aeruginosa*, sendo 24 de origem "ambiental", isoladas de pias e 19 de origem humana (mãos e orofaringe de enfermeiros e urina de pacientes). Os resultados dos títulos hemolíticos, apresentados na Tabela 1, mostram que o grupo das não tipáveis divide-se em dois, quanto ao título hemolítico.

## Discussão

O desenvolvimento de provas "in vitro", de execução relativamente simples e que possam ser utilizadas como marcadores de virulência de *Ps. aeruginosa*, tem sido objeto de investigações por vários autores. Porém, as amostras estudadas têm sido em número reduzido. Os resultados do presente trabalho trazem subsídios ao assunto, considerando-se o número significativo de 145 amostras, oriundas de diferentes serviços hospitalares.

*Ps. aeruginosa* foi encontrada amplamente difundida no Berçário, cuja distribuição deve estar ligada a imperfeições na desinfecção das mamadeiras (9). Pelo menos em 50% dos recém-nascidos houve colonização pela bactéria sem, contudo, apresentar qualquer problema relacionado a infecções hospitalares. Das 57 amostras estudadas neste serviço, 47 (82,4%) pertencem ao tipo piocínico 373112, ali predominante. Essas apresentaram atividade hemolítica baixa, enquanto as outras, pertencentes a tipos piocínicos diferentes e ocasionalmente em espécimes "ambientais", variaram quanto à capacidade em produzir "hemolisina" (Tabela 1).

Os títulos elevados de "hemolisina", encontrados para amostras de outros serviços, são sugestivos, embora não existissem informações seguras com relação à participação da maioria delas em infecção.

A alta atividade hemolítica, apresentada pelas amostras do CTI, sugere a existência de certa estabilidade genética para os tipos de *Ps. aeruginosa*, no que diz respeito à produção de piocina. Esses dados reforçam a idéia de se admitir um grupo não tipável de amostras virulentas, dadas as condições oferecidas pela natureza do serviço. No CTI,

Tabela 1 — Tipo piocínico e título de "hemolisina" de 145 amostras de *Ps. aeruginosa*, isoladas de quatro serviços do Hospital das Clínicas da UFMG

Serviço	Tipo piocínico	Título de "hemolisina"		
		≤ 1:8	1:16	1:32 – 1:512
Berçário	373112 (47)*	46	1	—
	611111 (5)	3	—	2
	diversos (5)	2	—	3
CTI <sup>b</sup>	diversos (7)	—	1	6
	NT <sup>c</sup> (21)	—	1	20
Clínica Cirúrgica	621231 (10)	2	2	6
	diversos (?)	3	1	3
Clínica Urológica	421414 (12)	7	2	3
	diversos (8)	3	—	5
	NT (23)	8	1	14

a. O número entre parênteses indica o número de amostras; b. Centro de Tratamento Intensivo; c. não tipável pela produção de piocina.

vários fatores são responsáveis pela implantação de *Pseudomonas*, como presença de indivíduos debilitados ou traumatizados, predispostos à infecção, e outros como: variedade da procedência dos doentes, super-manuseio e uso de instrumental, aos quais os pacientes são submetidos.

Na Clínica Cirúrgica, nove das 17 amostras estudadas forneceram títulos hemolíticos altos e variados (Tabela 1). Mas, sabe-se que mesmo bactérias de baixo poder de virulência podem desenvolver infecções na ferida cirúrgica.

Na Clínica Urológica, 22 (51,1%) das 43 amostras estudadas apresentaram atividade de hemólítica igual ou superior a 1:32 (Tabela 1). Entre as 23 amostras não tipificáveis pela produção de piocina, 14 (60,8%) tiveram títulos hemolíticos iguais ou acima de 1:32, e 8 (34,2%) forneceram títulos baixos. Portanto, pela capacidade de produzir "hemolisina", essas amostras não tipadas são subdivididas em dois subgrupos, ou seja, um de amostras com títulos baixos, e outro altos. Nessa Clínica, a presença de sondas de demora, em pacientes operados, entre outros fatores, predispõe à colonização por *Ps. aeruginosa* nos pacientes.

A produção de piocina parece ser marcador estável. Com o objetivo de verificar se a produção de "hemolisina", pelas amostras de *Ps. aeruginosa* também apresenta estabilidade genética, fez-se uma série de dez, vinte e trinta repiques em meio 81, em dias consecutivos, de três amostras de título 1:512. No final de cada série de repiques, determinou-se a atividade hemolítica e todas elas continuaram fornecendo título de 1:512.

Para testar a produção de "hemolisina", estas amostras foram estudadas em AEGT, manipulado no Laboratório de Bacteriologia Médica e no AEGT da Difco. Quando ambos os meios eram adicionados a 1% de glicose, verificou-se que as amostras mantinham o mesmo título hemolítico.

A sugestão de Al-Dujaili & Harris (1), de que a atividade hemolítica possa ser um marcador de virulência, é apoiada pelos resultados do presente trabalho, levando-se em conta dados epidemiológicos. Há informação segura de que infecção hospitalar por *Ps. aeruginosa* no Berçário não constitui problema, embora essa bactéria apareça colonizando a maioria dos recém-nascidos. Por outro lado, as amostras do CTI foram isoladas por solicitação do corpo médico, que estava alarmado com o aumento de infecções por *Ps. aeruginosa* naquele serviço.

## Referências Bibliográficas

1. Al-Dujaili, A.H. & Harris, D.M. — *Pseudomonas aeruginosa* infection in hospital: a comparison between "infective" and "environmental" strains. *J. Hyg.*, 75:195-201, 1975.
2. Al-Dujaili, A.H. — Toxic activity against alveolar macrophages of products of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from respiratory and non-respiratory sites. *J. Hyg.*, 77:211-220, 1976.
3. Berk, R.S. — Production of the extra-cellular hemolysin of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 84:1041-1048, 1946.
4. Berk, R.S. — Partial purification of the extra-cellular hemolysin of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 88:559-565, 1964.
5. Birch-Hirschfeld, L. — Under die Wirksamkeit der extrakte von auf zellophanagar gezuechtete Staphylokokken. *Z. Immunitätsforsch.*, 81:260-285, 1934.
6. Jones, L.F.; Pinto, B.V.; Thomas, E.T. & Farmer III, J.J. — Simplified methods for producing pyocins from *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol.*, 26:120-121, 1973.
7. Liu, P.V. — Survey of hemolysin production among species of *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.*, 74:718-727, 1957.
8. Liu, P.V.; Abe, Y. & Bates, J.L. — The roles of various fractions of *Pseudomonas aeruginosa* in its pathogenesis. *J. Infect. Dis.*, 108:218-228, 1961.
9. Melo, S.M. & Peres, J.N. — *Pseudomonas aeruginosa* de origem hospitalar classificadas pela produção de piocina. *Rev. Microbiol. (São Paulo)*, 9:71-78, 1978.
10. Ramos, H. — Estudo de hemolisina de *Pseudomonas aeruginosa*. São Paulo, 1972. (Tese de Doutorado).

**Marcadores de virulência de  
*Pseudomonas aeruginosa*. II — Provas  
“in vitro”: atividade hemolítica e  
sensibilidade ao cloreto de benzalcônio (CB)\***

Margarida Diniz Melo Camargos

Dept.<sup>o</sup> de Ciências Biológicas UCMG, Caixa Postal 2686  
30000 Belo Horizonte MG, Brasil

José Noronha Peres  
& Sinval Martins de Melo

Dept.<sup>o</sup> de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas UFMG, Caixa Postal 2486  
30000 Belo Horizonte MG, Brasil

### Resumo

Virulência de 145 amostras de *Pseudomonas aeruginosa*, isoladas do Bergário, Centro de Tratamento Intensivo (CTI), Clínica Cirúrgica e Urológica do Hospital das Clínicas da UFMG, previamente tipificadas pela produção de piocina e a determinação da atividade hemolítica e a sensibilidade ao cloreto de Benzalcônio (CB) foram investigadas. De 59 amostras oriundas do Bergário, 89,4% apresentaram atividade hemolítica baixa, isto é, igual ou menor que 1:16 e 18,6% foram sensíveis ao CB. Das amostras isoladas do CTI, 92,8% forneceram títulos altos de “hemolisina” e 75% se mostraram sensíveis ao CB. Nas Clínicas Cirúrgica e Urológica respectivamente 60% e 51,1% das amostras tiveram títulos de “hemolisina” maiores ou iguais a 1:32 e 60% e 76,7% foram sensíveis ao CB. Os resultados da produção de “hemolisina” e da sensibilidade ao CB são comparados com o tipo piocínico numa tentativa de se encontrar correlação entre esse marcador epidemiológico e aqueles prováveis marcadores de virulência.

### Summary

*Markers of virulence of Pseudomonas aeruginosa. II — Test “in vitro” hemolysin titers compared with sensitivity to benzalkonium chloride*

The virulence of 145 strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Nursery, Intensive Care, Surgical, and Urological Units (of the Hospital das Clínicas of UFMG) and previously classified with respect to pyocin production capability was investigated. The hemolysin titers and the sensitivity to benzalkonium chloride were determined for each strain. Of 59 isolates from the Nursery, 51 strains (89.4%) showed “low” hemolytic activity, with titers of 1:16 or less. When isolates from the Intensive Care, Surgical, and Urological Units were examined, 92.8%, 60%, and 51.1% respectively, of the strains tested showed higher hemolysin titers — of 1:32 and upward. With regard to benzalkonium chloride, the sensitivities of the isolates from the Nursery, Intensive Care, Surgical, and Urological Units were 18.6%, 75%, 60% and 76.7%, respectively.

\* Trabalho executado no Dept.<sup>o</sup> de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas UFMG, com auxílio da CAPES e FINEP.

## Introdução

O cloreto de benzalcônio (CB) e outros derivados quaternários de amônia são amplamente usados como desinfetantes e preservadores antimicrobianos, em soluções para uso parental e tópico. Todavia, a colonização de soluções, contendo sais quaternários de amônia, por *Ps. aeruginosa*, tem causado infecções hospitalares sérias e fatais (4).

O comportamento de *Ps. aeruginosa*, frente ao CB, tem sido objeto de estudos. Adair, Geftic & Gelzer (1) conseguiram adaptar, à concentração de 1mg/ml de CB, a amostra número 9027 da ATCC, que apresentava resistência natural a 0,2mg/ml da droga. Os mesmos pesquisadores demonstravam que a referida amostra de *Ps. aeruginosa* foi capaz de utilizar o CB como fonte de carbono, quando cultivada em meio mineral, contendo sulfato de amônia como fonte de nitrogênio. Por outro lado, notaram que *Ps. aeruginosa*, capaz de sobreviver e multiplicar-se na presença de altos níveis de CB, apresentava alterações culturais, metabólicas e em sua ultra-estrutura (2, 5). Considerando relevante o conhecimento do efeito do CB sobre a virulência de *Ps. aeruginosa*, Adair & col. (3) investigaram a ação patogênica das variantes sensível (incapaz de crescer em concentrações superiores a 0,2mg/ml de CB) e resistente (capaz de se multiplicar na presença de 1mg/ml de CB) da amostra 9027 de *Ps. aeruginosa*. A avaliação da virulência das amostras foi realizada mediante dois modelos experimentais: a córnea traumatizada de coelho e a infecção renal em camundongos.

A variante resistente comportou-se com virulência atenuada em ambos os modelos experimentais de infecção, enquanto a sensível provocou uma intensa ceratoconjuntivite no coelho. Os camundongos inoculados com a variante resistente sobreviveram ao fim de 21 dias, enquanto todos os inoculados com a sensível morreram no decorrer deste período.

Considerando-se que as amostras de *Ps. aeruginosa*, isoladas em hospitais, comportam-se ora como variantes sensíveis (incapazes de se multiplicarem na presença de 0,2mg/ml CB), ora como resistentes a essa concentração, julgou-se importante estudar a atividade hemolítica (um provável marcador de virulência) e a sensibilidade ao CB de amostras de *Ps. aeruginosa* de origem hospitalar, previamente tipificadas pela produção de pio-cina, por Melo & Peres (7).

## Material e Métodos

A técnica utilizada para a produção de "hemolisina" e para a determinação da atividade hemolítica foi a mesma usada em outro trabalho\*.

*Determinação da sensibilidade ao cloreto de benzalcônio (CB)* — A sensibilidade ao CB foi determinada segundo Adair & col. (3), com modificação quanto ao meio de cultura empregado. Repicou-se, com alça de Platina (Arthur H. Thomas Co., Philadelphia, Pa, USA, 7012-Fio series) 0,001ml de cultura de 24h, a 37°C em meio 81 (6), para 4,9ml do mesmo meio e adicionou-se 0,1ml de solução estoque de CB, de modo a obter-se concentração final de 200 µg/ml. A solução estoque de CB (200mg de CB em 20ml de água destilada estéril) era mantida na geladeira. Após incubação por 24h a 37°C, as amostras ficavam à temperatura ambiente, para leituras anotadas com 48 e 72h. Em todas as provas inocularam-se tubos com meio 81, para controle da amostra e com meio 81 e CB, para controle deste último. Consideravam-se sensíveis (S) e resistentes (R) as amostras na respectiva ocorrência de inibição e de crescimento da cultura, comparada aos controles.

\* Camargos, M.D.M.; Peres, J.N. & Melo, S.M. — Marcadores de virulência de *Pseudomonas aeruginosa*. III — Correlação entre provas "in vivo" e "in vitro". Rev. Microbiol. (a ser publicado).

## Resultados

Foi feita análise estatística para os dados das Tabelas 1, 2, 3 e 4, comparando-se os resultados da sensibilidade ao CB e título de "hemolisina", através do teste do qui-quadrado, com correção de Yates, ao nível de 5%, nas três primeiras.

Procurou-se correlacionar a atividade hemolítica e a sensibilidade ao CB das amostras isoladas do Berçário, cujos resultados são apresentados na Tabela 1. Observa-se que as 47 amostras do tipo piocínico 373112, predominante no Berçário, apresentavam atividade hemolítica baixa e, com exceção de seis (12,7%), todas foram resistentes à concentração de 200mcg/ml de CB em 72h.

Em termos de sensibilidade ao CB, não houve diferença estatisticamente significativa entre o tipo 373112 (12,7%) e os demais (41,6%). A comparação desses dois grupos ficou prejudicada pela baixa amostragem do segundo grupo (12 amostras). Pelos resultados obtidos, conclui-se que o tipo piocínico 373112 é estatisticamente menos virulento.

As amostras de *Ps. aeruginosa*, procedentes do Centro de Tratamento Intensivo (CTI), foram também estudadas, procurando-se estabelecer a correlação entre título hemolítico e sensibilidade ao CB. Os resultados acham-se na Tabela 2. Das 28 amostras estudadas, 26 (92,8%) tiveram títulos hemolíticos iguais ou acima de 1:32 e 21 (75%) foram sensíveis ao CB. Entre as 21 amostras não tipáveis (NT), 20 (95,2%) apresentaram títulos de "hemolisina" iguais ou superiores a 1:32 e 17 (80,9%) foram sensíveis ao CB.

A sensibilidade ao CB não foi significativa entre os tipos piocínicos tipáveis e não tipáveis (57,1% e 80,9%, respectivamente). Devido à baixa freqüência de tipo piocínico, em amostras com título de "hemolisina" baixo (1:16) a análise da associação entre o tipo e o título pode ter sido prejudicada. Nas amostras não tipáveis, 95,2% tiveram título hemolítico elevado (1:32 — 1:512) e as tipáveis, 85,7%.

**Tabela 1** — Tipo piocínico, título de "hemolisina" e sensibilidade ao cloreto de benzalcônio (CB) de 59 amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas do Berçário do Hospital das Clínicas da UFMG

Tipo piocínico	Título de "hemolisina"		Sensibilidade ao CB <sup>a</sup>
	≤ 1:16	1:32 — 1:256	
373112	47/47 <sup>b</sup> (100%)	0/47 (0%)	6/47 (12,7%)
Pertencentes a 4 tipos diferentes	4/10 (40,0%)	6/10 (60,0%)	5/12 (41,6%)
Total	51/57 (89,4%)	6/57 (10,5%)	11/59 (18,6%)

a. Inibição do crescimento em presença de 200 µ g/ml de CB

b. O numerador indica o número de amostras positivas e o denominador o de estudadas.

**Tabela 2** — Tipo piocínico, título de "hemolisina" e sensibilidade ao cloreto de benzalcônio (CB) de 28 amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas do Centro de Tratamento Intensivo do Hospital das Clínicas da UFMG

Tipo piocínico	Título de "hemolisina"		Sensibilidade ao CB <sup>a</sup>
	≤ 1:16	1:32 — 1:512	
Pertencentes a 6 tipos diferentes	1/7 <sup>b</sup> (14,2%)	6/7 (85,7%)	4/7 (57,1%)
Não tipáveis	1/21 (4,7%)	20/21 (95,2%)	17/21 (80,9%)
Total	2/28 (7,1%)	26/28 (92,8%)	21/28 (75,0%)

a. Inibição de crescimento em presença de 200 µ g/ml de CB

b. O numerador indica o número de amostras positivas e o denominador o de estudadas.

**Tabela 3** — Tipo piocínico, título de "hemolisina" e sensibilidade ao cloreto de benzalcônio (CB) de 15 amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas da Clínica Cirúrgica do Hospital das Clínicas da UFMG

Tipo piocínico	Título de "hemolisina"		Sensibilidade ao CB <sup>a</sup>
	≤ 1:16	1:32 – 1:128	
621231	4/10 <sup>b</sup> (40,0%)	6/10 (60,0%)	4/10 (40,0%)
Pertencentes a 4 tipos diferentes	2/6 (40,0%)	3/5 (60,0%)	5/5 (100%)
Total	6/15 (40,0%)	9/15 (60,0%)	9/15 (60,0%)

a. Inibição de crescimento em presença de 200 µg/ml CB

b. O numerador indica o número de amostras positivas e o denominador, de estudadas.

**Tabela 4** — Tipo piocínico, título de "hemolisina" e sensibilidade ao cloreto de benzalcônio (CB) de 43 amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas da Clínica Urológica do Hospital das Clínicas da UFMG

Tipo piocínico	Título de "hemolisina"		Sensibilidade ao CB <sup>a</sup>
	≤ 1:16	1:32 – 1:512	
421414	9/12 <sup>b</sup> (75,0%)	3/12 (25,0%)	10/12 (83,3%)
Pertencentes a 6 tipos diferentes	3/8 (37,5%)	5/8 (62,5%)	7/8 (87,5%)
Não tipáveis	9/23 (39,1%)	14/23 (60,8%)	16/23 (69,5%)
Total	21/43 (48,8%)	22/43 (51,1%)	33/43 (76,7%)

a. Inibição de crescimento em presença de 200 µg/ml de CB

b. O numerador indica o número de amostras positivas e o denominador o de estudadas.

**Tabela 5** — Título de "hemolisina" e sensibilidade ao cloreto de benzalcônio (CB) de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em quatro serviços do Hospital das Clínicas da UFMG

Número <sup>a</sup>	Título de "hemolisina"	Sensibilidade ao CB (%) <sup>b</sup>
71	1:8	36,6
9	1:16	55,5
63	1:32 – 1:512	68,2

a. Não se determinou o título de "hemolisina" de duas amostras

b. Inibição de crescimento em presença de 200 µg/ml em 72 horas.

**Tabela 6** — Tipo piocínico, título de "hemolisina" e sensibilidade ao cloreto de benzalcônio (CB) de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* do Berçário e as não tipificáveis (NT) do CTI<sup>a</sup> do Hospital das Clínicas da UFMG

Número	Serviço	Tipo piocínico	Título de "hemolisina"	Sensibilidade ao CB <sup>b</sup> (%)
47	Berçário	373112	≤ 1:16	12,7
20 <sup>c</sup>	CTI	NT	1:32 – 1:512	80,9

a. Centro de Tratamento Intensivo

b. Inibição de crescimento na presença de 200 µg/ml

c. Uma das amostras NT deu título de hemolisina 1:16 e foi sensível ao CB.

Os resultados da atividade hemolítica e a sensibilidade ao CB, das amostras da Clínica Cirúrgica, estão na Tabela 3. Entre as amostras do tipo piocínio 621231 e as demais identificadas, não houve diferença entre sensibilidade ao CB, que foi em média 60%. Os tipos piocínicos e os títulos hemolíticos também não apresentaram associação significativa, tendo ocorrido 60% de títulos altos, em ambos os tipos.

Com o mesmo objetivo, os resultados obtidos com as procedentes da Clínica Urológica, estão na Tabela 4. Com relação ao título hemolítico, os grupos têm distribuído correspondente (48,8% as de título baixo e 51,1% as de título alto), uma vez que a associação entre tipo e título não foi significativa. Não houve diferença estatística de sensibilidade ao CB, que apresentou um valor médio de 76,7%.

A Tabela 5 revela a correlação entre o título de "hemolisina" e a sensibilidade ao CB entre as amostras estudadas nos quatro serviços hospitalares. Há um aumento progressivo do percentual de sensíveis ao CB, à medida que os valores de "hemolisina" se elevam.

A Tabela 6 representa a correlação entre as amostras de tipo piocínio 373112, do Berçário e as NT do CTI.

## Discussão

Adair & col. (1) demonstraram que, em presença de uma fonte de nitrogênio, *Ps. aeruginosa* resistente ao CB pode se desenvolver, utilizando carbono da própria molécula. Apesar da simplicidade para crescer, resolvemos utilizar, na determinação da sensibilidade ao CB, o meio mais completo (caldo tripticase soja sem glicose e adicionado de nitrato de potássio a 1g%), introduzido por Jones & col. (6), com o objetivo de obter crescimento abundante, por difusão do germe e maior produção de piocina.

Os resultados da Tabela 1 mostram que 41 (87,2%) das 47 amostras do tipo piocínio 373112 foram resistentes ao CB. São consideradas não patogênicas, pelo critério adotado (3), o que está em conformidade com a baixa atividade hemolítica demonstrada e pelo fato de não terem sido incriminadas em infecções de recém-natos, não obstante a alta taxa de colonização, observada nas crianças do Berçário (7). Portanto, os dados evidenciam a correlação entre tipos piocínicos, capacidade de produção de "hemolisina" e comportamento frente ao CB para as amostras do Berçário.

Por outro lado, Melo & Peres (7) constataram que o tipo piocínico 373112 era amplamente espalhado no Berçário. Como a estabilidade do tipo piocínico é característica fundamental desse marcador, estes fatos são fortes argumentos em favor de uma coincidência entre tipo piocínico e capacidade de produção de hemolisina, que são tratados noutro artigo dos autores (8).

Nas outras clínicas estudadas, onde ocorreu maior diversidade de tipos piocínicos, entre as amostras, não se nota correlação nítida entre a produção de "hemolisina" e o comportamento diante do CB, a não ser no caso de 21 amostras NT, isoladas no CTI (Tabela 2). Por outro lado, na Clínica Urológica, de 43 amostras, 22 (51,1%) apresentaram títulos hemolíticos altos. Entre as 23 amostras NT, 14 (60,8%) tiveram títulos hemolíticos iguais ou acima de 1:32 e 16 delas (69,4%) comportaram-se como sensíveis ao CB. Os dados globais (Tabela 5) mostram que a elevação do título de "hemolisina" corresponde à maior taxa de sensibilidade das amostras ao CB.

Finalmente, através dos dados da Tabela 6, é possível confrontar o comportamento dos isolados do Berçário e aqueles não tipáveis do CTI. No primeiro grupo, encontramos um tipo piocínico com baixa atividade hemolítica e pequena sensibilidade para o CB; no segundo, os isolados apresentaram alta atividade hemolítica e grande sensibilidade ao CB. Estes resultados estão em conformidade com observações que levam a crer que, no Berçário, ocorreu apenas uma colonização bacteriana, ao contrário do CTI, onde, tudo indica ter havido um surto de infecção por *Ps. aeruginosa*.

## Agradecimento

Somos gratos ao Prof. Ivan Barbosa Machado Sampaio, pela análise estatística apresentada.

## Referências Bibliográficas

1. Adair, F.W.; Geftic, S.G. & Gelzer, J. — Resistance of *Pseudomonas* to quaternary ammonium compounds. I — Growth in benzalkonium chloride solution. *Appl. Microbiol.*, 18:229-302, 1969.
2. Adair, F.W.; Geftic, S.G.; Gelzer, J. & Hoffmann, H.P. — Effect of a hostile environment on *Pseudomonas aeruginosa*. *Trans. N.Y. Acad. Sci.*, 33:799-813, 1971.
3. Adair, F.W.; Liauw, H.; Geftic, S.G. & Gelzer, J. — Reduced virulence of *Pseudomonas aeruginosa* grown in the presence of benzalkonium chloride. *J. Clin. Microbiol.*, 1:175-179, 1975.
4. Bassett, D.J.C. — Causes and prevention of sepsis due to Gram-negative bacteria: common-source outbreaks. *Proc. Roy. Soc. Med.*, 64:980-986, 1971.
5. Hoffmann, H.P.; Geftic, G.; Gelzer, J.; Heymann, H. & Adair, F.W. — Ultrastructural alterations associated with the growth of resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of benzalkonium chloride. *J. Bacteriol.*, 113:409-416, 1973.
6. Jones, L.F.; Pinto, B.V.; Thomas, E.T. & Farmer III, J.J. — Simplified methods for producing pyocins from *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol.*, 26:120-121, 1973.
7. Melo, S.M. & Peres, J.N. — *Pseudomonas aeruginosa* de origem hospitalar classificadas pela produção de piocina. *Rev. Microbiol.*, (São Paulo), 9:71-78, 1978.
8. Melo, S.M.; Camargos, M.D.M. & Peres, J.N. — Marcadores de virulência de *Pseudomonas aeruginosa*. I — Provas "in vitro": tipos piocínicos e atividade hemolítica. *Rev. Microbiol.*, (São Paulo), 13:1-5, 1982.

## Efeitos da agitação, pH, tempo e nutrientes na produção de biomassa de *Candida guilliermondii* em meios de vinhaça e melaço

Sânia Maria Tauk

*Dept.<sup>o</sup> de Ecologia, Instituto de Biociências UNESP, Caixa Postal 178  
13500 Rio Claro SP, Brasil*

& Valdemir Gambale

*Dept.<sup>o</sup> de Estudos Ambientais, Instituto de Planejamento e Estudos Ambientais de  
Presidente Prudente  
19100 Presidente Prudente SP, Brasil*

### Resumo

Determinação do desenvolvimento de duas linhagens de *C. guilliermondii* em vinhaça e melaço, sob a influência de frascos agitados, pH, tempo de cultivo e nutriente. As condições ótimas de cultivo de ambas as linhagens em meio de vinhaça e de melaço foram pH 4,6, 30 horas, a 30°C e com a técnica de frascos agitados a 250r.p.m.. A adição de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> à vinhaça aumenta a produção de biomassa e o teor de fósforo de ambas as linhagens; adição de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aumenta o teor de proteína na linhagem selvagem. Em alguns meios de cultura houve maior produção de biomassa com a utilização do mutante.

### Summary

*Effect of agitation, pH, time and nutrients on biomass production of *Candida guilliermondii* in vinasse and molasses media*

The effect of culture time, nutrients, agitation of containers and pH in the development of a mutant a wild strain of *C. guilliermondii*, in vinasses and molasses, were studied. The best growth conditions were obtained at 30°C in agitated (250r.p.m.) containers with a pH 4.6 for 30 hours. The addition of H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> to the vinasse media increases biomass production; and the addition of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> increases protein content in the wild strain. In some culture media a greater biomass production was obtained with the mutant.

### Introdução

As leveduras constituem um grupo de microrganismos que desperta um grande interesse científico, por sua estreita relação com a produção de alimentos e por sua contribuição para o desenvolvimento da bioquímica destes organismos.

Paralelamente, com o aumento da procura de alternativas de utilização dos resíduos agroindustriais, a aplicação de leveduras vem sendo intensa, principalmente na produção de proteína microbiana, por apresentar alto valor protéico que excede ao do leite, da soja e dos ovos.

Várias são as espécies de leveduras utilizadas para obtenção de biomassa, entre elas, *Candida utilis* (3, 5) e *C. tropicalis* (6, 8, 15, 22).

*C. guilliermondii* tem sido usada em diferentes substratos, por ser superprodutora de riboflavina. Foi verificado seu desenvolvimento em meio com glicose e com um único ácido como fonte de nitrogênio (23). Essa levedura foi desenvolvida em n-alcanos, onde foi discutida a toxicidade dos ácidos monocarboxílicos  $C_6 - C_8$  e o mecanismo de oxidação em relação a formação de ácidos (10). É conhecido o efeito da autotermostática da população microbiana no crescimento e metabolismo dessa levedura (16) e o efeito da taxa da concentração dos componentes no meio durante seu desenvolvimento, verificando máxima produtividade com 40% de n-alcanos (11). A superprodução de riboflavina por *C. guilliermondii* está relacionada com a taxa de flavocoenzimas (26).

O desenvolvimento da levedura é maior em meio mínimo, quando suplementado com fosfato ácido de potássio e extrato de levedura (18).

*C. guilliermondii* foi utilizada para obtenção de levedura alimentícia e óleo diesel em destilado de petróleo (14). Seu autolizado, ou sobrenadante da cultura, quando adicionados no meio de cultivo de *C. tropicalis*, não adaptada a L-arabinose, diminuem o período de adaptação de 110h para 60h(17). Contém extrato livre de células rico em glutaminase e asparaginase (21) e quando cultivada em n-alcanos como fonte de C, contém na parede celular lipídeos e alcanos e seus derivados (27).

Na superprodução de riboflavina apresenta características fluorescentes (4). Utiliza naftenos e isoparafinas e oxidaoctadecano, nafteno e isoalcanos após os hidrocarbonos aromáticos (20).

A taxa de nitrogênio e fósforo na síntese de proteína é conhecida no desenvolvimento em n-alcanos (19).

Diferentes substratos são utilizados para produção de biomassa de leveduras, por exemplo, hidrocarbonetos, resíduos de destilaria e vinhaça. Entretanto, não há referências sobre estudos de *C. guilliermondii* em vinhaça e melaço, daí da importância em determinar-se os fatores que atuam no desenvolvimento desta levedura neste resíduo.

O presente trabalho relata aspectos do desenvolvimento de duas linhagens desta levedura, uma selvagem e outra mutante, nos diferentes meios utilizados.

Trabalho dessa natureza poderá fornecer subsídios para os estudos de produção de proteína microbiana e na obtenção de substâncias produzidas por microrganismos de interesse industrial, principalmente em substratos de baixo custo comercial.

## Material e Métodos

**Material — Meios de cultivo:** a) Meio de vinhaça 100%; b) Meio de melaço 3%; Meio completo para levedura, citado em Angelis & col. (1); c) Meio mínimo para levedura (4).

**Reagentes** — de procedência Merck. O ácido nitroso preparado com mistura de ácido, 0,2 N, acetato de sódio 0,2 N e nitrito de sódio 0,5 N. Solução de nistatina 0,1% e solução salina (NaCl 0,8%).

**Microrganismo** — Levedura *C. guilliermondii* proveniente do Instituto Zimotécnico "Prof. Jayme Rocha de Almeida", Escola Superior de Agronomia "Luiz de Queiroz" Piracicaba-SP, e mantida no laboratório de microbiologia do Instituto de Planejamento e Estudos Ambientais de Presidente Prudente, UNESP.

**Métodos** — 1. *Determinação dos fatores ambientais* — A linhagem selvagem de *C. guilliermondii* foi transferida para tubos contendo 10ml de meio líquido completo, para desenvolvimento de pré-inóculo e colocada a 30°C. Após 24 horas, transferiu-se 0,1ml dessa cultura para frasco de Erlenmeyer de 500ml, contendo 100ml do meio líquido completo e

cultivou-se sob agitação a 250 rotações por minuto, r.p.m., durante 24 horas, à mesma temperatura. A produção de células foi determinada pelo número de células, utilizando-se a técnica de absorvância, A. O pH do meio variou entre 4,0 a 6,0 padronizando-se com NaOH a 0,1 N ou HCl 0,1 N para verificar o efeito deste no desenvolvimento do microrganismo.

Para determinar a velocidade de crescimento e o efeito da utilização de frascos agitados utilizou-se a mesma técnica acima citada. Os frascos foram mantidos sem agitação ou com agitação a 250r.p.m. e as amostras foram coletadas em períodos de 6 horas, no total de 72 horas de incubação.

Não se determinou a curva de crescimento da levedura em função da temperatura, utilizando-se 30°C, considerada ideal para o microrganismo (23).

2. *Obtenção do mutante* — As células do pré-inóculo foram transferidas para solução salina, onde se determinou o número total de células. Em seguida foram irradiadas com U.V., em tempos diferentes e inoculadas em meio sólido completo para levedura e colocadas a 30°C, durante 24 horas. Determinou-se a porcentagem de sobrevivência das células, em função ao tempo de exposição. Após várias repetições, considerou-se as placas contendo 5% de sobrevivência de células, as quais foram replicadas para o meio mínimo.

No tratamento com ácido nitroso, outro agente mutagênico, as células do pré-inóculo foram transferidas para solução salina, determinando-se o número total de células. Desse suspensão transferiu-se 1ml para frasco de Erlenmeyer de 100ml contendo 19ml da mistura de ácido acético e acetato de sódio (1:1), este servindo para testemunho do experimento. Da mesma suspensão de células, transferiu-se 1ml para frascos contendo 18,33ml da mistura citada acrescida de 0,66ml de nitrito de sódio. Retirou-se amostras em períodos de 5 minutos, as quais foram imediatamente colocadas em solução de fosfato, para neutralização. Desta, transferiu-se 0,1ml para placas de Petri com meio sólido completo e colocando-as a 30°C. Após 24 horas, determinou-se a porcentagem de sobrevivência da levedura sob ação do ácido nitroso.

A seleção do mutante foi realizada segundo Davis (7) e Lederberg & col (12), verificando-se sua resistência à nistatina. Posteriormente, as linhagens selvagens e mutantes foram desenvolvidas em meio líquido completo, pH 4,6, com agitação de 250r.p.m., coletando-se amostras em períodos de 4 horas. 3. *Desenvolvimento das linhagens mutante e selvagem em meios de vinhaça e de melaço* — Do pré-inóculo transferiu-se 1ml para frascos de Erlenmeyer de 500ml contendo 100ml de meio com as diferentes composições: 1) melaço 3%; 2) vinhaça 100%; 3) mistura de melaço 3% e vinhaça 100% (1:1); 4) meio líquido completo, M.L.C.; 5) vinhaça com ácido giberélico (30mg/100ml); 6) vinhaça com ácido fosfórico  $H_3PO_4$  (0,1ml/100ml); 7) meio mínimo M.M.; 8) vinhaça com sulfato de magnésio —  $MgSO_4$  (5mg/100ml); 9) vinhaça com sulfato de potássio —  $K_2SO_4$  (30mg/100ml); 10) vinhaça com sulfato de amônia —  $(NH_4)_2SO_4$  (50mg/100ml); 11) vinhaça com uréia (20mg/100ml e  $H_3PO_4$  (30mg/100ml); 12) vinhaça com fosfato ácido de sódio —  $Na_2HPO_4$  (10mg/100ml) e 13) vinhaça com uréia (50mg/100ml).

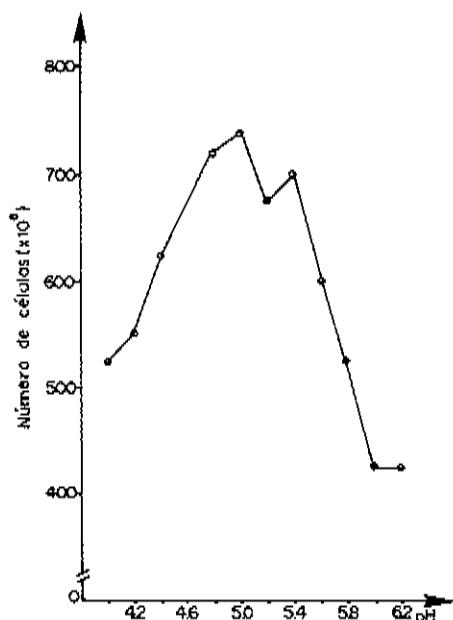
## Resultados e Discussão

Nos primeiros ensaios foi determinado o pH ótimo para desenvolvimento da linhagem selvagem de *C. guilliermondii* em meio líquido completo (Fig. 1), observando-se que o maior número de células ocorre em pH 4,6 — 4,8 e o menor número em pH 6,0 — 6,2.

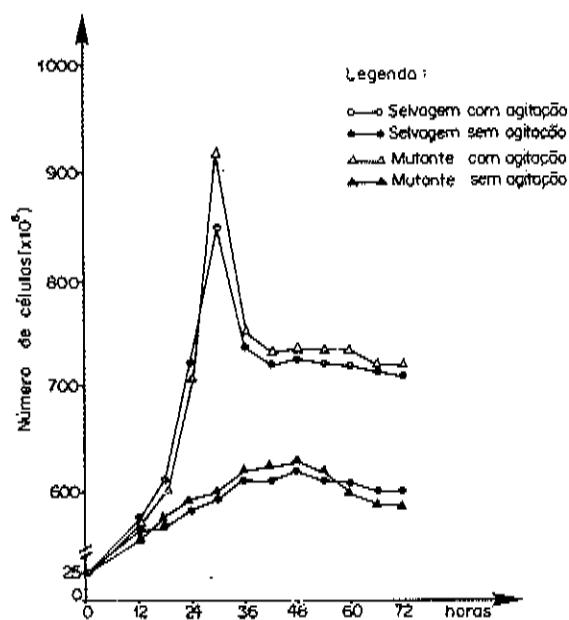
Em ácidos orgânicos (20) o pH ótimo é próximo ao neutro e pH 5,0 inibe o desenvolvimento da levedura. Esses resultados diferem dos encontrados em meio líquido completo (Fig. 1).

Sendo o pH função da natureza do meio, poderá ter seu ótimo diferente, em relação a natureza do substrato utilizado.

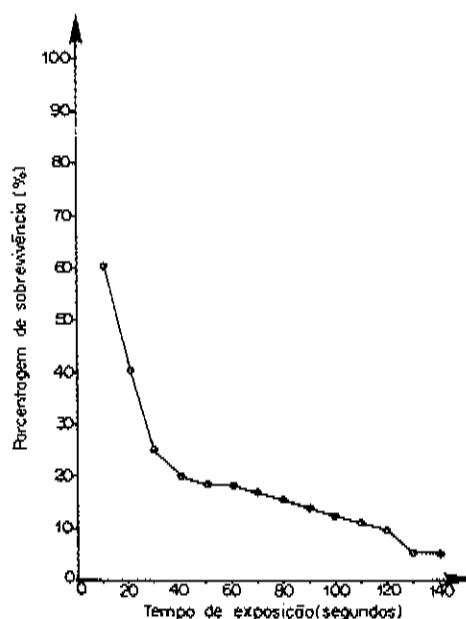
**Figura 1** — Curva de crescimento de *C. guilliermondii* quanto ao pH, em meio líquido completo a 30°C, durante 30 horas e com agitação constante de 250r.p.m.



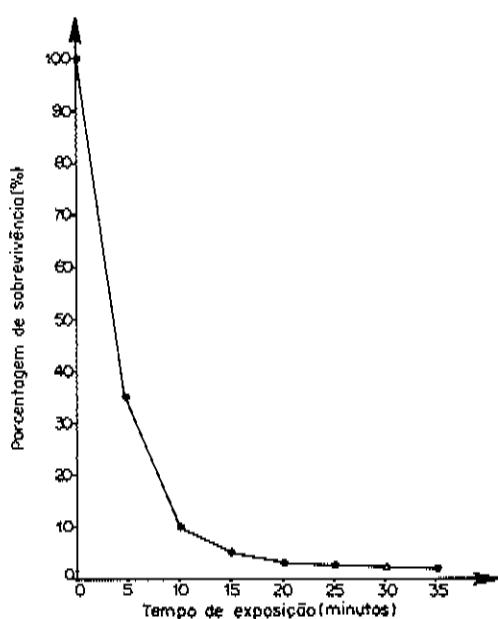
**Figura 2** — Curva de crescimento de *C. guilliermondii* em meio líquido completo a 30°C, com ou sem agitação de 250r.p.m. e pH 4,6



**Figura 3** — Curva de sobrevivência de *C. guilliermondii* à luz ultravioleta



**Figura 4** — Curva de sobrevivência de *C. guilliermondii* ao ácido nitroso



Situando-se entre 4,6 — 4,8 o pH ótimo poderá contribuir para diminuir a contaminação por bactérias, principalmente nas condições apresentadas nos fermentadores.

O tempo ótimo, para maior produção de células de *C. guilliermondii*, foi 30 horas de cultivo, para as duas linhagens estudadas (Fig. 2). Em meio líquido completo houve maior produção de células na linhagem selvagem, mesmo quando mantida sem agitação. A linhagem selvagem é mais sensível à falta de agitados durante o cultivo.

Nos frascos sem agitação, a fase logarítmica não é nítida e o número de células é inferior no mutante. Foi demonstrado que a aeração também atua no nível de ATP da levedura na assimilação de ácidos orgânicos (24).

A obtenção e uso de mutante foi para se obter uma linhagem que produzisse maior quantidade de células. A mortalidade de 95% das células, pela exposição U.V., ocorre em 1'30'' (Fig. 3). Com ácido nitroso, foram necessários 15 minutos, para 95% de mortalidade (Fig. 4). U.V. acarreta mutações de ponto e aberrações, não apresenta efeitos ionizantes; o ácido nitroso desaminacitosina a xantina (12, 13).

Para seleção do mutante, nistatina foi usada em substituição à penicilina. A linhagem selvagem tem resistência distinta à nistatina, quando comparada à mutante, que suporta concentrações maiores (Fig. 5).

Quando as linhagens selvagem e mutante são novamente inoculadas, em meio líquido completo, a selvagem produz maior número de células (Fig. 6). Verifica-se que a linhagem mutante é menos adaptada às condições do meio e de cultivo.

O desenvolvimento de ambas as linhagens em meios de melaço e vinhaça de composição diferente, demonstra maior produção de biomassa, utilizando-se a técnica de frascos agitados (Figs. 7 e 8).

Figura 5 — Curva de sobrevivência das linhagens selvagem e mutante de *C. guilliermondii* resistentes à nistatina

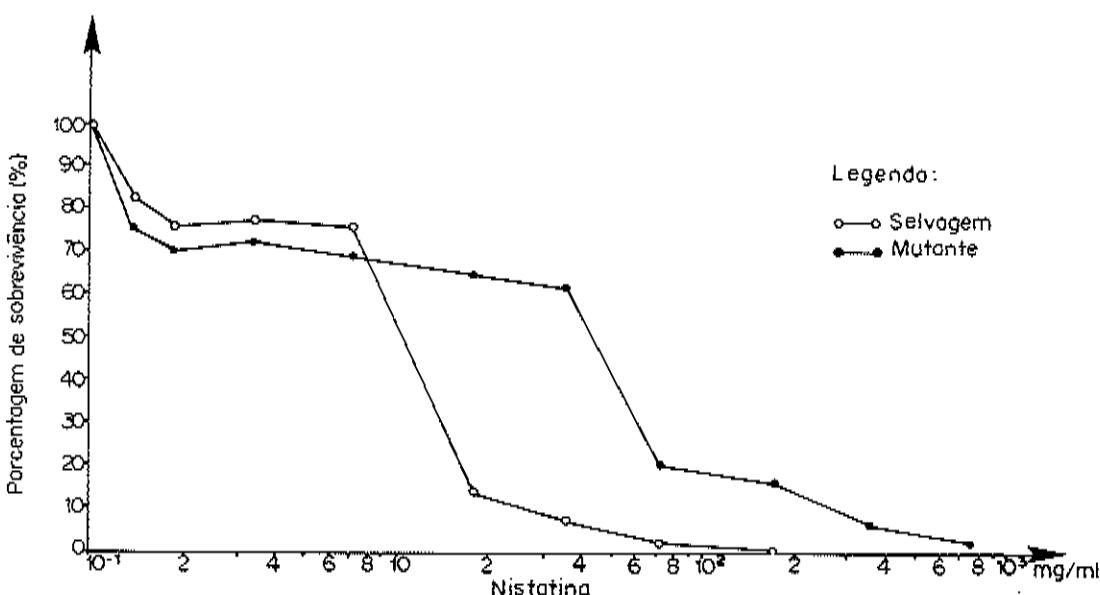


Figura 6 — Desenvolvimento das linhagens selvagem e mutante de *C. guilliermondii* resistentes à nistatina

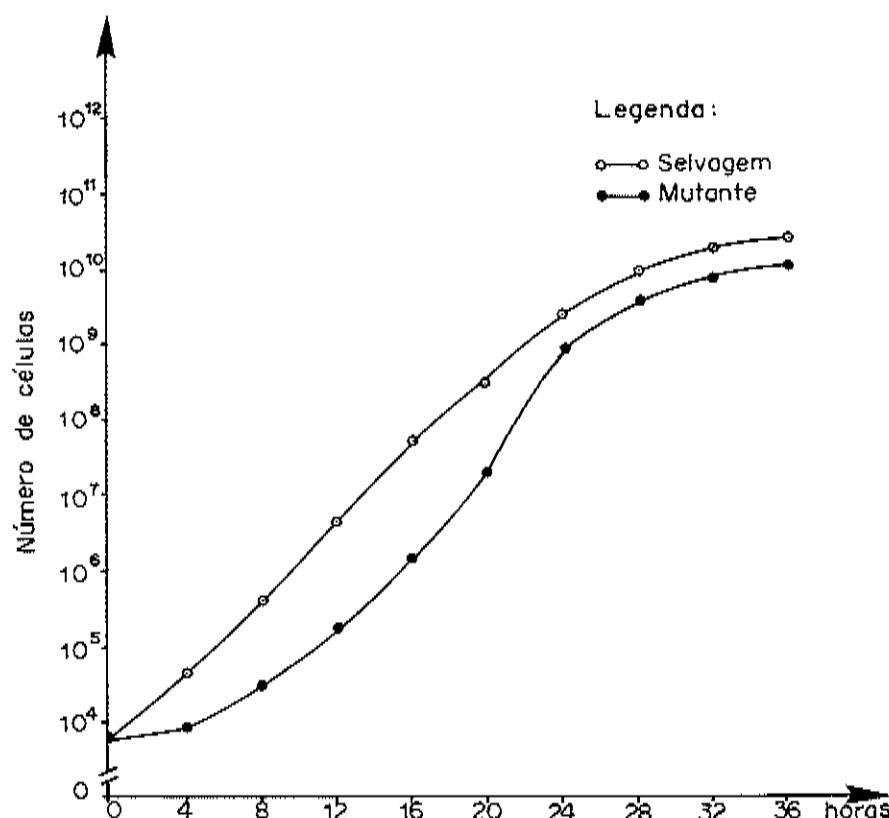


Tabela 1 — Teor de fósforo em biomassa de linhagem mutante e selvagem de *C. guilliermondii* em meios de vinhaça

Linhagem Agitação Meio de Cultura	Selvagem		Mutante	
	Com	Sem	Com	Sem
1. Melão 3%	1,10	0,41	0,50	0,60
2. Vinhaça 100%	0,27	0,24	1,20	0,55
3. Vinhaça 100% + Melão 3% (1:1)	0,86	0,69	0,80	0,55
4. Meio Líquido Completo	1,83	0,87	1,60	1,50
5. Vinhaça + Ácido giberélico	2,00	0,41	1,20	1,30
6. Vinhaça + $H_3PO_4$	2,67	2,12	2,32	1,80
7. Meio Mínimo	—	—	—	—
8. Vinhaça + $MgSO_4$	1,10	0,27	1,10	0,90
9. Vinhaça + $K_2SO_4$	1,27	0,84	1,00	1,10
10. Vinhaça + $(NH_4)_2SO_4$	1,69	0,84	1,47	0,86
11. Vinhaça + Uréia + $H_3PO_4$	2,00	1,77	2,20	1,60
12. Vinhaça + $Na_2HPO_4$	1,65	0,24	0,70	0,80
13. Vinhaça + Uréia	1,41	0,14	1,60	0,87

Figura 7 — Produção de biomassa e proteína das linhagens selvagens e mutantes em diferentes meios de cultura, a 30°C, durante 30 horas, pH 4,6 e agitação constante de 250 r.p.m.

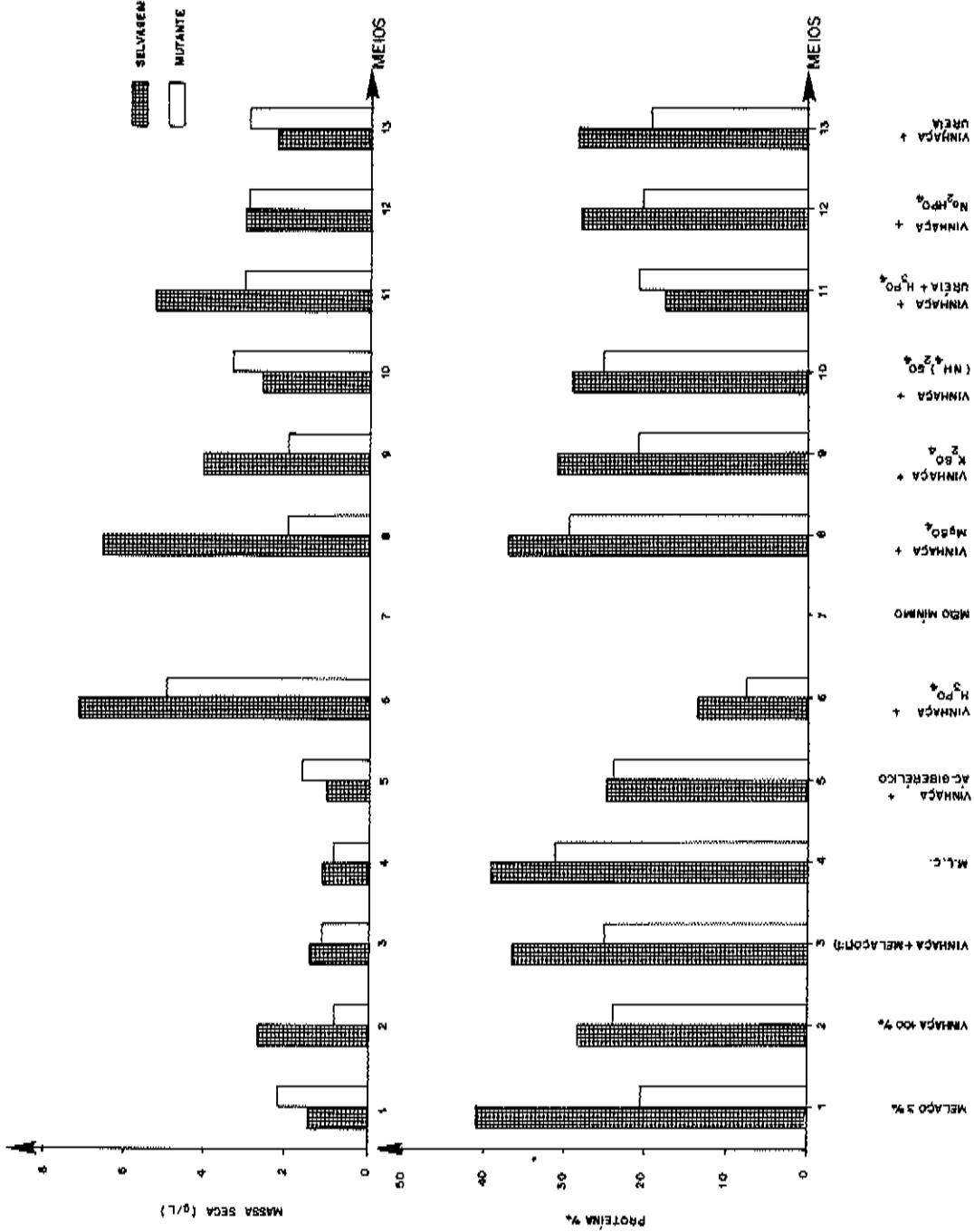
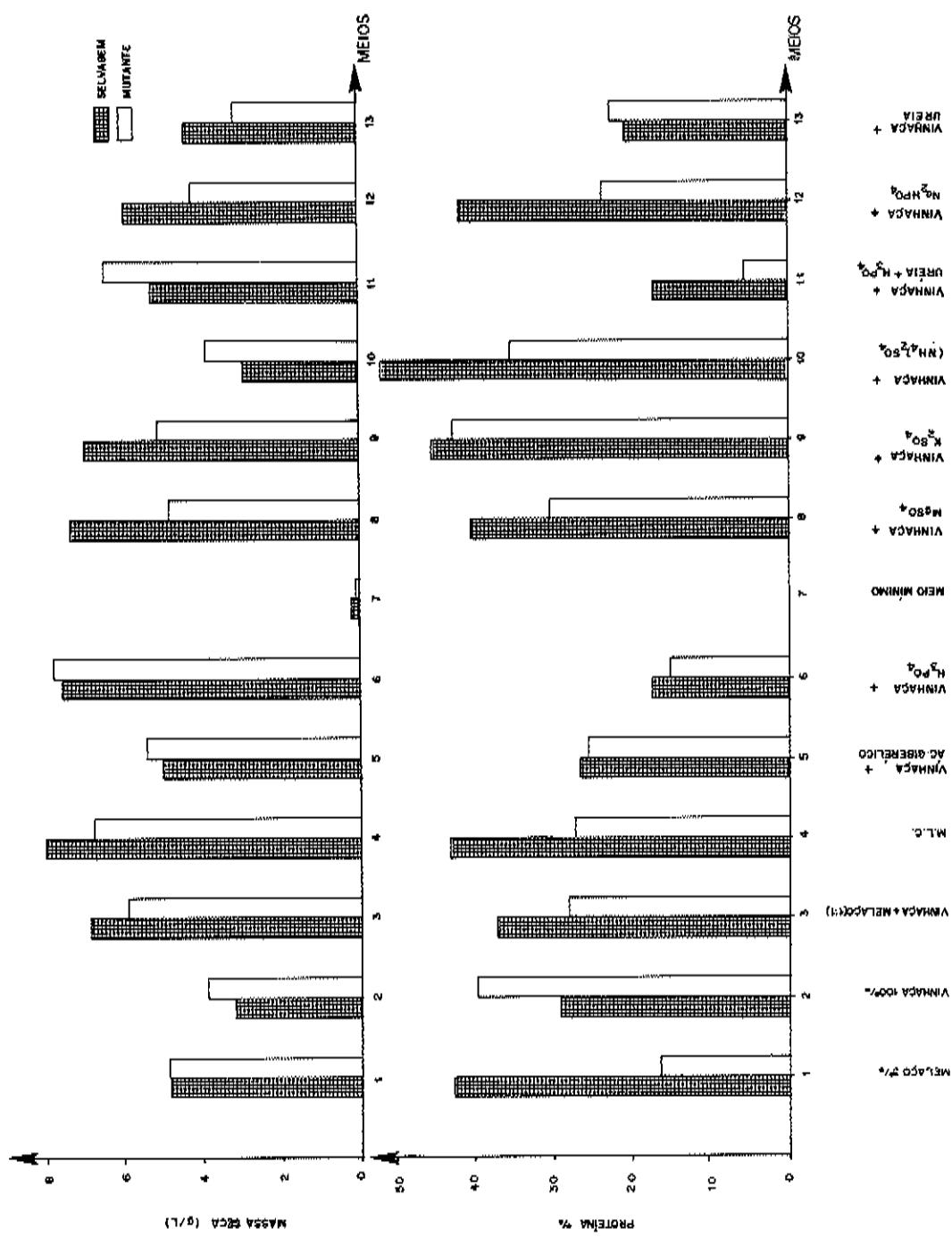


Figura 8 — Produção de biomassa e proteína das linhagens selvagem e mutantes em diferentes meios de cultura, a 30 °C, durante 30 horas, pH 4,6 e sem agitação constante.



Na linhagem selvagem, em meio de vinhaça suplementada com  $H_3PO_4$  ou  $MgSO_4$ , em frascos não agitados, a produção de biomassa foi aproximadamente a mesma obtida em frascos agitados. Entretanto, a importância de utilizar-se frascos agitados é evidenciada nos demais meios. Além disso, a utilização dos frascos agitados possibilita maior teor de proteína na biomassa. Este fato foi observado para a linhagem selvagem, com exceção dos resultados obtidos no meio de vinhaça suplementada com uréia. O meio líquido completo oferece melhores condições para a linhagem selvagem.

Comparando ao meio de vinhaça, o meio de melaço rende maior produção de biomassa, com as duas linhagens utilizadas.

A adição de sais e ácidos aumenta a produção de biomassa em meio de vinhaça. A maior produção é quando se adiciona  $H_3PO_4$ . Para produção de proteína, os melhores resultados são obtidos com adição de  $(NH_4)_2SO_4$ . Portanto, a adição de  $H_3PO_4$  e  $(NH_4)_2SO_4$  à vinhaça oferece melhores condições de produção de biomassa e proteína de *C. guilliermondii*. Com a linhagem mutante, há maior produção de biomassa em meios de vinhaça e de vinhaça suplementada com ácido giberélico,  $H_3PO_4$ ,  $(NH_4)_2SO_4$  ou uréia +  $H_3PO_4$ . Maior teor de proteína é encontrado na biomassa obtida em meio de vinhaça.

Considerando-se que é de grande importância a biomassa e seu teor em proteína, a utilização da linhagem selvagem é mais aconselhável quando o meio for de vinhaça suplementada com  $H_3PO_4$  e  $(NH_4)_2SO_4$ .

Os teores de fósforo na biomassa das linhagens selvagem e mutante (Tabela 1) demonstram que a adição de  $H_3PO_4$  e uréia aumenta o teor de elemento. Portanto, a adição de  $H_3PO_4$ , além de aumentar a produção de biomassa da levedura em vinhaça também colabora com aumento do teor de fósforo.

O desenvolvimento de *C. guilliermondii* em meio de melaço ou vinhaça deverá ocorrer sob as condições de pH 4,6 - 4,8, em frascos com agitação, por 30 horas. A vinhaça deverá ser suplementada com  $H_3PO_4$  e  $(NH_4)_2SO_4$ .

## Referências Bibliográficas

1. Angelis, D.F.; Oliveira, M.C.F.L. & Furletti, M.E.M. — Teor de glicídios totais e trealose em algumas espécies do gênero *Candida*. Rev. Microbiol. (S. Paulo), 10:153-156, 1979.
2. A.O.A.C. — Official methods of analysis. 9. ed. Washington, 1960.
3. Araujo Neto, J.S. & Panek, A.D. — Growth of *Candida utilis* on extracts of banana leaves as a cellulosic waste. Rev. Microbiol., 6:59-62, 1975.
4. Arershyan, A.A. & Maneshin, S.K. — Concerning the possibility of the study of some biochemical processes in microorganisms according to variations of their characteristic fluorescence. Mikrobiol. Sait., 7:94-101, 1974.
5. Camhi, J.D. & Rogers, P.L. — Multistage continuous cultivation of *Candida utilis* on spent sulfite liquor. Hakko Kogaku Zasshi, 54:437-449, 1976.
6. Chigaleichik, A.G.; Shol'ga, A.V.; Termkhitarova, N.G. & Rylkin, S.S. — Physiological biochemical characteristics of *Candida tropicalis* grown on n-alkanes at supraoptimal temperature. Mikrobiol., 44:61-66, 1975.
7. Davis, B.D. — Isolation of biochemistry deficient mutants of bacteria by penicillin. Jour. Amer. Chem., 70:4267-4271, 1948.
8. Einsele, A.; Blanch, H.W. & Fletcher, A. — Agitation and aeration in hydrocarbon fermentations. Biotechnol. & Bioeng. Symp., 4:455-466, 1973.
9. Fish, C.J. & Subbaraud, J. — The determination of phosphorus. J. Biol. Chem., 66:275-285, 1925.
10. Kramel, H.; Hunge, R. & Weide, H. — Formation of dicarboxylic acids by *Candida guilliermondii*, strain H17, from n-alkanes. Z. Allg. Mikrobiol., 13:55-58, 1973.
11. Kozlova, L.I.; Rozhkova, M.L.; Meshchankin, G.I.; Zhdannikova, E.N. & Velckslanvinshya, O.I. — Continuous cultivation of *Candida* yeasts on petroleum distillates. Prikl. Biokhim. Mikrobiol., 9:824-829, 1973.

12. Lederberg, J. & Lederberg, E.M. — Replica plating and in direct selection of bacterial mutants. *J. Bacteriol.*, 63:399-402, 1952.
13. Lederberg, J. & Tatum, E.L. — Detection of biochemical mutants of microorganisms. *J. Biol. Chem.*, 165:381-382, 1946.
14. Mikhaleva, V.V.; Gradova, N.B.; Kozlova, L.I.; Rozerkova, M.I.; Zerdannikova, E.N. & Velikoslavinskaya, O.I. — Fodder yeast and deparaffinized diesel fuel oil. *Appl.*, p. 170034, 1973.
15. Patrikeev, V.V. & Parina, O.V. — Effect of specifically treated silica gels on yeast growth. *Prikl. Biochim. Mikrobiol.*, 41:388-399, 1968.
16. Ryakin, S.S.; Shkvolchenko, A.N.; Sterkin, V.E. & Boev, A.V. — Effect of antithermostatic of microbial populations on the growth and gas metabolism of microorganisms. *Mikrobiol.*, 42:445-451, 1973.
17. Sartanyan, V.W. — Study of the adaption of *Candida tropicalis* KZ-10 yeasts to new carbon sources. *Biol. Zh. Arm.*, 29:80-100, 1976.
18. Schroder, K.D. & Weide, H. — Optimierung der Kulturbedingungen fur *Candida guilliermondii* Stamm H-17. *Zeitschrift fur Allg. Mikrobiol.*, 13:673-680, 1973.
19. Simek, S.M. & Barbiro-Bednar, G. — The role of nitrogen and phosphorus in protein synthesis by *Candida guilliermondii* cultivated on n-alkanes. *Biotechnol. & Bioeng. Symp.*, 4:155-160, 1973.
20. Sokolov, Y.I.; Alen'eva, E.S.; Kozlova, L.I.; Bakhmet'Eva, I.I. — Growth of *Candida* yeasts on octadecane in the presence of naphthenic, isoparaffinic and aromatic hydrocarbons. *Mikrobiol. Sint.*, 7:51-58, 1974.
21. Stepanyan, K.R.; Oganesyan, S.P. & Daryan, M.A. — Amidases of the yeast *Candida guilliermondii* UKM-U-42. *Biol. Zh. Arm.*, 28:23-28, 1978.
22. Stewart, G.G. — Some thoughts on the microbiological aspects of brewing and other industries utilizing yeasts. *Adv. Appl. Microbiol.*, 17:233-262, 1974.
23. Straub, G. & Fritske, W. — The influence of iron concentration and temperature on growth and riboflavin over-production of *Candida guilliermondii*. *Biotechnol. & Bioeng. Symp.*, 4:225-231, 1978.
24. Sustina, R.N.; Gradova, N.B. & Rudan, E.L. — Effect of the pH value on the development of *Candida guilliermondii* yeasts cultured on media containing organic acids. *Prickli. Biokhim. Mikrob.*, 9:333-340, 1973.
25. Sustina, R.N.; Rudan, E.L.; Gradova, N.B. & Sotnikov, G.G. — Effect of aeration intensity on the ATP level in *Candida guilliermondii* H 249 cells assimilating organic acids. *Prickli. Mikrobiol. Biokhim.*, 9:157-161, 1973.
26. Uhlman, G.; Schlee, D. & Reinbothe, H. — Purine metabolism and riboflavin formation in microorganisms. XII — Role of flavocoenzymes in riboflavin over production by *Candida guilliermondii*. *Biochem. Physiol. Pflanz.*, 166:1-6, 1974.
27. Vorob'Eva, G.I. & Maksimova, G.N. — Localization of hydrocarbons in the cells of paraffin oxidizing yeasts. *Mikrobiol. Sint.*, 7:31-38, 1974.

## **Prevalência de aglutininas anti-leptospiras em eqüinos mantidos para produção de soros terapêuticos**

**Roberto Mitio Yanaguita**

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

**Carlos Almeida Santa Rosa**

*Dept.<sup>o</sup> de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Medicina Veterinária e  
Zootecnia USP,  
Cidade Universitária  
05568 São Paulo SP, Brasil*

**Raimundo Rolim Rosa**

*Dept.<sup>o</sup> de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas USP  
& José Giometti  
Instituto Butantan, Caixa Postal 65  
01000 São Paulo SP, Brasil*

### **Resumo**

Através da reação de soroaglutinação microscópica para leptospirose, foram examinados 504 soros de eqüinos. Como抗igenos, utilizaram-se 18 culturas vivas de vários sorotipos e considerou-se o título inicial de 1:100 como reação positiva. Tentativas de isolamento a partir da urina de 6 animais, resultaram negativas. 51 soros (10,11%) foram positivos, tendo-se encontrado aglutininas contra os sorotipos *andamana* (23,53%), *pomona* (15,67%), *panama* e *australis* (13,72%), como os mais freqüentes. Foram evidenciados ainda, anticorpos para os sorotipos *wolffii*, *canicola*, *butembo*, *shermani*, *icterohaemorrhagiae*, *grippotyphosa* e *brasiliensis*. Em seis soros ocorreram anticorpos para dois ou mais sorotipos e nenhuma correlação entre cegueira e leptospirose foi constatada.

### **Summary**

*The prevalence of leptospiral agglutinins in horses used for therapeutic sera production*

Sera from 504 horses were examined through the microscopic agglutination test. Eighteen serotypes of *Leptospira* were used as alive antigens. Titers of 1:100 and higher were considered significant. The isolation of *Leptospira* was tried from urine of six animals, but no isolation was achieved. From 504 horses, 51 (10,11%) were positive. Agglutinins against serotypes *andamana* (23,53%), *pomona* (15,67%), *panama* and *australis* (13,72%) were found. Besides, antibodies against serotypes *wolffii*, *canicola*, *butembo*, *shermani*, *icterohaemorrhagiae*, *grippotyphosa* and *brasiliensis* were also seen. Coagglutinins occurred in six sera. No correlation between blindness and leptospirosis was verified.

### **Introdução**

O estudo da leptospirose em animais domésticos começou a tomar vulto, a partir de 1950, em virtude da sua relação com as leptospiroses humanas e também, pela importância econômica dos animais doentes.

Em comparação a outros animais domésticos, é pequena a ocorrência de leptospirose em eqüinos, embora inquéritos soro-epidemiológicos realizados em vários países tenham demonstrado infecções sub-clínicas, devidas a vários sorotipos (4, 5, 7, 8, 14).

Os sorotipos de leptospires predominantes na raça eqüina, revelados através de inquéritos sorológicos são: *pomona*, *canicola*, *grippotyphosa* e *icterohaemorrhagiae* (1).

O presente estudo teve por finalidade examinar a prevalência de anticorpos anti-leptospires em eqüinos pertencentes ao Instituto Butantã de São Paulo, utilizados para produção de soros terapêuticos.

## Material e Métodos

Foram utilizados 504 eqüinos pertencentes ao Instituto Butantã, para o preparo de soros terapêuticos antitóxicos ou anti-peçonhentos.

De cada animal, foram coletados cerca de 10ml de sangue, em tubos previamente esterilizados, e o soro obtido de modo convencional. Todos os soros foram armazenados em congelador a menos 20°C, até o momento da realização da prova de soroaglutinação. Esta foi realizada seguindo orientação recomendada pelo Grupo Científico de Pesquisas em Leptospirose da Organização Mundial da Saúde (17). Os抗ígenos utilizados consistiram em culturas vivas, cultivadas em meio líquido EMJH (DIFCO). Além da soroaglutinação, procedeu-se ainda a tentativa de isolamento de leptospires, semeando-se urinas de 5 animais com cegueira parcial e um com cegueira total. As amostras foram semeadas no meio de Fletcher, fazendo-se leitura a partir do 5º dia até 40 dias, quando foram descartadas como negativas, se não se observasse nenhum crescimento.

## Resultados

Anticorpos com títulos significantes (1:100 ou mais) foram encontrados em 51 soros (10,11%), do total de 504 examinados. 45 soros (8,92%) apresentaram anticorpos contra apenas um sorotipo de leptospira, enquanto que seis (1,19%) apresentaram contra dois ou mais sorotipos, conforme podemos observar na Tabela 1.

Os títulos finais variaram de 1:100 a 1:6.400, sendo o sorotipo *andamana* encontrado com maior freqüência (23,53%), seguidos de *pomona* (15,67%), *panama* e *australis* (13,72%) cada um. O título mais elevado, de 1:6.400 foi observado contra *grippotyphosa*.

As amostras de urina, semeadas em meio de Fletcher, não apresentaram nenhum crescimento, mesmo após 40 dias de incubação em estufa a 28°C.

## Discussão e Conclusão

Os resultados sugerem que muitos sorotipos estão relacionados à leptospirose eqüina. Este fato já foi constatado em trabalhos anteriores (4, 5, 14). No presente estudo, foram encontrados 10,11% de soros com reações positivas para leptospirose. Os animais analisados tinham suas origens variadas, mas no momento da coleta do material estavam confinados na Fazenda do Instituto Butantã (Município de São Roque, SP) e encontravam-se, pelas condições de confinamento, sujeitos aos mais variados tipos de contágio, inclusive em relação à leptospirose.

É evidente a existência de leptospirose em eqüinos, pelos resultados deste e de outros estudos já realizados, embora não se possa atribuir a mesma importância que se atribui às leptospiroses bovinas e suínas, das quais já foram isolados vários sorotipos de leptospires (3, 12, 13). A dificuldade encontrada em relação ao isolamento de leptospires de

Tabela 1 — Prevalência de anticorpos anti-leptospiras em soros de eqüinos do Instituto Butantã, São Paulo, 1980

Serotipo	Título 1	100	200	400	800	1600	3200	6400	total
<i>andamana</i>	10(21,3)								10
<i>pomona</i>	5(15)	1	1			16			8
<i>panama</i>	6(14)								6
<i>australis</i>	5(15)		1						6
<i>wolffii</i>	5(14)								5
<i>canicola</i>	3								3
<i>shermani</i>	3(12)								3
<i>icterohaemorrhagiae</i>	2								2
<i>ballum</i>	2								2
<i>grippotyphosa</i>						11		1	2
<i>butembo</i>		(16)		1					1
<i>brasiliensis</i>	1								1
<i>whitcombi</i>	13								1
<i>tarassovi</i>	12								1
<i>javanica</i>	(11)								
Total	44	2	2		2			1	51

1. Coaglutinação *grippotyphosa-javanica-andamana*; 2. Coaglutinação *tarassovi-shermani*; 3. Coaglutinação *whitcombi-andamana*; 4. Coaglutinação *wolffii-panama*; 5. Coaglutinação *pomona-australis*; 6. Coaglutinação *pomona-butembo*.

eqüinos já fora constatada por vários pesquisadores e, até o presente momento, somente 12 isolamentos foram relatados (6, 8, 16).

Os eqüinos podem contaminar-se com urinas infectadas de roedores e de outros animais domésticos ou silvestres, pois muitos destes são portadores de leptospiras em seus rins (2, 3, 12, 13, 15).

Existem evidências que o cavalo pode excretar leptospiras viáveis pela urina por um período de 14 semanas ou mais (11), e esta prolongada leptospirúria pode fazer com que esta espécie animal sirva de importante fonte de infecção, tanto para outros animais ou o homem.

Seis soros apresentaram anticorpos para mais de um sorotipo. Isto pode ser explicado pelo fato das leptospiras apresentarem um complexo mosaico antígenico. Deve-se destacar ainda, a ocorrência de anticorpos para o sorotipo *shermani*, ainda não assinalado nesta espécie animal em nosso meio.

Neste estudo, não foi possível evidenciar alguma correlação entre cegueira e leptospirose, associação já descrita por outros autores (4, 9, 14), embora possam ocorrer casos em que haja algum comprometimento, tal como descreveu Roberts & col. (10), quando isolaram o sorotipo *pomona* de um dos animais.

## Referências Bibliográficas

1. Alston, J.M. & Broom, J.C. — Leptospirosis in man and animals. Edinburgh, E & S Livingstone, 1958.
2. Babudieri, B. — Animal reservoirs of leptospirosis. Ann. N.Y. Acad. Sci. 70:393-413, 1958.
3. Castro, A.F.P.; Santa Rosa, C.A. & Caldas, A.D. — Isolamento de *L. canicola* de suínos abatidos em matadouro. Arq. Inst. Biol. (São Paulo), 29:193-197, 1962.
4. Corrêa, M.O.A.; Amato Neto, V.; Veronesi, R. & Fabri, O.S. — Leptospirose em eqüinos: inquérito sorológico. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 15:186-193, 1957.
5. Freitas, D.C. de; Salles Gomes, C.E.; Lacerda, J.P.G. & Pereira Lima, F. — Notas sobre Leptospirose eqüina. Arq. Inst. Biol. (São Paulo), 27:93-96, 1960.

6. Galton, M.M. — Leptospiral serotype distribution lists according to host and geographic area. Atlanta, Communicable Disease Center, 1966.
7. Hanson, L.E.; Martin, R.J.; Gibbons, R.W. & Schurrenberger, P.R. — Equine leptospirosis. Proc. U.S. Livestock Sanitary Assoc., 73:169-180, 1969.
8. Meyers, D.M. — Serological studies and isolation of serotype *hardjo* and *Leptospira biflexa* strains from horses of Argentina. J. Clin. Microbiol., 3:548-555, 1976.
9. Rimpau, W. — Leptospirose beim Pferd (Periodische Augenentzündung). Tierarztl. Umsch., 2:15-16, 1947.
10. Roberts, S.J.; York, C.J. & Robinson, J.W. — An outbreak of leptospirosis in horses on a small farm. J. Amer. Vet. Med. Ass., 155:442-445, 1969.
11. Roberts, S.J. — Comments on equine leptospirosis. Amer. Vet. Med. Ass., 155:442-445, 1969.
12. Santa Rosa, C.A.; Pestana de Castro, A.F. & Troise, C. — Isolamento de *Leptospira icterohaemorrhagiae* de bovino em São Paulo. Arq. Inst. Biol. (São Paulo), 28:113-118, 1961.
13. Santa Rosa, C.A.; Pestana de Castro, A.F. & Troise, C. — Isolamento de *Leptospira pomona* de suíno em São Paulo. Arq. Inst. Biol. (São Paulo), 29:165-174, 1962.
14. Santa Rosa, C.A.; Pestana de Castro, A.F.; Campedelli F<sup>º</sup>, O. & Mello, D. — Leptospirose em eqüinos. Arq. Inst. Biol. (São Paulo), 35:61-65, 1968.
15. Santa Rosa, C.A.; Sulzer, C.R.; Giorgi, W.; Silva, A.S. da; Yanaguita, R.M. & Lobão, A. — Leptospirosis in wildlife in Brazil: isolation of a new serotype in the Pyrogenes group. Am. J. Vet. Res., 36:1363-1365, 1975.
16. Sulzer, C.R. — Leptospiral serotype distribution lists according to host and geographic area: July 1966 to July 1973. Atlanta, Center for Disease Control, 1975.
17. WHO Study Group on Leptospirosis — Classification of leptospires and recent advances in leptospirosis. Bull. Wld. Hlth. Org., 32:881-891, 1965.

## **Estudo epidemiológico e microbiológico de um surto de intoxicação alimentar**

Sonia Presa Salzberg

Pilar Rodriguez Massaguer

*Laboratório de Microbiologia, Dept.<sup>o</sup> de Ciências, FEA — UNICAMP  
13100 Campinas SP, Brasil*

& Antonio de Melo Serrano

*Dept.<sup>o</sup> de Tecnologia, FEA — UNICAMP*

### **Resumo**

O estudo de um surto de toxi-infecção alimentar que ocorreu simultaneamente em dois restaurantes de uma mesma instituição, indicou a carne cozida condimentada ou a maionese de batata, ambas preparadas de véspera, como a causa da toxi-infecção. A mediana do tempo de incubação correspondeu a doze horas e meia, a duração dos sintomas foi inferior a vinte e quatro horas em quase todos os casos e a diarréia foi o sintoma predominante. Embora as contagens de *Clostridium perfringens* nas fezes dos doentes tenha sido elevada, não se pode deixar de admitir também *Bacillus cereus*, como possível causa do surto.

### **Summary**

*Epidemiological and microbiological studies of an outbreak of food-borne intoxication*

The study of a food-borne intoxication that occurred simultaneously at the two restaurants of the same institution pointed to a condimented cooked meat or a potato mayonnaise, both prepared the day before serving as the cause of the intoxication. The incubation period mediana was twelve hours and a half and the symptoms lasted less than twenty four hours in almost all the cases with predominance of diarrhea and nausea. In spite of the high count of *Clostridium perfringens* in the feaces of the affected persons *Bacillus cereus* can not be ruled out as the possible cause of the outbreak.

### **Introdução**

As toxi-infecções alimentares são amplamente distribuídas no mundo inteiro. No Brasil já foram descritos, entre outros, surtos provocados por *Salmonella* sp. (5), *Clostridium botulinum* (2) e há evidência epidemiológica e microbiológica da ocorrência de intoxicação por *Clostridium perfringens* na cidade de Campinas (3, 4). Com o fim de sensibilizar as autoridades competentes quanto à importância de se esclarecerem os aspectos associados a tais acontecimentos, para no futuro se conseguir prevenir repetições dos mesmos erros, consideramos de interesse a publicação do presente trabalho.

No fim do dia 17 e madrugada do dia 18 de outubro de 1978, nos dois restaurantes de uma mesma instituição de Campinas, grande número de pessoas apresentaram sintomas de doenças gastrointestinal, caracterizada por diarréia profusa, em alguns casos

acompanhada de náuseas, vômitos e dores abdominais. Os sintomas se desenvolveram com maior freqüência entre 7 e 19 horas após a ingestão do almoço.

Neste trabalho descrevem-se os resultados da pesquisa epidemiológica e das análises microbiológicas realizadas, as quais indicam *Clostridium perfringens* ou *Bacillus cereus* como as prováveis causas da intoxicação.

## Material e Métodos

Uma pesquisa epidemiológica foi iniciada dentro das vinte e quatro horas seguintes ao aparecimento dos primeiros sintomas, distribuindo-se 300 formulários, aproximadamente 10% do número de usuários, entre as pessoas que afluíram aos dois restaurantes e que tinham consumido o almoço no dia anterior.

Duzentas e trinta pessoas responderam aos formulários sendo que cento e sessenta e oito delas comeram em um restaurante e vinte e três noutro. Trinta e nove questionários ficaram sem identificação do local onde as pessoas comeram.

Os formulários incluíam perguntas acerca dos alimentos consumidos, sexo, idade e sobre o tempo decorrido entre a ingestão dos alimentos e o surgimento dos primeiros sintomas. Com os dados obtidos foram calculadas a mediana do tempo de incubação, as freqüências dos sintomas observados e as razões de ataque para os alimentos.

No dia seguinte à refeição, procurou-se retirar amostras de comida do dia anterior para fazer as análises microbiológicas, mas recebeu-se a informação que os restos não existiam mais.

Devido à impossibilidade de recuperação dos restos de comida, os exames microbiológicos foram realizados apenas em fezes de pessoas que apresentaram sintomas de toxo-infecção. Analisaram-se onze amostras de fezes coletadas entre o terceiro e quinto dia após o início dos sintomas. As amostras foram suspensas a 1% em água peptonada e submetida a choque térmico a 80°C durante dez minutos. Após o tratamento térmico, diluições sucessivas foram inoculadas em ágar SPS (sulfito polimixina sulfadiazina) de acordo com a técnica de Angelotti (1) e incubadas em anaerobiose, para posterior identificação e contagem. Também foi utilizado o ágar sangue com neomicina (1), inoculado em superfície e incubado em aerobiose e anaerobiose. Na caracterização de *C. perfringens* empregaram-se as provas de redução de nitratos e nitritos, de motilidade e de produção de ácido e gás a partir da lactose. Foi realizada, também, a observação microscópica da morfologia em esfregaços corados pelo método de Gram, preparados a partir de 10% das colônias desenvolvidas no meio SPS.

## Resultados

A diarréia foi o sintoma mais comum, apresentando-se em 98,5% dos casos, seguida de náusea 11,5%, vômito 4,3% e dores abdominais 1,6% (Tabela 1). Entre as pessoas entrevistadas, nenhuma apresentou sintomas aparentes de febre. A maior incidência correspondeu aos períodos de incubação compreendidos entre sete e dezenove horas, não se apresentando casos com menos de duas horas, nem com mais de vinte e cinco horas. A mediana do tempo de incubação foi de doze horas e meia (Figura 1). O dado referente à duração dos sintomas não foi registrado como tal, porém as pessoas foram entrevistadas dentro das vinte e quatro e quarenta e oito horas após a ingestão do almoço implicado no surto, no próprio local de refeições, concluindo-se assim que a duração dos sintomas na população em estudo não foi superior a quarenta e oito horas.

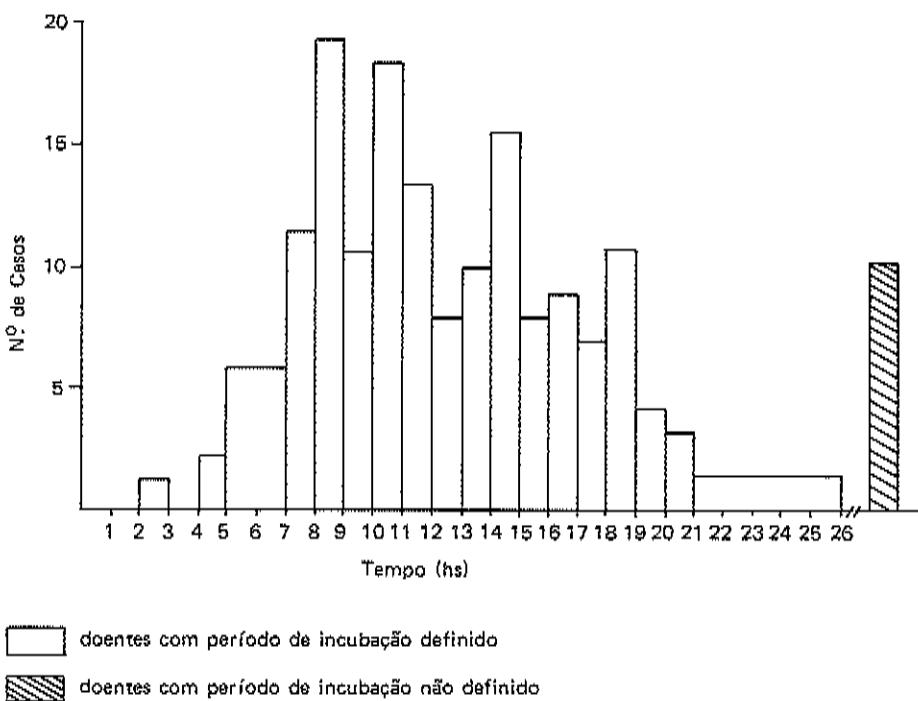
Colônias típicas de *C. perfringens* (pretas, com halo de lecitinase e dimensões menores que 2mm de diâmetro), foram observados em ágar SPS. As reações bioquímicas confirmaram a presença do microrganismo. Não houve desenvolvimento de colônias nas pla-

**Tabela 1** — Distribuição da freqüência dos sintomas em 182 pessoas doentes consideradas na sua apresentação real, como sintomas únicos ou combinados

	Sintomas							
	Únicos				Combinados			
	D	V	N	DA	N-D	N-V-D	V-D	DA-D
Número de casos	153	1	1	0	16	4	3	3
Porcentagem %	84	0,5	0,5	0	8,8	2,2	1,6	1,6

D — diarréia; N — náusea; V — vômito; DA — dores abdominais.

**Figura 1** — Distribuição de 182 pessoas com sintomas de toxi-infecção alimentar, segundo o período de incubação



cas de ágar neomicina incubadas em aerobiose, pelo que se conclui que havia ausência de *B. cereus* nas fezes.

A relação do número de *C. perfringens* por grama de fezes, no surto em estudo, em outro surto ocorrido em Campinas em 1975 e numa população normal é mostrada na Tabela 3, observando-se que o número de microrganismos por grama de fezes é maior no surto em estudo do que na população normal e similar ao do outro surto de Campinas.

Os alimentos provavelmente implicados na toxio-infecção foram carne à Lessa e maionese de batata. A diferença entre as taxas de ataque para as pessoas que comeram e não comeram esses alimentos foi de 18,1% e 64% respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 — Taxas de ataque relativas aos diferentes alimentos servidos

Alimentos servidos	Pessoas que comeram um alimento específico				Pessoas que não comeram um alimento específico				Diferença entre as taxas
	Doente	Não Doente	Total	Taxa de ataque %	Doente	Não Doente	Total	Taxa de ataque %	
Carne à "Lessa"	161	36	197	81,7	21	12	33	63,6	+ 18,1
Maionese de batata	179	39	218	82,0	2	9	11	18,0	+ 64,0
Feijão	171	48	220	77,7	11	0	11	100,0	- 22,3
Arroz	179	47	226	79,2	10	1	11	90,9	- 11,7
Couve refogada	106	34	140	75,7	76	12	88	86,3	- 10,6

## Discussão

Com base nos resultados obtidos através da pesquisa epidemiológica, *Clostridium perfringens* ou *Bacillus cereus* foram considerados os microrganismos provavelmente envolvidos no surto. A ocorrência das porcentagens de diarréia e a mediana do período de incubação do surto em estudo está de acordo com os dados apresentados em outras publicações (4, 6).

A contagem elevada de *C. perfringens* em fezes ocorre não só quando há toxio-infecção por este microrganismo mas também quando é provocada por outros microrganismos.

Devido a que a presença de *B. cereus* não é constante, tanto nas fezes normais como após toxio-infecção pelo microrganismo (6), a ausência de *B. cereus* nas fezes não elimina a possibilidade de que esteja implicado no surto. Por outro lado a quantidade de *C. perfringens* encontrada, se bem acima do valor médio em fezes normais (Tabela 3) não é um dado suficientemente conclusivo para a afirmação que *C. perfringens* foi o microrganismo responsável. Portanto, desde que não foi possível realizar a análise dos alimentos, a dúvida permanece a respeito de qual dos dois microrganismos esteve implicado.

Se a maionese foi a causa da toxio-infecção, o provável agente seria *B. cereus*, pois este alimento não reune boas condições de anaerobiose para o crescimento de *C. perfringens*, nem a batata é um bom meio de multiplicação deste microrganismo. No entanto, se o alimento causador foi a carne, o provável agente seria *C. perfringens* dada as boas condições que existem nesse produto para o desenvolvimento de microrganismos anaeróbios.

Tabela 3 — Contagem de *Clostridium perfringens* por grama de fezes de pessoas atingidas no surto em estudo e num surto anterior ocorrido em Campinas\* e em uma população normal de Belo Horizonte\*

Nº de microrganismos por grama de fezes	Surto em estudo %	Surto anterior ocorrido em Campinas %	População normal de Belo Horizonte %
< 10 <sup>4</sup>	0	0	29
10 <sup>4</sup> – 10 <sup>5</sup>	9	18,0	25
10 <sup>5</sup> – 10 <sup>6</sup>	54	45,5	31
> 10 <sup>6</sup>	36	36,3	15

\* Referência 4.

Através de perguntas à pessoa responsável pela cozinha, averigüou-se que a maionese fora preparada com batatas cozidas de véspera, deixadas a esfriar a temperatura am-

biente. No dia seguinte, as batatas foram cortadas e adicionadas de ovo cozido desfeito, óleo, sal e pimenta. A carne foi cozida de véspera, e no dia seguinte, cortada e condimentada com vinagre, pimenta, sal, óleo e tomate.

É interessante notar que os dois restaurantes, embora da mesma instituição, tinham cozinhas separadas, mas usaram o mesmo processo de preparo dos alimentos e em ambos se apresentaram os casos de toxí-infecção descritos.

Se bem que não se possa afirmar com segurança qual o alimento causador do surto, nem qual o microrganismo, parece clara a necessidade do estudo e divulgação deste caso em que há notória falta de técnica culinária apoiada em princípios higiênicos. A deficiente preparação repetiu-se em duas cozinhas e as conseqüências foram sofridas por centenas de pessoas da mesma comunidade.

## Referências Bibliográficas

1. Angelotti, E.; Hall, H.E.; Foter, M.J. & Lewis, K.H. — Quantitation of *Clostridium perfringens* in foods. *Appl. Microb.*, 10:193-199, 1962.
2. Jeffman, I. — Aspectos bacteriológicos relacionados com o anaeróbio responsável pelo surto de botulismo em Porto Alegre (1958). *Revista da Escola de Agronomia e Veterinária*, 3:37-44, 1960.
3. Serrano, A.M. — Uma toxí-infecção alimentar por *Clostridium perfringens*. *Atualidades Veterinárias*, 28:36-39, 1976.
4. Serrano, A.M. — Incidência de *Clostridium perfringens* em alimentos, um surto de intoxicação e evidenciação da prova de lectinase. *Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia*, 1976. (Tese de Doutoramento).
5. Silva, G.R.; Silva, I. & Guimarães, C.C. — An outbreak of food poisoning due to *Salmonella typhimurium* in a general hospital. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 6:258-267, 1964.
6. U.S. Department of Health, Education, and Welfare. Public Health Service. Center for Disease Control — Guide for investigating food-borne disease out-breaks and analyzing surveillance data. Atlanta, Georgia, 1972.

## Ocorrência de bolores e leveduras em sucos de laranja ao natural

Sirdeia M.P. Furlanetto

Claudete R. Paula

Walderez Gambale

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

& Dírcio do Nascimento

*Dept.<sup>o</sup> de Tecnologia Química e de Alimentos, Centro de Tecnologia UFPB  
58000 João Pessoa PB, Brasil*

### Resumo

Quantificação e identificação de bolores e leveduras que constituem a microbiota aeróbia do suco de laranja ao natural oferecido ao consumo público. Das cem amostras analisadas, todas apresentaram números superiores a  $10^2$  por ml de suco, mostrando-se com níveis de bolores e leveduras acima do máximo permitido pelos padrões fixados pela Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo, Brasil. Os gêneros *Penicillium*, *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Torulopsis*, *Candida*, *Rhodotorula* e *Saccharomyces* foram os mais freqüentemente isolados, enquanto que os gêneros *Phoma*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Pichia* e *Kloeckera* também foram identificados, porém com menor freqüência.

### Summary

*Occurrence of molds and yeasts in natural orange juices*

Quantification and identification of fungi which are part of the aerobic microbiota of the natural orange juice offered to the public consumption. A hundred samples were analysed and all of them presented numbers superior to  $10^2$  fungi per ml of juice, showing that levels of molds and yeasts are above the maximum allowed by the standard fixed by the Health Secretariate of São Paulo, Brazil. The genera *Penicillium*, *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Torulopsis*, *Candida*, *Rhodotorula* and *Saccharomyces* were the most frequently isolated, whereas the genera *Phoma*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Pichia* and *Kloeckera* where also identified, but with less frequency.

### Introdução

Alguns cuidados rigorosos devem ser tomados no sentido de preservar sucos de frutas que, pela sua própria natureza, são facilmente perecíveis. No caso particular dos sucos de frutas naturais, as alterações químicas, enzimáticas e microbianas podem provocar modificações de odor, sabor e consistência, principalmente se forem mantidos a temperaturas superiores a  $5^{\circ}\text{C}$ .

Segundo Carr (3), os sucos de frutas são na sua maioria suficientemente ácidos a ponto de inibir o crescimento bacteriano, porém bactérias acéticas aeróbicas, bactérias lácticas microaerófilas, além de algumas espécies do gênero *Zymomonas*, por serem ácido-tolerantes, podem causar modificações na aparência, aroma e consistência dos mesmos.

As alterações microbianas que ocorrem em sucos de frutas naturais, expostos à temperatura ambiente, são normalmente fermentações alcoólicas ocasionadas por leveduras seguidas de oxidações do álcool e de ácidos da fruta por leveduras formadoras de película e por bolores, que crescem na superfície dos sucos. A presença de bactérias acéticas pode ocasionar a produção de ácido acético pela oxidação do álcool formado e com isto, segundo Ingram & Luthi (8), acidificar o produto.

De acordo com Recca & Mrak (11), nos sucos cítricos o alto grau de acidez, bem como a quantidade de açúcares, propiciam fundamentalmente o desenvolvimento de bolores e leveduras, que são os microrganismos que mais se adaptam a esses substratos.

Estudos realizados por Brannon & Pollit (2) demonstram a presença de leveduras altamente fermentativas em sucos de laranja e toranja.

Ingram (6) refere-se a estudos realizados em concentrados cítricos deteriorados, nos quais foram isolados dois tipos de leveduras, uma cor de rosa com características de *Rhodotorula* e outra osmofílica pertencente ao gênero *Zigosaccharomyces*. Posteriormente, o mesmo autor verificou que a cultura osmofílica pertencente ao gênero *Zigosaccharomyces* tinha a propriedade de fermentar suco de laranja contendo até 70% de açúcar, cujo pH era da ordem de 3,0 (7).

No que concerne aos concentrados cítricos, ainda segundo Ingram (6) as leveduras, uma vez presentes, mantêm-se viáveis até que as condições se tornem favoráveis ao seu desenvolvimento, o qual provocará a alteração do produto.

Nos estudos sobre sucos cítricos, freqüentemente são referidas as alterações provocadas por fungos, porém não são relatados os valores relativos à contagem de bolores e leveduras, assim como os gêneros ou espécies mais freqüentes.

Dante do exposto, planejou-se a contagem e identificação de bolores e leveduras existentes em sucos de laranja ao natural.

## **Material e Métodos**

Foram colhidas 100 amostras de suco de laranja ao natural em 10 lanchonetes e restaurantes da Cidade Universitária Armando de Salles Oliveira, da USP. Em cada estabelecimento foram colhidas, em ocasiões diferentes, 10 amostras de suco de laranja.

Eram coletados 150 a 200ml de suco em frascos estéreis de 450ml, os quais a seguir eram tampados e transportados ao laboratório em caixa de material isotérmico (Isopor). No laboratório, as amostras eram homogeneizadas e, em seguida, diluídas de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  utilizando-se como diluente água tamponada fosfatada esterilizada e com pH 7,2 (12).

A partir destas diluições eram realizadas as determinações quantitativas de bolores e leveduras, empregando-se o ágar glicose batata acidificado. As placas eram incubadas à temperatura de 23°C realizando-se leituras após 5 dias, segundo método recomendado por Koburger (9).

Após a contagem, procedia-se a análise macroscópica e microscópica das colônias. Em seguida, de cada placa correspondente a cada uma das diluições, eram isoladas colônias de bolores e leveduras representativas dos diferentes tipos morfológicos, e estas eram posteriormente semeadas em tubos de ágar Sabouraud dextrose ou ágar malte, adicionados de 100 µg/ml de cloranfenicol, os quais eram a seguir incubados à temperatura de 23°C por até 5 dias. Após este período de incubação as cepas de bolores e leveduras isoladas eram identificadas segundo as técnicas propostas por Arx & Lodder (1, 10).

## **Resultados e Discussão**

No Estado de São Paulo, com a aprovação das Normas Técnicas Especiais Relativas a Alimentos e Bebidas (4), foram estabelecidos vários padrões microbiológicos para ali-

**Tabela 1 — Distribuição das 100 amostras examinadas de suco de laranja ao natural segundo o número de bolores e leveduras**

Número de bolores e leveduras/ml	Nº de amostras
0 — 10	0
10 — 10 <sup>2</sup>	0
10 <sup>2</sup> — 10 <sup>3</sup>	2
10 <sup>3</sup> — 10 <sup>4</sup>	7
10 <sup>4</sup> — 10 <sup>5</sup>	28
10 <sup>5</sup> — 10 <sup>6</sup>	45
10 <sup>6</sup> — 10 <sup>7</sup>	17
10 <sup>7</sup> —	1
Total	100

**Tabela 2 — Freqüência com que diferentes gêneros de bolores foram isolados e identificados em cem amostras de suco de laranja ao natural**

Gênero	Freqüência
<i>Penicillium</i>	15
<i>Geotrichum</i>	14
<i>Aspergillus</i>	10
<i>Aureobasidium</i>	10
<i>Cladosporium</i>	3
<i>Phoma</i>	3
<i>Rhizopus</i>	2
<i>Mucor</i>	1

mentos. No que concerne aos sucos integrais de frutas, dentre as especificações existentes, tolera-se a presença de no máximo 10<sup>2</sup> bolores e leveduras por ml de suco ao natural.

Comparando-se os resultados obtidos (Tabela 1) com o referido padrão, verifica-se que as cem amostras analisadas mostraram-se com contagens desses microrganismos superiores ao máximo permitido. Pode-se observar, também, que 45% das amostras apresentaram-se com números de bolores e leveduras compreendidas entre 10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup> por ml de suco, valores estes que podem ser considerados elevados.

Nas Tabelas 2 e 3 encontram-se as freqüências com que diferentes gêneros de bolores e leveduras foram isolados a partir das amostras de suco analisadas.

Quanto aos bolores, de acordo com a Tabela 2, os gêneros mais freqüentemente isolados foram o *Penicillium*, *Geotrichum*, *Aureobasidium* e *Aspergillus*.

Segundo Ingram & Luthi (8), grande variedade de gêneros de bolores pode ser encontrada em sucos cítricos, e mais comumente o *Penicillium*, *Aspergillus* e *Mucor*. Como se pode verificar (Tabela 2), os resultados obtidos no presente estudo coincidem com a assertiva desse autor, uma vez que, embora em pequena proporção, o gênero *Mucor* também se mostrou presente. Entretanto, estes resultados discordam dos obtidos por Weber (13), Faucett & Klotz (5), que evidenciaram com freqüência a presença de bolores do gênero *Nematospora*, que por sua vez não foi encontrado por Recca & Mrak (11) em sucos cítricos.

Dentre as leveduras identificadas, as dos gêneros *Torulopsis*, *Candida* e *Rhodotorula* apresentaram-se com maior freqüência (Tabela 3), sendo que os gêneros *Saccharomyces*, *Pichia* e *Kloeckera* também foram identificados, porém com menor freqüência. Cumpre salientar segundo Recca & Mrak (11), que as leveduras ascospóridas pertencentes aos gêneros *Saccharomyces* e *Pichia*, podem ser encontradas em sucos simples e concentrados de laranja onde, havendo condições para a sua multiplicação, formam película na superfície. Segundo Lodder (10), o gênero *Torulopsis*, o qual se mostrou altamente presente neste estudo, é responsável pela fermentação alcoólica de vários açúcares, como a glicose e a sacarose, normalmente encontrados em sucos de frutas, podendo perfeitamente vir a provocar uma fermentação desses carboidratos, ocasionando assim deterioração do produto.

## Conclusões

Na contagem de bolores e leveduras realizada em ágar batata acidificado, as cem amostras analisadas revelaram-se com números superiores ao tolerado pela legislação vigente no Estado de São Paulo, ou seja, 10<sup>2</sup>/ml.

As contagens de bolores e leveduras foram elevadas, sendo os valores obtidos mais freqüentemente compreendidos entre  $10^6$  e  $10^6$ /ml de suco.

Das cepas isoladas, foram identificados bolores pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Phoma*, *Rhizopus* e *Mucor*, sendo os quatro primeiros os mais freqüentes.

Das cepas isoladas, foram identificadas leveduras pertencentes aos gêneros *Torulopsis*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Pichia* e *Kloeckera*, sendo os três primeiros os mais freqüentes.

**Tabela 3 — Freqüência com que diferentes gêneros de leveduras foram isolados e identificados em cem amostras de suco de laranja ao natural**

Gênero	Freqüência
<i>Torulopsis</i>	34
<i>Candida</i>	22
<i>Rhodotorula</i>	16
<i>Saccharomyces</i>	5
<i>Pichia</i>	2
<i>Kloeckera</i>	2

## Referências Bibliográficas

1. Arx, J. Von — *Fungi sporulating in pure culture*. J. Cramer, 1970.
2. Brannon, J.M. & Pollit, R.J. — Presence of yeasts in fruit juices that are sold for beverages. Milk. Dealer., 35:35-39, 1935.
3. Carr, J.C. — The Bacteriology of fruit juices. Rev. Microbiol., 6:18-26, 1975.
4. Decreto nº 12.486, de 20 de outubro de 1978 — Aprova Normas Técnicas especiais Relativas a Alimentos e Bebidas. In: — Código Sanitário. São Paulo, Secretaria de Estado da Saúde, p. 143-345, 1979.
5. Faucett, H.S. & Klotz, L.J. — Diseases and their control in the citrus industry. Vol. II. In: — Batchelor, L.D. & Webber, H.J. — The citrus industry. Berkeley, University of California Press, p. 495-596, 1948.
6. Ingram, M. — Fermentation in concentrated orange juice. Food Manuf., 24:77-81, 1949.
7. Ingram, M. — Osmophilic yeasts from concentrated orange juice. J. gen. Microbiol., 4:ix, 1950.
8. Ingram, M. & Luthi, H. — Microbiology of fruit juices. In: — Tressler, D.K. & Joslyn, M.A. — Fruit and vegetables juice. Westport, Conn. Avi Publishing, p. 117-163, 1961.
9. Koburger, J.A. — Yeasts and molds. In: — American Public Health Association — Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington D.C., p. 225-228, 1976.
10. Loddèr, J. — The yeasts. 2. ed. Amsterdam, North Holland, 1970.
11. Recca, J. & Mrak, E.M. — Yeasts occurring in citrus products. Food Technol., 6:450-454, 1952.
12. Thatcher, F.S. & Clark, D.S. — Análisis microbiológico de los alimentos. Zaragoza, Ed. Acribia, 1973.
13. Webber, G.F. — Occurrence and pathogenicity of *Nematospora* spp. in Florida. Phytopathology, 23:384-388, 1933.

# Instability of the protease (gelatinase) trait in *Proteus mirabilis*. I — A study of newly isolated strains

Sérgio Olavo Pinto da Costa

Dept.<sup>o</sup> de Biologia, Instituto de Biociências USP, Caixa Postal 11461  
01000 São Paulo SP, Brasil

Maria Christina Bonato

Laboratório de Genética, Universidade Federal da Paraíba, Campus Universitário  
58000 João Pessoa PB, Brasil

& Marisa Bianco

Instituto de Química USP, Caixa Postal 20780  
01000 São Paulo SP, Brasil

## Summary

Some newly obtained cultures of *Proteus mirabilis* display the ability to excrete protease as a stable character, where all or most individuals excrete protease ( $P^+$  colonies). However, some cultures excrete protease as an unstable character, i.e. a large number of individuals in the population do not excrete the enzyme ( $P^-$ ). Thus, it is possible to postulate the existence of stable and unstable *P. mirabilis* strains in terms of protease excretion. The same does not occur with other proteolytic bacterial strains, such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *B. megatherium*, *B. cereus* and *Staphylococcus aureus*. This instability has not been observed with respect to other biochemical features found in *P. mirabilis*, such as urea synthesis and hydrogen sulfide production. The occurrence of  $P^-$  cells in unstable population of *P. mirabilis* may be greatly increased by the prolonged cultivation in either nutrient agar or nutrient broth medium and through successive transferring in nutrient broth. Some  $P^+$  colonies newly isolated from unstable strains may have  $P^-$  cells in their populations.  $P^+$  colonies, isolated from stable strains and stored for several months, may show some degree of instability; however,  $P^+$  colonies, isolated under the same conditions from unstable strains, show greater instability. However,  $P^+$  individuals endowed with great stability may be found in both stable and unstable strains.

## Resumo

*Instabilidade do caráter protease (gelatinase) em Proteus mirabilis. I — Estudo de estípnes recém isoladas*

O estudo de indivíduos isolados revela que algumas culturas de *Proteus mirabilis*, recentemente obtidas, apresentam a condição de excretar protease como um caráter estável, onde todos os indivíduos, ou sua grande maioria, excretam protease (colônias  $P^+$ ). Algumas culturas, no entanto, excretam esta enzima como um caráter instável, ou seja, um número grande de indivíduos destas populações não excreta a enzima ( $P^-$ ). Assim, pode-se postular a existência de linhagens de *P. mirabilis* estáveis e instáveis quanto à excreção de protease. O mesmo não acontece com outras espécies bacterianas que apresentam, igualmente, atividade proteolítica, tais como *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megatherium*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*. Tal instabilidade não foi observada em relação a algumas características bioquímicas ligadas a *P. mirabilis*, tais como síntese de urease e produção de sulfeto de hidrogênio. A ocorrência de células  $P^-$  em populações instáveis de

*P. mirabilis* pode ser grandemente aumentada pelo cultivo prolongado em meio nutritivo sólido ou líquido e através de subcultivos sucessivos em caldo nutritivo. Algumas colônias P<sup>+</sup>, recentemente isoladas de linhagens instáveis, podem apresentar células P<sup>-</sup> em suas populações. Colônias P<sup>+</sup>, isoladas de linhagens estáveis e estocadas por vários meses, podem mostrar algum grau de instabilidade, contudo, colônias P<sup>+</sup>, isoladas sob as mesmas condições de linhagens instáveis mostrou maior instabilidade. Além do mais, indivíduos P<sup>+</sup> dotados de grande estabilidade podem ser encontrados tanto em linhagens estáveis como instáveis.

## Introduction

The *Proteus* group consists of facultatively aerobic Gram-negative and motile bacilli. They are widespread in nature, ordinarily saprophytic, and forming an important part of the flora which decomposes organic matter of animal and plant origin. The bacilli occur in all kinds of environments such as land, water and sewers, and in the saprophytic phase of its existence can cause, in certain situations, pathological disorders in animals including man.

One of the biochemical characteristics of *P. mirabilis* is production of gelatinase, a proteolytic exoenzyme acting on the polypeptide bonds of gelatin. Since gelatinase has been shown to be effective also in degrading other proteins, such as casein and albumin, it will be designated here as protease (4).

A crater-shaped liquefaction is generally visible 24 hours after inoculation into gelatin medium when newly isolated strains are used. According to Topley & col. (9), some strains maintained for some time in the laboratory liquefy gelatin more slowly, with weeks needed for the process to be completed, or, in some cases, completely lose this ability.

In addition, we found that some recent clonal isolates of *P. mirabilis* from clinical material give populations which are heterogenous in terms of protease excretion. The objective of the present study was to characterize this instability of the protease trait in different *P. mirabilis* populations.

## Material and Methods

**Bacterial strains** — The bacterial strains used in this study and their more relevant properties are given in Table 1. The symbols used for bacterial genotype and phenotype follow the recommendations of Demerec & col. (2). The *P. mirabilis* strains of the L series reached our laboratory immediately after isolation. The remaining ones have been stored in our laboratory or in the original laboratory for prolonged periods of time. The protease-excreting strains are represented by P<sup>+</sup> and the non-excreting strains by P<sup>-</sup>.

**Culture media** — The composition of the culture media used is given in grams per liter of distilled water. NA — Bacto-Nutrient Agar; NB — Bacto-Nutrient Broth; NG — Bacto-Blood Agar Base, with 7.5g Bacto-Gelatin and 10g Bacto-Agar added; MU — Cook's medium, modified (1): Bacto-Peptone, 1g; sodium chloride, 5g; potassium monophosphate, 0,8g; sodium disulfate, 1,2g; 0,2% red phenol solution, 6ml; Bacto-Agar, 20g; pH 6,8. MS — medium used to determine hydrogen sulfide production: Bacto-Tryptone, 10g; Bacto-Beef Extract, 2g; sodium chloride, 5g; Bacto-Dextrose, 1g; Bacto-Agar, 20g. **Index solution** — Ammonium ferric citrate, 2g; sodium thiosulfate, 2g; distilled water, 85ml. One liter of medium was sterilised and 30ml of the sterile index solution was added and the mixture distributed into dishes (30ml per dish).

**Occurrence of P<sup>-</sup> colonies in *Proteus mirabilis* strains obtained from clinical material** — Each strain was cultured in NB overnight at 37°C, after which the culture was convenien-

Table 1 — Bacterial strains studied in the presente investigation

Strains	Characteristics	Origin
N-2 to N-17	Isolated from human clinical material (unstable)	N.P. de Souza <sup>a</sup>
S-3 and S-4	Isolated from human clinical material (unstable)	N.P. de Souza <sup>a</sup>
N-17-1 to N-17-24	Originated from colony N-17-p <sup>+</sup>	This paper
N-17-C	Originated from colony N-17 (unstable)	This paper
N-17-8-13	Originated from colony N-17-8-p <sup>+</sup> (stable)	This paper
N-17-9-13	Originated from colony N-17-9 (unstable)	This paper
N-17-I to N-17-VIII	Originated from colonies N-17-p <sup>-</sup>	This paper
N-17 Gm	Originated from N-17 (unstable)	This paper
N-17-G-2-Na-P-	Originated from N-17 (unstable)	This paper
L-1 to L-168	Isolated from human clinical material (stable and stable)	G.V.A. Pessoa <sup>b</sup>
L-22	p <sup>+</sup> stable population	This paper
L-70	p <sup>+</sup> stable population	This paper
L-79	p <sup>+</sup> unstable population	This paper
L-84	p <sup>+</sup> unstable population	This paper
L-88	p <sup>+</sup> unstable population	This paper
L-124	p <sup>+</sup> unstable population	This paper
L-68 m	Unstable population	This paper
BM-1 to BM-10	Isolated from human clinical material (stable and unstable)	C.E.O.P. Campos <sup>c</sup>
AT-26 to AT-38	Isolated from human clinical material (stable and unstable)	E. Penido <sup>d</sup>
<i>Ps. aeruginosa</i>	1 Isolated from human clinical material	G.V.A. Pessoa <sup>b</sup>
	31 Isolated from human clinical material	G.V.A. Pessoa <sup>b</sup>
	33 Isolated from human clinical material	G.V.A. Pessoa <sup>b</sup>
	42 Isolated from human clinical material	G.V.A. Pessoa <sup>b</sup>
	51 Isolated from human clinical material	G.V.A. Pessoa <sup>b</sup>
	52 Isolated from human clinical material	G.V.A. Pessoa <sup>b</sup>
	56 Isolated from human clinical material	G.V.A. Pessoa <sup>b</sup>
	1851 Isolated from human clinical material	G.V.A. Pessoa <sup>b</sup>
	1864 Isolated from human clinical material	G.V.A. Pessoa <sup>b</sup>
	1877 Isolated from human clinical material	G.V.A. Pessoa <sup>b</sup>
<i>Ps. aeruginosa</i>	1946 Isolated from human clinical material	G.V.A. Pessoa <sup>b</sup>
	1957 Isolated from human clinical material	G.V.A. Pessoa <sup>b</sup>
	1967 Isolated from human clinical material	G.V.A. Pessoa <sup>b</sup>
	2014 Isolated from human clinical material	G.V.A. Pessoa <sup>b</sup>
	18 Wild type	G.V.A. Pessoa <sup>b</sup>
	19 trp thy	L.P. Archer <sup>e</sup>
	26 his	L.P. Archer <sup>e</sup>
	27, trp, his	L.P. Archer <sup>e</sup>
	F1 Wild type	W. Colli <sup>f</sup>
	W23 Wild type	F. Alterthum <sup>g</sup> S. Greer <sup>h</sup>
<i>B. subtilis</i>		

**Table 1 — Bacterial strains studied in the presente investigation (continued)**

Strains	Characteristics	Origin
<i>B. megatherium</i>	F. Wild type	F. Alterthum <sup>a</sup>
	F1 Wild type	F. Alterthum <sup>a</sup>
	F2 Wild type	F. Alterthum <sup>a</sup>
	1A Wild type	This laboratory
<i>B. cereus</i>	F 91 Wild type	F. Alterthum <sup>a</sup>
	1 Wild type	This laboratory
	2 Wild type	This laboratory
	3 Wild type	This laboratory
<i>S. aureus</i>	3A6 Wild type	J. Siqueira Jr <sup>b</sup>
	3A10 Wild type	J. Siqueira Jr <sup>b</sup>
	3A45 Wild type	J. Siqueira Jr <sup>b</sup>
	131336 Wild type	R.W. Lacey <sup>c</sup>
	196E Wild type	J.N. Baldwin <sup>d</sup>
	PCL Wild type	J.N. Baldwin <sup>d</sup>
	4 Wild type	N.P. de Souza <sup>e</sup>

*a.* Laboratory of the Santa Casa de Curitiba, (Brazil); *b.* Laboratory of Bacteriology, Adolfo Lutz Institute, (Brazil); *c.* Faculty of Medical Sciences of Botucatu (UNESP); *d.* Institute of Microbiology (UFRJ), (Brazil); *e.* Gulbenkian Science Institute (Portugal); *f.* Institute of Chemistry (USP); *g.* Institute of Chemistry (USP), (Brazil); *h.* University of Miami (USA); *i.* School of Agronomy "Luiz de Queiroz" (USP), (Brazil); *j.* King's Lynn General Hospital (England); *k.* University of Georgia (USA).

tly diluted with 0.15M saline solution, and 0.1ml aliquots were spread on the surface of several plates containing NG medium in order to detect protease excreting and non-excreting ( $P^+$  and  $P^-$ ) colonies by the gelatin hydrolysis test.

*Gelatin hydrolysis test in culture medium (Frazier (3), modified) —* Bacteria grown in NB overnight at 37°C were plated onto NG to produce isolated colonies. After overnight incubation at 37°C, the protease-excreting colonies ( $P^+$ ) were detected by covering the medium surface with a saturated solution of ammonium sulfate (May & Baker, Ltd.) for 20 to 30 minutes. The colonies surrounded by a transparent halo indicate activity of the enzyme on the gelatin contained in the medium.

*Hydrogen sulfide production —* The bacteria were planted onto freshly prepared MS so as to give no more than 50 well distributed colonies per plate.

*Urease synthesis —* Colonies grown in NA-containing plates were transferred by replica plating (7) onto MU medium. After a growth of 6-8 hours, the colonies were covered with filter paper previously soaked in a 40% urea solution and dried at 37°C. The urease activity of the colony is demonstrated by the appearance of a red coloring on the filter paper.

*Occurrence of  $P^-$  cells in newly isolated  $P^+$  colonies of *P. mirabilis* —* Two strains (N-17 and N-17-1) were selected which normally display high frequencies of  $P^-$  cells, and two others consisting almost exclusively of  $P^+$  cells (N-17-11 and N-17-12). Ten  $P^+$  colonies from each strain were individually seeded in tubes containing NB medium and incubated for 12-18 hours at 37°C. The preparations were then diluted and inoculated into plates containing NG medium and allowed to develop for 18-20 hours at 37°C. The differential count of  $P^+$  and  $P^-$  cells was made with the aid of the gelatin hydrolysis test in NG medium.

*Effect of prolonged permanence of *Proteus mirabilis* strains in liquid nutrient medium on the occurrence of  $P^-$  cells —* Screw-on cap tubes containing 5.0ml NB medium were seeded with *P. mirabilis* strains and the frequencies of  $P^-$  colonies were determined. The

culture tubes were maintained at 37°C for 21 days. The frequency of P<sup>-</sup> cells was determined weekly by the technique of gelatin hydrolysis in NG medium.

*Effect of prolonged storage of *Proteus mirabilis* strains in slanted nutrient agar on the occurrence of P<sup>-</sup> cells* — Strains were stored in screw-on cap tubes containing slanted NA medium at room temperature. The frequency of P<sup>-</sup> colonies was determined at zero time, i.e. at the time of the initial inoculation and on four subsequent occasions while the culture remained in storage, by the technique of gelatin hydrolysis in NG medium.

*Effect of repeated subculture in liquid nutrient medium on the occurrence of P<sup>-</sup> colonies in *P. mirabilis* strains* — Tubes containing 2.0ml NB medium were used for successive culturing overnight at 37°C. The number of P<sup>-</sup> colonies was determined at the beginning of the experiment (zero time). Subcultures were carried out daily by transference of the culture contents to fresh nutrient medium with the aid of a wire loop. This culture was consecutively incubated at 37°C for 24 hours, and subsequently transferred for 150 times. The counts of protease-producing or non-producing colonies were made by the technique of gelatin hydrolysis in NG medium.

## Results

We have analysed individual colonies derived from 177 *Proteus mirabilis* strains isolated from human clinical material of different sources and have found that several populations show heterogeneity in terms of the ability of colonies to excrete protease (Table 2). On the other hand, such high-level instability does not appear to occur in several other bacteria strains also endowed with proteolytic activity: *Pseudomonas aeruginosa* (fourteen), *Bacillus subtilis* (seven), *Bacillus megatherium* (three), *Bacillus cereus* (five), and *Staphylococcus aureus* (seven). In this study it was tested from 400 to 4,000 colonies.

Table 2 — Occurrence of non-protease-excreting (P<sup>-</sup>) colonies of *Proteus mirabilis* obtained from clinical material

Strains <sup>a</sup>	n. <sup>b</sup> of origin	Tested colonies	P <sup>-</sup> colonies
L-1	1,454	655	2
L-40	1,912	602	0
L-80	3,699	320	44
L-120	15-P	3636	1949
L-160	221-PD	659	89
N-10	—	255	134
N-12	—	707	203
N-14	—	291	52
N-16	—	186	6
N-17	—	2098	369
Bm-1	32	1000	40
Bm-3	105	600	3
Bm-5	143	770	1
Bm-7	189	1800	0
Bm-9	310	2200	0
AT-26	2396-KS2	400	2
AT-28	2380-S1	3100	70
AT-30	AN-20	2000	0
AT-32	21435	7000	0
AT-35	2197-1	1950	5

<sup>a</sup>, Strains listed in Table 1. Strains N-10 to N-17 have been stored in the laboratory for 8 years. Only 20 of the 177 samples studied are given in this Table.

A second class of *P. mirabilis* were also observed in which protease excretion seems to be a stable trait. Although the number of analyzed cells was not always sufficiently large, a population was designated as stable when it showed no P<sup>-</sup> cells. Some strains were later studied in more detail and definitely considered to be stable, and therefore included in some of the following experiments.

We have also determined the stability of two other biochemical properties, hydrogen sulfide and urease production, in eight *P. mirabilis* strains in which protease excretion is either a stable or an unstable trait. From each strain we have tested an amount of colonies ranging from 240 to 2,070. All of these strains get stable in their ability to produce hydrogen sulfide and urease. We conclude that the genetic information involved in these latter two biochemical processes is stable.

We have examined the stability of protease excretion in ten clonal isolates from each of two stable strains (N-17-11 and N-17-12) and two unstable strains (N-17 and N-17-1)

**Table 3 — Occurrence of P<sup>-</sup> cells in newly isolated P<sup>+</sup> colonies of *Proteus mirabilis***

Strains	colony n. <sup>o</sup>	Tested colonies	P <sup>-</sup> col.
N-17	1	142	0
	2	145	1
	3	145	2
	4	95	0
	5	122	0
	6	158	0
	7	148	0
	8	253	140
	9	151	1
	10	166	0
N-17-1	1	304	2
	2	303	0
	3	712	2
	4	868	0
	5	824	0
	6	963	0
	7	798	0
	8	413	12
	9	166	0
	10	500	0
N-17-11	1	159	0
	2	259	0
	3	185	0
	4	223	1
	5	170	0
	6	131	0
	7	192	0
	8	173	0
	9	179	0
	10	209	0
N-17-12	1	738	0
	2	910	0
	3	321	0
	4	701	0
	5	820	0
	6	333	0
	7	475	0
	8	638	0
	9	400	0
	10	930	0

Strains N-17 and N-17-1 are unstable in terms of protease synthesis. Strains N-17-11 and N-17-12 are stable (Table 1).

(see Table 3). The two unstable strains seem to segregate both cells in which protease excretion is a stable trait and cells in which it is an unstable trait. The progeny of the stable strains N-17-11 and N-17-12 remain P<sup>+</sup>. The stability of the P<sup>+</sup> trait in N-17-11 and N-17-12 is also observed following prolonged storage (Fig. 1), whereas there is considerable conversion of the unstable strains N-17-9-13 and N-17-C into protease negative strains under these conditions.

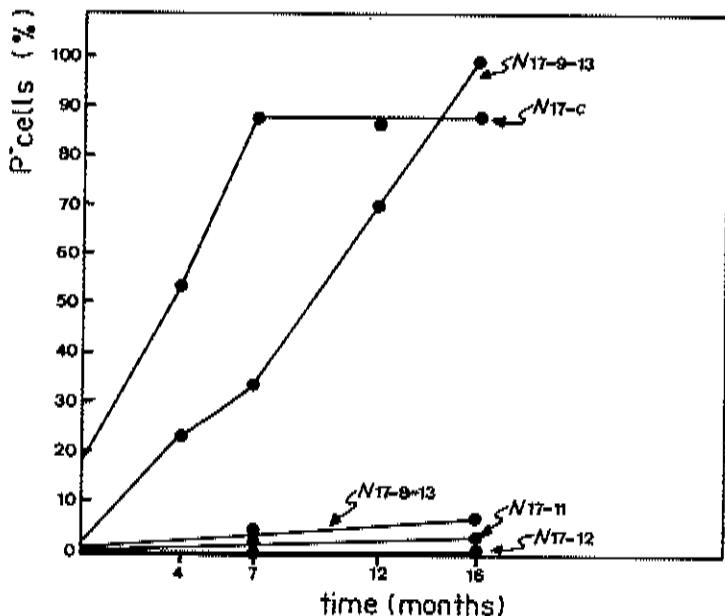
Prolonged storage of P<sup>+</sup> colonies isolated from stable and unstable cultures shows that although most P<sup>+</sup> cells exhibit the instability trait in terms of protease excretion

**Table 4** --- Occurrence of P<sup>-</sup> cells in P<sup>+</sup> colonies from stable and unstable *Proteus mirabilis* strains stored over a long period of time

Strains	Culture n°	Storage time (months)			
		6		12	
		Tested colonies	P <sup>-</sup> colonies	Tested colonies	P <sup>-</sup> colonies
L-22	1	854	2	794	0
	2	1040	7	888	1
	3	775	0	481	1
	4	617	0	838	0
	5	770	8	649	0
	6	743	0	801	2
	7	1024	12	631	2
	8	577	0	680	0
	9	572	0	200	0
	10	1146	26	520	5
L-70	1	659	0	245	0
	2	463	0	319	0
	3	366	0	304	0
	4	318	11	82	5
	5	355	0	350	0
	6	349	0	480	0
	7	246	0	225	0
	8	416	0	610	0
	9	444	0	337	0
	10	458	0	376	0
L-79	1	524	12	687	9
	2	823	501	452	339
	3	877	877	1521	1521
	4	814	0	515	1
	5	1387	3	1100	6
	6	877	0	378	0
	7	558	252	421	315
	8	658	0	774	0
	9	974	0	465	0
	10	385	33	875	43
N-17	1	1312	2	920	6
	5	314	4	420	6
	9	498	6	411	9
	10	768	199	800	300
	11	456	14	717	9
	12	402	0	1646	0
	14	984	414	1791	310
	17	426	54	450	60
	19	582	0	637	0
	21	457	38	719	50
	24	1223	1154	1049	1007

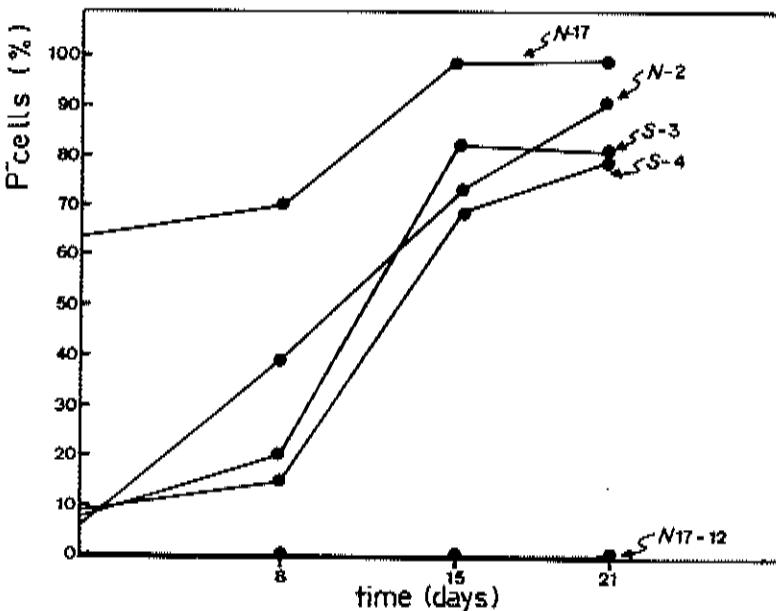
Strains L-22 and L-70 are stable, and L-79 and N-17 are unstable in terms of the protease trait (Table 1).

Figure 1 — Effect of prolonged storage of unstable cultures in slanted solid nutrient medium on the occurrence of P<sup>-</sup> cells



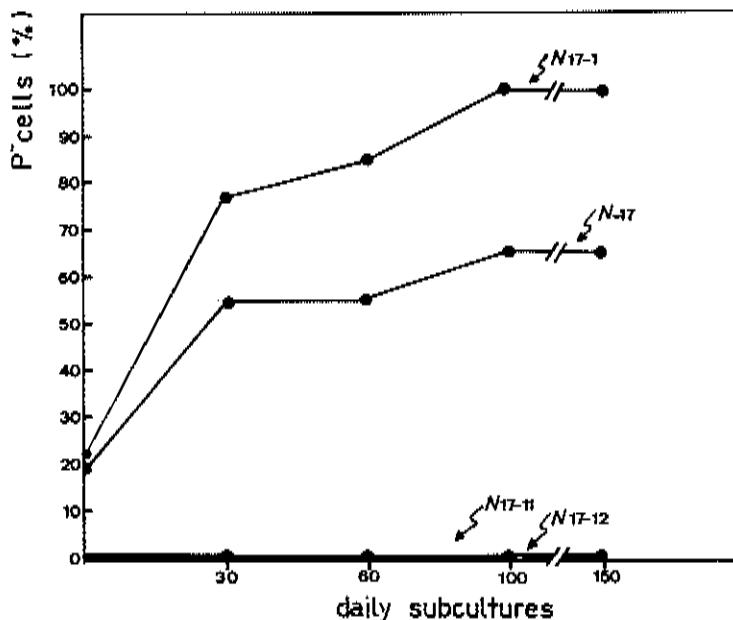
Strains N-17-9-13 and N-17-C are unstable, and strains N-17-8-13, N-17-11 and N-17-12 are stable in terms of the protease trait (Table 1).

Figure 2 — Effect of prolonged permanence of the cultures in liquid nutrient medium on the occurrence of P<sup>-</sup> cells in *Proteus mirabilis* strains



Strains N-17, N-2, S-3 and S-4 are unstable, and strain N-17-12 is stable in terms of the protease trait (Table 1).

**Figure 3 — Effect of repeated subcultures in liquid nutrient medium on the occurrence of P<sup>+</sup> colonies in *Proteus mirabilis* strains**



Strains N-17-1 and N-17 are unstable, and strains N-17-11 and N-17-12 are stable in terms of the protease trait (Table 1).

(Table 4), some of these P<sup>+</sup> colonies seem to behave in a very stable manner. Colony number 12 of sample N-17 (N-17-12) for example, shows continue stability following 24 months of storage. Further studies carried out during these last eight years corroborate this fact.

The instability of protease production can also be seen when strains N-17, N-2, S-3 and S-4 are cultivated in nutrient broth (NB) for 21 days (Fig. 2) or for the cases of strains N-17 and N-17-1 by making daily subcultures (Fig. 3). Strains N-17-11 and N-17-12 remained perfectly stable under these growth conditions.

## Discussion

When the incidence of P<sup>-</sup> individuals in *P. mirabilis* strains isolated from human clinical material from different hospitals is analyzed, populations are found which are heterogeneous in terms of protease excretion. Some strains have few or no P<sup>-</sup> (stable) individuals, while some populations are composed of a very large number of individuals which do not excrete the enzyme (unstable). Although the unstable samples display a high incidence of P<sup>-</sup> individuals, this fact does not prevent these strains, taken as a whole, from giving a positive, though slow, reaction to the gelatin-liquefying. This slow reaction or even the rare occurrence of a negative gelatinase test must have been one of the reasons why the instability phenomenon did not awake interest on the part of microbiologists. Another factor may have been ignorance about the important correlation between instability and extrachromosomal inheritance, which only recently was emphasized.

This phenomenon does not seem to occur with other proteolytic bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *B. megatherium*, *B. cereus* and *Staphylococ-*

*cus aureus*. Two other biochemical characteristics of *P. mirabilis*, hydrogen sulfide production and urease synthesis, have also been shown to be stable, even when some protease-unstable strains were tested.

The genetic information responsible for H<sub>2</sub>S production by *E. coli* is encoded by a plasmid (5, 6, 8). These investigators found spontaneous segregation of H<sub>2</sub>S-negative cells in several *E. coli* strains. Cook (1) observed both spontaneous instability and induced instability by the action of curagenic drugs for urease synthesis in *Streptococcus faecium*, and considered these data to be evidence for plasmidial inheritance.

The instability of the protease trait becomes more evident when the presence of P<sup>-</sup> cells is investigated in P<sup>+</sup> colonies of unstable *P. mirabilis* samples. In one of the P<sup>+</sup> colonies of the unstable strains N-17, more than half the individuals were shown to have lost the ability to excrete protease.

Storage in nutrient agar for several months of strains derived from unstable *P. mirabilis* samples led to a considerable increase in the number of P<sup>-</sup> individuals, thus showing a possible participation of the environment in this conversion. The segregation of variants which are negative for a given genetic trait upon prolonged storage suggests the possibility of plasmidial inheritance (5, 8). However, instability due to prolonged storage does not occur in strains derived from stable samples suggesting that this genetic information can be integrated into the chromosome.

When the number of P<sup>+</sup> and P<sup>-</sup> cells was determined not in samples, as a whole, sent by the original clinical laboratories, but rather in newly started cultures obtained from a single P<sup>+</sup> colony, a greater incidence of stable individuals was observed. This fact raises the possibility that not all P<sup>+</sup> cells are potentially unstable. Indeed, when ten P<sup>+</sup> colonies from several samples which had shown both stability and instability were stored for a prolonged period of time, it was possible to verify that the ability to produce protease was a stable trait in some of the *P. mirabilis* strains, with all or most individuals synthesizing the enzyme, while in other samples protease production was unstable, with many individuals unstable to excrete the enzyme. It should be pointed out, however, that, even in these unstable strains, some colonies were found in which the trait became stably inherited.

When P<sup>+</sup> colonies of an unstable sample are analyzed a variable degree of instability is noted, with some P<sup>+</sup> colonies showing high instability by producing many P<sup>-</sup> individuals, while others reach intermediate instability levels, and still others maintain high levels of stability. When P<sup>+</sup> individuals originating from a stable sample are then analyzed, the degree of instability among these P<sup>+</sup> colonies is much lower. On the other hand, some *P. mirabilis* samples are so unstable with respect to the protease trait that, when it is desired to maintain them in the laboratory for several years in the presence of P<sup>+</sup> individuals, periodical selections in favor of P<sup>+</sup> colonies are needed. It so happens, however, that this practice may lead some of these cultures to absolute stability. A good example is given by strains N-17-12, derived from a P<sup>+</sup> colony of the unstable sample N-17, which has been shown to be stable during a storage time of about 8 years.

## Acknowledgment

This research was carried out with the financial support of CNPq (project CNPq-FINEP N° 5728/75 and n° 2222.1405/77).

## References

- Cook, A.R. — The elimination of urease activity in *Streptococcus faecium* as evidence for plasmid-coded urease. *J. gen. Microbiol.*, 92:49-58, 1976.
- Demerec, M.; Adelberg, E.A.; Clark, A.J. & Hartman, P.E. — A proposal for uniform nomenclature in bacterial genetics. *Genetics*, 54:61-76, 1966.

3. Frazier, W.C. — A method for detection of changes in gelatin due to bacteria. *J. infect. Dis.*, 39:302-309, 1926.
4. Kelly, C.F. & Hite, K.E. — *Microbiology*. 2. ed. N. York, Appleton-Century-Crofts, 1955.
5. Lautrop, H.; Ørskov, I. & Gaarslev, K. — Hydrogen sulfide producing of an *Escherichia coli*. *Acta path. microbiol. scand.*, 79:641-650, 1971.
6. Layne, P.; Hu, A.S.L.; Balows, A. & Davis, B.R. — Extrachromosomal nature of hydrogen sulfide production in *Escherichia coli*. *J. Bact.*, 106:1024-1030, 1971.
7. Lederberg, J. & Lederberg, E.M. — Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J. Bact.*, 63:390-406, 1972.
8. Stoleru, G.H.; Gerbaud, G.R.; Bouanchaud, D.H. & Le Minor, L. — Étude d'un plasmid transferable déterminant la production d'H<sub>2</sub>S et la résistance à la tetracycline chez "Escherichia coli". *Ann. Inst. Pasteur*, 123:743-754, 1972.
9. Topley, W.W.C.; Wilson, G.S. & Miles, A.A. — *Bacteriología e inmunidad*. Barcelona, Salvat Editores, 1953.

**Instability of the protease (gelatinase) trait in *Proteus mirabilis*. II — Behavior of protease-excreting and non-excreting cells in the presence of gelatin**

Sérgio Olavo Pinto da Costa

Deptº de Biologia, Instituto de Biociências USP, Caixa Postal 11461  
01000 São Paulo SP, Brasil

Maria Christina Manhães Bonato

Laboratório de Genética, Universidade Federal da Paraíba, Campus Universitário  
58000 João Pessoa PB, Brasil

& Marisa Bianco

Instituto de Química USP, Caixa Postal 20780  
01000 São Paulo SP, Brasil

## Summary

Even though protease excreting ( $P^+$ ) and non-excreting cells ( $P^-$ ) from a single *Proteus mirabilis* strain exhibit very similar generation times during a short culture period in nutrient broth and in nutrient broth with gelatin added, a larger conversion of  $P^+$  cells into  $P^-$  cells is observed when unstable *P. mirabilis* are repeatedly submitted to subcultures in gelatin-free nutrient broth.

## Resumo

*Instabilidade do caráter protease (gelatinase) em Proteus mirabilis. II — Comportamento de células excretoras e não excretoras de protease na presença de gelatina*

Apesar de células excretoras ( $P^+$ ) e não excretoras de protease ( $P^-$ ), obtidas de uma mesma estirpe de *Proteus mirabilis*, apresentarem tempos de geração muito próximos quando cultivadas em caldo nutritivo e em caldo nutritivo adicionado de gelatina, observa-se uma maior conversão de células  $P^+$  em  $P^-$  quando estirpes instáveis de *P. mirabilis* são repetidamente cultivadas em caldo nutritivo sem gelatina.

## Introduction

Analysis of several protease-excreting populations of *Proteus mirabilis* showed instability of the protease trait, characterized by the presence of a variable number of individuals which lost the ability to excrete protease. This instability could be demonstrated by prolonged sample storage, by prolonged culture in nutrient agar and broth, or by successive daily subcultures (1). Protease-excreting and non-excreting cells from the same population were also shown to behave differently when inoculated into mice, the former more effectively reducing the survival rate (2) of the animals.

The present study is an attempt to determine the differential behavior of protease-excreting and non-excreting cells cultured under different conditions in the presence of gelatin.

## Material and Methods

**Bacterial strains** — The bacterial strains used in this work and their most relevant properties are given in Table 1.

**Culture media** — The composition of the culture media used is given in grams per liter of distilled water. NA — Bacto-Nutrient Agar; NB — Bacto-Nutrient Broth; NBG — Bacto-Nutrient broth with Bacto-gelatin added, 5g; NG — Bacto-Blood Agar Base, with Bacto-gelatin added, 7.5g, and Bacto-agar, 10g.

**Test of gelatin hydrolysis in culture medium (Frazier, (3) modified** — Bacteria grown overnight in NB at 37°C were plated onto Petri dishes containing NG medium to produce isolates. After overnight incubation at 37°C, the presence of protease-excreting colonies ( $P^+$ ) was revealed by covering the medium surface with a saturated ammonium sulfate solution (May & Baker Ltd.) for 20 to 30 minutes. Colonies surrounded by a transparent halo indicate enzymatic activity on the gelatin in the medium.

**Effect of gelatin on the culture medium in the presence of  $P^-$  cells in *Proteus mirabilis* samples** — Different *P. mirabilis* samples were transferred from the stock to 2.0ml of NB medium and to 2.0ml of NBG medium and incubated overnight at 37°C. The number of  $P^-$  cells were determined for each sample in the different culture media (zero time), and daily subcultures were carried out for 50 consecutive days. Counts of protease-producing and non-producing colonies were carried out by the technique of protein precipitation in nutrient medium (NG) by the technique of gelatin hydrolysis.

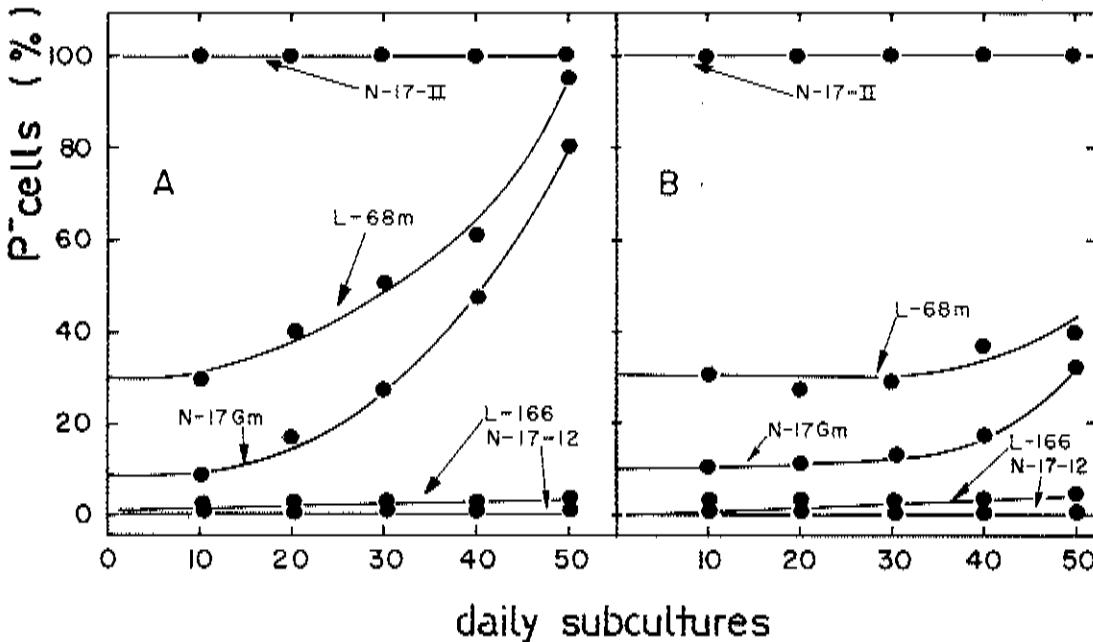
**Growth curve of  $P^+$  and  $P^-$  *Proteus mirabilis* cells in nutrient broth** — Cultures of the different strains, carried out in NB with 0.2% glucose added until half the logarithmic phase was reached, were inoculated into Moore flasks containing 50ml NB with glucose added (4) to determine O.D. 540nm (Coleman Jr., model 6A — 20) corresponding to approximately  $5.0 \times 10^5$  cells per ml. Aliquots were withdrawn to determine viability at zero time, and the two systems were shaken at 37°C (160 strokes/min). Samples were withdrawn at two-hour intervals during 10 hours of growth. Each sample was diluted according to the density of the culture at the time of sample withdrawal, plated onto dishes containing NG medium, and incubated for 18-20 hours at 37°C. A differential count of  $P^+$  and  $P^-$  cells was carried out by the method of gelatin hydrolysis in NG medium. Generation time was calculated according to Winkler & col. (5).

Table 1 — Bacterial strains studied in the present investigation

Strains	Characteristics	Origin
N-17	Isolated from clinical material (unstable)	N.P. de Souza <sup>a</sup>
N-17 Gm	Originated from colony N-17	This paper
N-17-II	Originated from colony N-17 P-	This paper
N-17-12 ( $P^+$ )	Originated from colony N-17 P+ (stable)	This paper
N-17-EB ( $P^-$ )	Originated from colony N-17 Gm "cured" with ethidium bromide	This paper
L-166	Isolated from human clinical material, P+ (stable)	G.V.A. Pessoa <sup>a,b</sup>

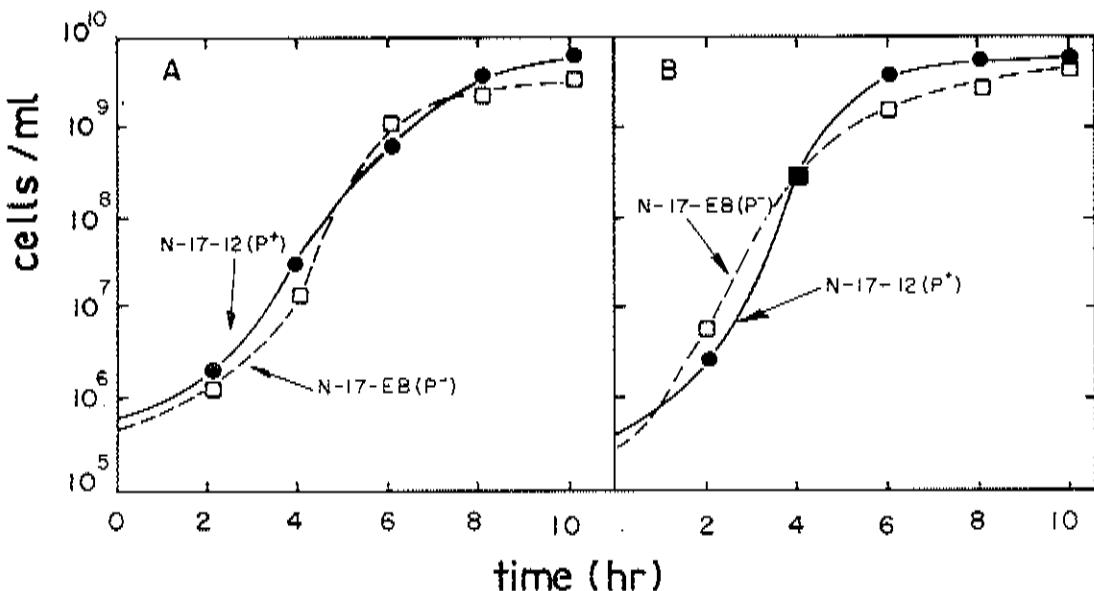
<sup>a</sup>. Laboratory of the Santa Casa de Curitiba, Pr.; <sup>b</sup>. Laboratory of Bacteriology, Adolfo Lutz Institute.

Figure 1 -- Effect of gelatin on the culture medium in the occurrence of P<sup>-</sup> cells in *Proteus mirabilis* samples



A study was made of the unstable strains L-68 and N-17Gm, and of strains N-17-II, N-17-12, and L-166, which represent P<sup>-</sup> and P<sup>+</sup> -irreversible populations, respectively. Curve A represents the frequency of P<sup>-</sup> cells in gelatin-free medium, and curve B, in medium with gelatin added.

Figure 2 — Growth curve of *Proteus mirabilis* P<sup>+</sup> and P<sup>-</sup> cells in nutrient broth with glucose added (A) and in nutrient broth with glucose and gelatin added (0.5%) (B)



The P<sup>+</sup> (N-17-12) and P<sup>-</sup> (N-17-EB) strains constitute different clones of the same population (N-17Gm) and their protease-linked traits are known to be stable. The generation times were close for both strains.

*Growth curve of P<sup>+</sup> and P<sup>-</sup> Proteus mirabilis cells in nutrient broth with gelatin added —* The procedure was similar to that described in the preceding section, except that the nutrient broth (NB) was replaced with NBG with glucose added.

## Results and Discussion

A fundamental difference occurs when unstable strains are submitted to successive daily cultures in NB medium and in NBG medium. Instability appears to be very marked in NB, but not in NBG (Figure 1A and 1B), even though no difference in behavior is noted between P<sup>+</sup> and P<sup>-</sup> cells in NB and NBG (Figure 2A and 2B). The generation times for both strains were very similar with each culture system (27 and 29 minutes).

Apparently selective environmental pressure occurs favoring differential P<sup>-</sup> growth in unstable strains, when these are repeatedly subcultured in the absence of gelatin. This fact, however, does not occur when the P<sup>+</sup> and P<sup>-</sup> cells are submitted to growth curve for a relatively short time. In view of this fact, we may ask what advantage protease confers to *P. mirabilis*. Costa & col. (2) determined that protease-excreting cells decrease the survival rate of intraperitoneally inoculated mice, when compared to non-protease excreting cells.

## Acknowledgment

This research was carried out with financial support from CNPq (project CNPq-FINEP 5728/75 and 2222.1405/77.

## References

1. Costa, S.O.P.; Bonato, M.C.M. & Bianco, M. — Instability of the protease (gelatinase) trait in *Proteus mirabilis* I — A study of newly isolated populations. Rev. Microbiol. (São Paulo), 13:35-45, 1982.
2. Costa, S.O.P.; Pessôa, G.V.A. & Irino, K. — Behavior of protease (gelatinase) — excreting and non-excreting cells from a single *Proteus mirabilis* strain when inoculated into mice. Rev. Microbiol. (São Paulo), 12:117-120, 1981.
3. Frazier, W.C. — A method for detection of changes in gelatin due to bacteria. J. Infect. Dis., 39:302-309, 1926.
4. Moore, W.B. — Separation, characteristics and minimal aminoacid requirements of six variants derived from a strain of *Bacillus cereus*. J. Gen. Microbiol., 40:329-342, 1965.
5. Winkler, V.; Rügel, W. & Wakernagel, W. — Bacteria, phage and molecular genetics. New York, Springer-Verlag, 1976.

## ***Yersinia enterocolitica* isolada de criança com diarréia crônica, em Botucatu SP**

**Regina Maria Santinho Tosoni Decarlis**

*Dept.<sup>o</sup> de Microbiologia e Imunologia, Instituto Básico de Biologia Médica e  
Agrícola, UNESP, Campus de Botucatu  
18600 Botucatu SP, Brasil*

**Deise Pasetto Falcão**

*Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP, Campus de Araraquara  
14800 Araraquara SP, Brasil*

**Helga Verena Leoni Maffei**

*Dept.<sup>o</sup> de Pediatria, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Campus de  
Botucatu  
18600 Botucatu SP, Brasil*

**& Celso Pavan**

*Dept.<sup>o</sup> de Microbiologia e Imunologia, Instituto Básico de Biologia Médica e  
Agrícola, UNESP*

### **Resumo**

Isolamento de amostra de *Yersinia enterocolitica* do sorotipo 03, de criança com diarréia crônica, em Botucatu, SP, onde anteriormente foram isoladas amostras do mesmo sorotipo, a partir de porcos e rato.

### **Summary**

*Yersinia enterocolitica isolated from a child with chronic diarrhoea, in Botucatu SP  
Brazil*

The isolation of *Yersinia enterocolitica* 03 from a 2 years old child with chronic diarrhoea is reported from Botucatu SP Brazil. The same serotype was previously isolated from pigs and a rat in the same region.

*Yersinia enterocolitica* tem sido reconhecida como causa de infecção no homem, associada aos mais variados quadros clínicos, sendo a gastroenterite em crianças a forma mais frequente. No Brasil, existem poucas referências sobre o isolamento desse microrganismo de material de origem humana. As primeiras amostras foram isoladas de animais: abscessos hepáticos de sagüis, em 1968 (Giorgi, W. & col., Arq. Inst. Biol., 36:123-127, 1969); fezes de rato, em 1971 (Decarlis, R.M.S.T. & col., Congresso Brasileiro de Microbiologia, II, São Paulo, 1970) e fezes de suínos, 1975 (dados não publicados). Os dois últimos estudos foram realizados em Botucatu, SP e o sorotipo de *Yersinia enterocolitica* era 03. Os casos humanos foram relatados por Piscolotto, A.C. & col. em 1975, em Araraquara, SP (In: -- International Symposium on *Yersinia*, 3<sup>rd</sup>, Montreal, 1977 — *Yersinia enterocolitica*: biology, epidemiology and pathology. Basel, Karger, 1979, p. 169-173), por Fontes, C.F. & col. em 1978, em São Paulo, (Rev. Microbiol., 9:167-168, 1978) e por Stumpf, M. & col. em 1978, no Rio de Janeiro (Rev.

Bras. de Pesquisas Med. e Biol., II: 383-384, 1978). Descrevemos, no presente relato, amostra isolada de fezes de uma criança de 2 anos e 8 meses, internada no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, S.P., com a seguinte história: surtos repetidos de diarréia desde os 6 dias de idade, às vezes com catarro e sangue e às vezes acompanhados de febre. Após tratar de verminose, os surtos espaçaram para 15 dias e, quando melhorava a diarréia, surgia "bronquite". Nos últimos meses apresentou, "hemorroidas" com sangue vivo e dor à evacuação; há 4 meses teve pneumonia e há 15 dias nova pneumonia.

O material foi previamente enriquecido em meio de Rappaport modificado (Wauters, G. — International Symposium on *Yersinia, Pasteurella and Francisella*, Malmö, Apr. 10-12, 1972. Proceedings, Basel, S. Kager, 1973, p. 68-70) e em tetratônato de Kauffmann e posteriormente semeado em Agar SS e Hektoen Enteric Agar, além de ser semeado diretamente em Agar SS e Agar MacConkey. Após incubação a 22°C e a 37°C por 48 horas, observou-se crescimento de colônias lactose negativas, diminutas, transparentes as quais foram a seguir semeadas em Triple Sugar Iron e posteriormente levadas à série bioquímica (Edwards, P.R. & Ewing, W.H. — Identification of Enterobacteriaceae. 3<sup>rd</sup> ed. Minneapolis, Burgess Publishing, 1972, 362 p.). Os resultados são apresentados na Tabela 1, revelando que a amostra apresenta as características bioquímicas de *Yersinia enterocolitica*. A confirmação foi feita através de caracterização

**Tabela 1 — Características bioquímicas da amostra de *Yersinia enterocolitica***

Teste ou substrato	Reação
H <sub>2</sub> S (TSI)	—
Indol	—
VM	+
VP	—
Citrato de Simmons	—
Urease	+
Motilidade — 28°C	+
Motilidade — 37°C	—
Fenilalanina desaminase	—
Lisina descarboxilase	—
Arginina dihidrolase	—
Ornitina descarboxilase	—
Glicose — ácido	+
Glicose — gás	—
Lactose	—
Sacarose	+
Cellobiose	+
Xilose	—
Arabinose	+
Treloose	+
Rafinose	—
Ramnose	—
Levulose	+
Galactose	+
Salicina	—
Malonato	—
Dulcitol	—
Adonitol	—
Inositol	—
Sorbitol	+
Glicerol	+
Manitol	+
Oxidase	—

Temperatura de incubação — 37°C; + reação positiva dentro de 1 a 2 dias; — reação negativa.

sorológica, concluindo-se que pertence ao sorotipo 03. O teste de aglutinação, em tubo com amostras de soro do paciente, colhidas ao momento do isolamento e dois meses após, revela que o primeiro soro apresentou título de 1:80, quando testado com antígeno de *Yersinia enterocolitica* 03. O segundo soro foi negativo. A prova de sensibilidade a antibióticos e quimioterápicos, pelo método de Kirby-Bauer (Bauer, A.W. & col., Amer. J. Clin. Path. Tech. Sect., 45:493-469, 1966) mostrou ser a amostra sensível à canamicina, neomicina, gentamicina, estreptomicina, polimixina B, colistina, cloranfenicol, tetraciclina, ácido nalidíxico, sisomicina, amicacina, moderadamente sensível à ampicilina e cefalotina e resistente à sulfadiazina. Após tratamento com staficilin e ampicilina, para a pneumonia, os sintomas de diarréia desapareceram. Os dados mostram a ocorrência de *Yersinia enterocolitica* na região de Botucatu. Não sabemos, no entanto, qual o papel da *Yersinia enterocolitica* no conjunto sintomatológico apresentado pela criança. Anteriormente, o mesmo sorotipo havia sido isolado de fezes de animais sendo que os suínos, sabidamente, constituem reservatório dessa bactéria (Hurvell, B. & col., International Symposium on *Yersinia*, 3<sup>rd</sup>, Montreal, 1977 — *Yersinia enterocolitica*: biology, epidemiology and pathology. Basel, Karger, 1979, p. 243-248).

# Comparative efficiency of trypticase soy agar Vancomycin and Levine's media for the isolation and identification of *Neisseria* on tongue and saliva

Flávio Zelante  
Cláudio Mendes de Campos  
Maria Regina Lorenzetti  
& Paulo Santos Cunha

Department of Microbiology and Immunology, Biomedical Science Institute,  
University of São Paulo, P.O. Box 4365  
01000 São Paulo SP, Brazil

## Summary

*N. sicca* was isolated from the oral cavity of ten volunteers, either on TSAV or on Levine's media. Other neisseriae were also detected, such as *N. flavescens* and *N. subflava* only in TSAV medium, although Levine's medium in one instance could detect *N. mucosa*. It seems that TSAV medium was more efficient for isolation of neisseria than Levine's medium. Through the methodology used in the present paper it was also observed that in the oral cavity, the tongue showed at least twice more neisseria than saliva.

## Resumo

Análise comparativa da eficiência entre dois meios de cultura para o isolamento e quantificação de espécies do gênero *Neisseria*, isoladas da língua e da saliva

Utilizando-se do meio T.S.A. adicionado de Vancomicina (TSAV) e do meio de Levine, são propostos padrões de coleta e manipulação das amostras colhidas da saliva e da língua, para o isolamento e quantificação de espécies do gênero *Neisseria*. O meio TSAV é o mais indicado, tendo *N. sicca* sido isolada em 10 dos casos estudados. De uma forma geral, a língua apresentou maior população de neisseria do que a saliva.

## Introduction

Microorganisms belonging to the genus *Neisseria* present in the oral cavity have aroused the interest of many workers (1, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18); however, the early observations did not allow to quantify those bacteria due to the lack of standardization conditions either in sample collecting, inoculum handling or culture conditions.

In 1967, Ritz (16) proposed Tryptone soy agar with Vancomycin (TSAV) for isolation of *Neisseria* microorganisms. Other workers (1) using the same media isolated and listed several *Neisseria* species, from tongue, cheek, dental plaque and gingival sulcus. Querido & Araujo (15) confirmed partially these results, just for isolation of *N. sicca* and *N. mucosa* but not for all species of *Neisseria*. They also verified that several *Neisseria*

species found in the oral cavity grew on Teagues's media. However Lorenzetti (11) in a comparative assay for the efficiency of Teague and Levine's media showed a 9.6% higher growth index when using the Levine's media.

In the present study, standard conditions were used to compare the efficiency of isolation and identification of *neisseria* on the tongue and saliva using Levine and TSAV media.

## Material and Methods

*Collection of sample* — The samples were collected from 10 volunteers showing good conditions of hygiene and oral health. They were not under antibiotic therapy, antiseptic use and wore no prosthetic or orthodontic apparatus.

The saliva was collected without mechanical or chemical stimulus, in sterile bottles and diluted afterwards to  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  and  $10^{-4}$  with sterile saline buffered solution (SBS) pH7.2.

The tongue material was collected as previously described by Campos (5). Initially all the surface of the organ was gently scrubbed with a sterile swab soaked in SBS to remove food residues and desquamated cells. Then, by using a 0.05ml capacity curette, the first, third and central tongue mucosa portions were scrapped backwards. The material obtained was immediately soaked in SBS to proceed further dilutions as mentioned for saliva.

From each dilution of saliva and tongue material double aliquots of 0.1ml were inoculate onto TSAV\* and Levine's\*\* plates and spread with Drigalsky handle. available number of colonies to be counted were selected. One of the TSAV plates was saved for the oxidase test. Since Levine's medium is not appropriate for this test, several colonies initially growing on it were transferred to TSAV medium to perform the test.

After bacterioscopic examination of the selected plates, material from 10 different colonies of gram negative cocci were transferred to TSAV slants and incubated for 48h at 37°C under normal atmosphere.

Later on, all the species were identified according to Bergey's Manual (3).

## Results

Table 1 shows the comparative efficiency of TSAV and Levine's media for isolation of *Neisseria* species from oral cavity. The TSAV medium yielded somewhat higher number of colonies than Levine's medium (nevertheless these two media are consistent that the number of *Neisseria* in oral cavity is at least twice as higher on the tongue than the saliva).

*Neisseria sicca* was isolated from the oral cavity of all volunteers examined, either in TSAV or Levine's media (Table 2). In contrast *N. flavescens* and *N. subflava* were detected only by TSAV medium, however only the Levine's medium detected the *N. mucosa* which was fail by TSAV medium.

## Discussion

Although several workers (2, 4, 7, 8, 9, 11, 12, 18) have studied the oral microbiotic composition, they went as far as to characterize the genus *Neisseria*, without

---

\* Tryptone Soy Agar — Code CM 131 — Oxoid Ltd; \*\* Eosin Methylene Blue Agar (Levine) — Code CM 69 — Oxoid Ltd; Vancomycin Code V 2002 — Sigma, Chemical Company.

**Table 1** — Average number of *Neisseria* genus colonies developed on TSAV and Levine media per ml of collected material

Culture medium	Saliva	Tongue
TSAV	$1.8 \times 10^5$	$4.2 \times 10^5$
Levine	$1.4 \times 10^5$	$3.5 \times 10^5$

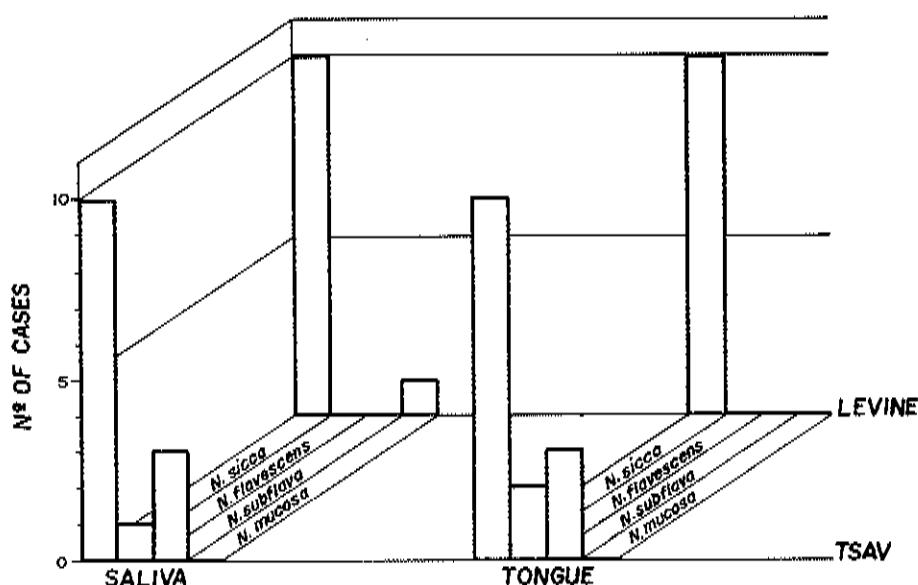
**Table 2** — Species from *Neisseria* genus developed on TSAV and Levine's media and isolated from material collected from tongue and saliva

Isolated microorganism	TSAV		Levine	
	saliva	tongue	saliva	tongue
<i>N. sicca</i>	10/10*	10/10	10/10	10/10
<i>N. flavescens</i>	1/10	2/10	—	—
<i>N. subflava</i>	3/10	3/10	—	—
<i>N. mucosa</i>	—	—	1/10	—

\* The denominator represents the number of individuals and numerator the number of carriers from the isolated species.

any careful study of the species and the preferential localization of the microorganisms. The present results showed that neisseria is more prevalent in the oral cavity on the tongue than in the saliva, although Burnett & col. (4) did not find any preferential mouth place for localization of neisseria. The prevalence of neisseria on the tongue was confirmed in Levine and TSAV media, which is consistent with Almeida (1) data using TSAV medium, although his collecting and dilution techniques were different. The present results corroborate the data (4, 13, 14) that, among the neisseria, *N. sicca* is the prevalent specie either in the saliva or in the tongue being better detected in TSAV than in the Levine's medium.

**Figura 1** — Growing of species from *Neisseria* genus of TSAV and Levine's media, isolated from samples proceeded from saliva and tongue of 10 volunteers



Although Almeida (1) detected the occurrence of *N. sicca* and *N. subflava* in one case among 10 volunteers, it is difficult to compare his data with the present paper, because different collecting, quantification techniques, and also different culture media were used. This study showed that TSAV medium has better resolution than Levine's medium for isolation and identification of neisseria. Also TSAV medium was selective for *N. flavescens* and *N. subflava*. In contrast, Levine's medium was selective for *N. mucosa*. However with these two media it was possible to confirm that the preferential locus of neisseria is the tongue, may be because the tongue mucosa due to strong adherence allows a higher affinity for neisserias. This study also showed a quantitative relationship of *Neisseria* genus in the microflora of the tongue and the saliva.

## Acknowledgment

We wish to thank Prof. Dr. Wilson J. Yasaka for the revision of the manuscript.

## References

1. Almeida, D. — Ocorrência de *Veillonella* e *Neisseria* nos nichos da cavidade bucal humana. Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia UFRJ, 1976. (Tese de Mestrado).
2. Baumann, P.; Doudoroff, M.; Stainer, R.Y. — Study of the *Moraxella* group. I — Genus *Moraxella* and *Neisseria catarrhalis* group. J. Bact., 95:58-73, 1968.
3. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8. ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1974.
4. Burnett, G.W.; Scherp, H.W.; Schuster, G.S. — Oral microbiology & infectious disease. 4. ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1976.
5. Campos, C.M. — Contribuição ao estudo da microbiota bucal humana: ocorrência de enterobactérias na saliva, língua e placa dental. São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 1977. (Tese de Doutoramento).
6. Frobisher, M. — Fundamentals of microbiology. 7. ed. Philadelphia, Saunders, p. 201, 1962.
7. Gibbons, R.J.; Socransky, S.S.; Araujo, W.C.; van Houte, J. — Studies of the predominant cultivable microbiota of dental plaque. Arch. oral Biol., 9:365-370, 1964.
8. Gordon Jr., D.F. & Gibbons, R.J. — Studies of the predominant cultivable microorganism from the human tongue. Arch. oral Biol., 11:627-632, 1966.
9. Hemmens, E.S.; Blayney, J.R.; Bradel, S.F.; Harrison, R.W. — The microbial flora of dental plaque in relation to the beginning of caries. J. dent. Res., 25:195-205, 1946.
10. Liljemark, W.F. & Gibbons, R.J. — Ability of *Veillonella* and *Neisseria* species to attach to oral surfaces and their proportions present indigenously. Infect. Immun., 4:264-268, 1971.
11. Lorenzetti, M.R. — Isolamento e caracterização de espécies do gênero *Neisseria* isolados dos diversos nichos da cavidade bucal. In: — Congresso Universitário Brasileiro de Odontologia, 2º, São Paulo, 1977.
12. McCarthy, C.M.; Snyder, M.L.; Parker, R.B. — The indigenous oral flora of man. I — The newborn to the one year old infant. Arch. oral Biol., 10:61-70, 1965.
13. Morris, E.O. — The bacteriology of the oral cavity. IV — a) *Micrococcus*, b) *Neisseria*, c) *Veillonella*. Brit. dent. J., 96:259-265, 1954.
14. Pike, E.B.; Free, J.N.; Davis, G.N.; Bisset, K.A. — The taxonomy of *Micrococcii* and *Neisseriae* of oral origin. Arch. oral Biol., 7:715-726, 1962.
15. Querido, N.B.G. & Araújo, W.C. — Selective isolation of *Neisseria sicca* from the human oral cavity on eosin Methylene Blue Agar. Appl. Environ. Microbiol., 31:612-614, 1976.
16. Ritz, M.L. — Microbial population shifts in developing human dental plaque. Arch. oral Biol., 12:1561-1568, 1967.
17. Ritz, M.L. — Fluorescent antibody staining of *Neisseria*, *Streptococcus* and *Veillonella* in frozen sections of human dental plaque. Arch. oral Biol., 14:1073-1083, 1969.
18. Socransky, S.S. & Manganiello, S.D. — The oral microbiota of man from birth to senility. J. Periodont., 42:485-496, 1971.

## Host range specificity of two groups of soil-isolated *Bacillus* phages

Jan Dirk van Elsas

Mônica Teresa Prantera Reis Rodrigues Pereira  
& Elisa Gastão da Cunha Penido

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

### Summary

Ninety five strains of *Bacillus* and 10 of *Staphylococcus aureus* were tested for their susceptibility to 14 newly isolated phages of *B. subtilis* and 16 of *B. pumilus*. All *S. aureus* strains and 65 of the *Bacillus* strains were resistant to attack by any of the phages. Among the reference strains, only strains of *B. subtilis* and *B. pumilus* were lysed by phages of either of both hosts. Identification of the newly isolated phage susceptible strains showed that all belonged to the species *B. subtilis* and *B. pumilus*. All *subtilis* phages were species specific, however most *pumilus* phages lysed strains of both species, which confirms the taxonomic relatedness of these species.

### Resumo

*Espectro de especificidade de hospedeiros de dois grupos de fagos de Bacillus do solo*  
Foram testadas 95 estirpes de *Bacillus* e 10 de *Staphylococcus aureus* quanto à sensibilidade face a 14 fagos recém isolados de *B. subtilis* e 16 de *B. pumilus*. Todas as estirpes de *S. aureus* e 65 de *Bacillus* mostraram-se resistentes à lise por quaisquer dos fagos de *Bacillus*. Entre as estirpes de referência, apenas aquelas de *B. subtilis* e de *B. pumilus* foram lisadas por fagos de ambos os hospedeiros. As estírpes sensíveis recentemente isoladas foram identificadas como *B. subtilis* e *B. pumilus*. Todos os fagos de *B. subtilis* eram espécies específicos; no entanto, a maioria dos fagos de *B. pumilus* lisava ambas as espécies. Tais dados confirmam a proximidade taxonômica destas espécies.

### Introduction

An important characteristic of any newly isolated phage is its host range, indicating to what extent the phage may mediate gene transfer by transduction (17). As early as in 1926, d'Hérelle found that a wide diversity exists in host ranges: some phages lyse only a single species in a given bacterial genus, while others attack several strains distributed among different species or even belonging to different genera (2). The latter was the case for a phage capable of lysing several *Shigella* species, several *Escherichia coli* strains and some strains of *Salmonella paratyphi* B (2). In addition, a *Pasteurella pestis* phage also lysed, aside from its host strain, some *Salmonella* and *Shigella* species (12).

In the genus *Bacillus*, the picture has been different in that often more restricted host ranges have been found. Of 244 *Bacillus* strains, anthracis phage W lysed only 2 strains of *B. cereus* apart from the sensitive anthracis strains (14), and thermophilic phage TP-84 attacked only 3 of 24 strains of *B. stearothermophilus* (21). Moreover, of 56 strains

representing 11 different *Bacillus* species, only *B. polymyxa* strains were lysed by each one of 4 *polymyxa* phages (8). In contrast to this, 6 phages of the SP series lysed 6 out of 13 different *Bacillus* species (20). Also, extensive host ranges were recently reported for several new *pumilus* phages (17). The most "promiscuous" phage K<sub>13</sub> lysed 14 out of 25 strains distributed among 6 species. In addition this phage attacked 16 of 20 unidentified *Bacillus* strains randomly isolated from the same habitat. The hypothesis was thus raised, that phages can play an important role in large scale gene transfer in the soil ecosystem (17).

The purpose of our research has been to test this hypothesis by investigating the host ranges of 30 newly isolated phages of *B. subtilis* and *B. pumilus*. The initially obtained data on the host ranges of these phages may have been inconclusive because a low number of indicator strains was used. We thus extended our investigations to comprise 95 strains of 11 different *Bacillus* species and 10 strains of *Staphylococcus aureus*. The results presented here will be set in relation to data from identification tests of phage sensitive strains to infer the extent of the genospecies in *Bacillus* determined by these phages.

## Material and Methods

*Media* — Tryptone-Yeast extract (TY): Difco tryptone, 10g; Difco yeast extract, 5g; NaCl, 10g; distilled water, 1l; pH 7.2. For TY agar (TYA) 1.75% of Difco agar was added. For soft TY agar 0.875% of agar was added. To enhance phage adsorption the media were supplemented with  $2.5 \times 10^{-3}$ M CaCl<sub>2</sub> and  $10^{-5}$ M MnCl<sub>2</sub> (TYS). Thiamin-Biotin agar (TBA): as described earlier (13). This medium was used for the isolation of *Bacillus* nitrogen fixers, and yielded the strains FP, Fo<sub>6</sub>, S<sub>2</sub> and S<sub>6</sub>.

*Bacterial strains* — The used reference stock strains and 17 own isolates that were described earlier (7) are listed in Table 1. Other *Bacillus* strains (Table 2) were isolated by pasteurization from different habitats: 25 strains with prefix F were isolated from garden soil collected at Fundão Island, Rio de Janeiro. The 2 strains coded S were obtained from Seropédica soil, an agricultural soil in the State of Rio de Janeiro (15). The strain with prefix Fo was isolated from Tijuca tropical rain forest, Rio de Janeiro. The 27 strains with prefix SW were obtained from polluted estuarine water collected from Guanabara Bay, Rio de Janeiro. Finally, the *Staphylococcus aureus* strains were isolated from clinical sources in Rio de Janeiro (Table 1).

*Identification of new bacterial isolates* — The strains were identified up to species level by methods described earlier (11, 12).

*Bacteriophages* — The used phages and their grouping are listed in Tables 3 and 4. Phage code names indicate the soil they were isolated from and their host (FS, is the first subtilis phage isolated from Fundão Soil). Twenty F phages were obtained from Fundão soil. Furthermore, phage SP<sub>1</sub> was isolated from Seropédica, EP<sub>1</sub> from Ecologia, IS<sub>1</sub> and IP<sub>1</sub> from Itaguaí, and GS<sub>1</sub> and GP<sub>1</sub> from Guandú soils. These agricultural soils are described elsewhere (15). Finally, FoS<sub>1</sub>, FoS<sub>2</sub> and FoP<sub>1</sub> were obtained from Tijuca Forest and CS<sub>1</sub> from Cerrado Soil. The properties and classification of the phages were described earlier (6, \*).

*Determination of phage susceptibility* — The phages were tested against all available bacteria by spot tests using serial 10-fold dilutions of crude phage suspensions. Droplets

\* Elsas, J.D. van & Penido, E.G.C. — Isolation and characterization of *Bacillus pumilus* phages from Brazilian soil. Z. Bakt. II Abt., 1981. (in press).

of each dilution were spotted on lawns of young bacterial cells seeded on TYA plates. The plates were incubated overnight at 37 or 28°C, after which they were scored. Dubious cases were controlled by comparing to a control of TY medium, or to a phage suspension which had been heated at 100°C for 5 min, or by plating for individual plaque formation according to Adams' double agar layer method (2).

*Preservation of phages* — The phages were stored by using methods described earlier (6).

**Table 1** — Reference strains and own isolates of *Bacillus* and *Staphylococcus aureus* used in host range experiments

Species	Strains
<i>B. subtilis</i>	LMD 47.15 (NRS 231) <sup>a</sup> ; LMD 48. 28 (var. aterrimus); LMD 69.2 (W23 Sm <sup>R</sup> ); LMD 69.3 (168 Wt); LMD 70.64 (Marburg); L <sup>b</sup> ; 9-IAUR-16 <sup>c</sup> ; SR22 sp <sup>-</sup> ; F <sub>6</sub> ; F <sub>7</sub> ; FB
<i>B. pumilus</i>	LMD 48.24 (ATCC 7061); LMD 68.28 (G6); AN; F <sub>8</sub> ; F <sub>10</sub>
<i>B. licheniformis</i>	LMD 50.16 (ATCC 14580); 2390
<i>B. megaterium</i>	LMD 33.11; LMD 48.20 (ATCC 8245); LMD 50.17 (ATCC 10778); LMD 68.3 (KM=NCIB 9521); LMD 75.16 (ATCC 14581); QM B1551 <sup>d</sup> ; L; F <sub>1</sub> ; F <sub>3</sub> ; F <sub>4</sub> ; FBJ 24A12
<i>B. cereus</i>	Cip A-25; F <sub>12</sub>
<i>B. firmus</i>	F <sub>2</sub> ; F <sub>9</sub> ; F <sub>13</sub>
<i>B. brevis</i>	F <sub>14</sub>
<i>B. coagulans</i>	F <sub>16</sub>
<i>B. badius</i>	F <sub>5</sub>
<i>B. lentus</i>	F <sub>11</sub>
<i>B. polymyxa</i>	LMD 24.16 (ATCC 842); L
<i>S. aureus</i> <sup>e</sup>	M 1907 P <sup>cR</sup> (52/80, I); 6219 P <sup>cR</sup> (29, II); 5845 (29, I); 3A45 Sm <sup>R</sup> Pc <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup> (52/52 A/80, II); M1774 (3C/71, II); 5450 (3A/3C/55/71, II); M 1881 Rp <sup>R</sup> (42 E, III); 196E (53/77/83A/84/85, III); 2285 (85; III); M 1988 (D <sub>11</sub> , -)

- a. The LMD strains were obtained from the collection of the Laboratory for Microbiology in Delft, Holland.
- b. The L strains were kindly supplied by Dr. M.W. Loutit, University of Otago, Dunedin, New Zealand.
- c. Strains 9-IAUR-16, SR22 sp<sup>-</sup>, AN, 2390 and Cip A-25 were received from Dr. L. Rabinovitch, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- d. The F strains were own (Fundão) soil isolates.
- e. Strain QM B1551 was a gift from dr. J.C. Vary, University of Illinois Medical Center, Chicago.
- f. The *S. aureus* strains come from clinical sources in Rio de Janeiro. Between brackets the phage type and the phage group are shown.

## Results

*Isolation and identification of new strains* — A total of 55 new strains were randomly picked from TYA or TBA plates prepared with pasteurized samples from the mentioned habitats (see Material and Methods). The strains were purified by repeated single-colony reisolations. After purification, 29 strains (both phage sensitive and resistant) were identified up to species level, while the remaining 26 phage resistant isolates were left unidentified. The results (Table 2) show that 13 of the isolates were *B. subtilis*, 5 were *B. pumilus* and 9 were *B. megaterium*. In addition, 1 strain was identified as *B. firmus* and 1 as *B. polymyxa*. All *subtilis* strains were typical for the species, with elongated, predominantly central spores, which did not distend the sporangium distinctly. Further, these produced acid, but no gas from glucose and showed a positive Voges-Proskauer test; produced acid from arabinose, xylose and mannitol; grew in 7% NaCl, at pH 5.7 and in Sabouraud dextrose broth; formed alkali on citrate-salts agar; reduced nitrate to nitrite; hydrolysed gelatin, casein and starch; did not grow anaerobically or at 65°C, and did not decompose

Table 2 — New own *Bacillus* isolates

Species	Strains <sup>a</sup>
<i>Bacillus subtilis</i>	FA <sub>6</sub> ; FER <sub>7</sub> ; FS; SWA; SW <sub>1</sub> ; SW <sub>9</sub> ; SW <sub>12</sub> ; SW <sub>17</sub> ; SW <sub>18</sub> ; SW <sub>21</sub> ; SW <sub>24</sub> ; SW <sub>25</sub> ; SW <sub>27</sub>
<i>B. pumilus</i>	FER <sub>3</sub> ; FB <sub>9</sub> ; FCR <sub>1</sub> ; FLR <sub>80</sub> ; SW <sub>20</sub>
<i>B. megaterium</i>	FER <sub>72</sub> ; FLR; FTR <sub>3</sub> ; SW <sub>4</sub> ; SW <sub>5</sub> ; SW <sub>14</sub> ; SW <sub>15</sub> ; S <sub>2</sub> ; S <sub>5</sub>
<i>B. firmus</i>	SW <sub>2</sub>
<i>B. polymyxa</i>	Fo <sub>8</sub>
Unidentified <i>Bacillus</i> sp.	FGE; FFL; FK; FL; FM; FN <sub>1</sub> ; FN <sub>2</sub> ; FER <sub>2</sub> ; FAR <sub>3</sub> ; FSR <sub>3</sub> ; FP; FER <sub>73</sub> ; FKR <sub>71</sub> ; FSR <sub>7</sub> ; FLR <sub>2</sub> ; SW <sub>3</sub> ; SW <sub>6</sub> ; SW <sub>7</sub> ; SW <sub>8</sub> ; SW <sub>10</sub> ; SW <sub>11</sub> ; SW <sub>13</sub> ; SW <sub>16</sub> ; SW <sub>23</sub> ; SW <sub>28</sub> ; SW <sub>29</sub>

a. See "Bacterial strains" in Material and Methods for meaning of the symbols.

Table 3 — Susceptibility to phages of *Bacillus subtilis* F<sub>6</sub>

Strain	Phage Group													
	FS <sub>1</sub> 1	FS <sub>2</sub> 1	FS <sub>3</sub> 1	FS <sub>5</sub> 1	FS <sub>8</sub> 1	FS <sub>9</sub> 1	CS <sub>1</sub> 1	FS <sub>4</sub> 2	FS <sub>6</sub> 2	FS <sub>7</sub> 3	FoS <sub>1</sub> 4	FoS <sub>2</sub> 5	IS <sub>1</sub> 6	GS <sub>1</sub> 7
<i>B. subtilis</i>														
F <sub>6</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FA <sub>6</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SW <sub>21</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SW <sub>24</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
SW <sub>27</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
SW <sub>12</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
SWA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
SW <sub>1</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	..	..	+	-
SW <sub>9</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	..	..	+	-
LMD 69.2	..	-	-	-	..	-	-	-	+	..	-	-	+	+
LMD 47.15	-	..	-	-	..	-	-	-	+	..	-	-	+	+
9-IAUR-16	..	-	-	..	-	-	-	-	-	+	..	-	+	+
SR22 sp <sup>b</sup>	-	-	..	-	-	..	-	-	-	-	+	..	-	-
F <sub>7</sub>	-	-	..	-	-	-	-	-	-	+	..	..	+	+
SW <sub>18</sub>	-	-	-	-	-	..	-	-	-	..	-	-	+	-

Only sensitive strains are shown; + : plaque formation observed; - : no plaque formation observed.

tyrosine. However, 4 strains differed from this description in that they did not form acid from arabinose (SW<sub>21</sub> and SW<sub>25</sub>) or xylose (FER<sub>7</sub> and SW<sub>27</sub>). All *B. pumilus* isolates were genuine pumilus strains (9, 10). They were distinguished from *B. subtilis* by their negative nitrate reduction and starch hydrolysis tests. The *B. megaterium* strains were distinguished from *B. subtilis* and *B. pumilus* mainly by the typical colony morphology, the negative Voges-Proskauer test and the inability to form acid from arabinose, xylose or mannitol. However, 2 strains (SW<sub>5</sub> and SW<sub>14</sub>) did not actively hydrolyse gelatin. Finally, the *B. firmus* and *B. polymyxa* isolates were typical representatives of these species, responding in all tests to standard descriptions (9, 10). When these new isolates were added to the available *Bacillus* strains (23 reference strains and 17 own isolates), a set of 95 strains, distributed among 11 species was obtained (Tables 1 and 2), which is an appropriate amount of strains to determine the extent of the host range of the new *Bacillus* phages (1). Further, 10 strains of another Gram-positive, *Staphylococcus aureus* were included.

**Phage susceptibility** — Since the presence of PBSX-type killer particles in the lysates may cause erroneous results in the used spot test, we used the dilution technique and only considered the results positive when single plaques were observed. To rigorously screen out any remaining false positive results, in many cases we plated the phages directly by Adams' double agar layer method (2) against the strains to be tested. The results (Tables 3 and 4) revealed the following: The 10 strains of *S. aureus* were resistant to all phages, as were 65 of the *Bacillus* strains distributed among 10 species. The remaining 30 phage sensitive strains belonged without exception to the species *B. subtilis* and *B. pumilus* (See: Identification of strains). All 14 subtilis phages characteristically lysed strains of *B. subtilis* only, but most of the phages of *B. pumilus* attacked strains of both species. Subtilis phage host F<sub>6</sub> was resistant to attack by all pumilus phages, as was pumilus phage host LMD 48.24 to lysis by the subtilis phages, suggesting that the 2 phage classes are distinct.

All 10 available strains of *B. pumilus* were lysed by several different pumilus phages, and the phages of group 1 lysed most or even all (FP<sub>6</sub>, IP<sub>1</sub>) of these strains. However, 8 of the 24 available strains of *B. subtilis* (LMD 48.24; LMD 69.3; LMD 70.64; FB; FER<sub>7</sub>; SW<sub>17</sub>; SW<sub>25</sub>; L) were resistant to all subtilis phages. Of these, strains LMD 69.3, LMD 70.64, FB and L also escaped lysis by the pumilus phages. Six strains of *B. subtilis* (LMD 47.15; LMD 69.2; 9-IAUR-16; F<sub>7</sub>; FS; SW<sub>18</sub>) were lysed by phages of both classes. Host ranges of the individual phage groups were markedly different. Among the pumilus phages the most restricted host ranges were observed for the phages FP<sub>2</sub> (3 of 34 pumilus and subtilis strains lysed), FP<sub>8</sub> and FP<sub>9</sub> (4/34) and FP<sub>7</sub> (4/34). Of the 16 phage isolates, only FoP<sub>1</sub> was strictly specific for *B. pumilus* strains. The pumilus phages of group 1 had wide host ranges; the most "promiscuous" phage FP<sub>6</sub> lysed 10 out of 24 strains of *B. subtilis* in addition to the 10 pumilus strains lysed. The most restricted host range among the subtilis

Table 4 — Susceptibility to phages of *Bacillus pumilus* LMD 48.24

Strain	Phage Group															
	FP <sub>1</sub> 1	FP <sub>3</sub> 1	FP <sub>6</sub> 1	FP <sub>6</sub> 1	IP <sub>1</sub> 1	SP <sub>1</sub> 1	FP <sub>2</sub> 2	FP <sub>4</sub> 2	FP <sub>8</sub> 3	FP <sub>9</sub> 3	FP <sub>7</sub> 4	FP <sub>10</sub> 5	GP <sub>1</sub> 6	EP <sub>1</sub> 7	FoP <sub>1</sub> 8	FP <sub>11</sub> 9
<i>B. pumilus</i>																
LMD 48.24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F <sub>10</sub>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FCR <sub>1</sub>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-
FER <sub>3</sub>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	...	...	+	+	+	+	-
FLR <sub>80</sub>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
SW <sub>20</sub>	+	+	+	+	+	+	-	-	...	...	-	+	+	-	-	-
AN	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	...	-	-	+	-	...
F <sub>8</sub>	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
FB <sub>9</sub>	-	+	-	+	+	+	-	...	...	-	-	-	+	+	+	-
LMD 68.28	+	+	+	+	+	+	-	-	...	...	+	-	-	-	+	-
<i>B. subtilis</i>																
LMD 69.2	+	+	+	+	+	+	...	+	-	-	+	+	...	-	-	+
LMD 47.15	+	+	+	+	+	+	-	+	...	-	+	+	...	...	-	+
LMD 48.28	+	+	+	+	+	+	-	+	...	...	...	...	...	...	-	-
9-IAUR-16	+	+	+	+	+	+	...	...	-	-	+	+	-	+	...	+
F <sub>7</sub>	+	+	+	+	-	+	+	+	...	-	-	-	-	-	...	...
FS	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	...	+	-	-	-	-
FER <sub>7</sub>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
SW <sub>17</sub>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	...	...	+	+	-	-
SW <sub>18</sub>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	...	...	-	-	-	-
SW <sub>25</sub>	+	+	+	+	+	+	...	...	-	-	-	-	-	...	...	-

Only sensitive strains shown; +: plaque formation observed; -: no plaque formation observed

phages was observed for phage FoS<sub>2</sub> (6 out of 24 strains of *B. subtilis* lysed), while phage IS<sub>1</sub> showed the most extensive host range (14 strains lysed).

Strains with equal phage sensitivity pattern (phage type) are taxonomically related (2). A classification of strains according to this principle shows the following groups: *B. subtilis* strains F<sub>6</sub>/FA<sub>6</sub>/SW<sub>21</sub>; SW<sub>24</sub>/SW<sub>27</sub>; LMD 47.15/LMD 69.2; FS/FER<sub>7</sub>, and *B. pumilus* strains LMD 48.24/F<sub>10</sub> and FLR<sub>80</sub>/SW<sub>20</sub>. All other strains had different phage sensitivity patterns and were not grouped.

The hypothesis was raised that phages have more extensive host ranges among strains isolated from the same ecological niche (17). A consideration of the sensitivity to some F phages among the 42 F strains (from the same collection site) and 27 SW strains (from a distinct habitat) results in the following observations: pumilus phage FP<sub>6</sub>, which attacked 21% of all *Bacillus* strains (20 out of 95 strains), lysed 21% of the total F strains (9 sensitives/42 strains) and 15% of the total SW strains (4/27). When only pumilus and subtilis strains are taken into account, 75% of the F strains (9/12), 36% of the SW strains (4/11) and 59% of the total strains (20/34) are phage sensitive. Subtilis phage FS<sub>6</sub> lysed 7.2% of the F strains (3/42), 37% of the SW strains (10/27) and 12.5% of total strains (12/95). However, the subtilis SW strains form a significantly higher number of the total SW strains (37%), as compared to the subtilis F strains (14% of total). Furthermore, none of the other F phages preferentially lysed F strains (Tables 3 and 4). These observations indicate no obvious difference in phage susceptibility between sets of strains isolated from different habitats.

## Discussion

In many reports, the amount of strains used to determine phage killing patterns is too limited (1, 17, 18). By using a large number of strains in this study, we clearly showed that the host ranges of our phages are restricted either to the host species (for the subtilis phages) or to the host species plus the related species *B. subtilis* (for the pumilus phages). Resistance to these phages was especially significant in the species *B. megaterium*, where none of 20 strains was sensitive to any of them.

Negative results in other species were based on the investigation of a smaller number of strains. The sensitive species *B. subtilis* and *B. pumilus* are taxonomically closely related (9) and belong, together with *B. licheniformis*, to the *B. subtilis* group, which by many criteria is a distinct taxonomic group in the genus *Bacillus* (3, 9, 10, 24). Our phages didn't lyse strains of *B. licheniformis*, however only 2 strains of this species were available.

Our results are in line with results obtained for other *Bacillus* phages (5, 8, 14, 19, 21) and are in striking contrast to the data of Romig & Brodetsky (20) and Reanney & Teh (17). In these cases, the reported extensive host ranges may conceivably have derived from interference by killer particles or inaccurate classification of strains at the species level (8). In the latter report, 3 of the 6 strains, sensitive to pumilus phage K<sub>13</sub>, belonged to the *B. subtilis* group. In addition, the 16 out of 20 unidentified *Bacillus* isolates that were lysed by the same phage may also have been members of this group, and therefore the extent of the host range may have been exaggerated.

At first sight it may appear surprising that no *Bacillus* species other than those of the *B. subtilis* group were lysed, since the genus, defined by characters such as the rodlike morphology, aerobic growth and sporogenicity, gives an impression of taxonomic compactness. However, the genus is markedly heterogeneous when compared with for example the enteric bacteria (involving several genera), where phages have shown extensive host ranges (2, 12). For example, when DNA sequence homology is considered, many species of *Bacillus* show little or no genomic homology and even between strains of the same species, sequence homology is sometimes lower than the 75% level (22), which

was proposed as the defining criterion for species (23). In contrast, sequence homology between strains of different genera of enteric bacteria sometimes even exceeds the 75% value (4).

These considerations support a basic postulate of this paper: that the extent of phage host ranges is generally proportional to the degree of taxonomic relatedness of the investigated strains. Jones & Sneath (11) defined a genospecies as a grouping of all strains between which genetic interchange is possible. If only gene transfer by transduction is taken into account, our data suggest that at least 2 and possibly all 3 species of the *B. subtilis* group form one genospecies. This observation is supported by evidence from literature (3, 24).

## Acknowledgments

We thank Lucy Seldin for the isolation and identification of some strains. This work was supported by a grant from the National Research Council of Brazil (CNPq).

## References

1. Ackermann, H.W.; Audurier, A.; Berthiaume, L.; Jones, L.A.; Mayo, J.A. & Vidaver, A.K. — Guidelines for bacteriophage classification. *Adv. Virus Res.*, 23:1-23, 1978.
2. Adams, M.H. — *Bacteriophages*. New York, Interscience Publishers, 1959.
3. Bramucci, M.G. & Lovett, P.S. — Temperate bacteriophage infectious for asporogenic variants of *Bacillus pumilus*. *J. Virol.*, 14:1281-1287, 1974.
4. Brenner, D.J.; Fanning, G.R.; Skerman, F.J. & Falkow, S. — Polynucleotide sequence divergence among strains of *Escherichia coli* and closely related organisms. *J. Bacteriol.*, 109:953-965, 1972.
5. Cooney, P.H.; Jacob, R.J. & Slepecky, R.A. — Characteristics of a *Bacillus megaterium* bacteriophage. *J. Gen. Virol.*, 26:131-134, 1974.
6. Elsas, J.D. van & Penido, E.G.C. — Characterization of phages of *Bacillus subtilis* isolated from Brazilian soils. *Rev. Microbiol.*, 12:49-54, 1981.
7. Elsas, J.D. van; Seldin, L. & Penido, E.G.C. — Ecology and taxonomy of *Bacillus* in Brazilian soils. *An. Microbiol. (Rio de Janeiro)*, 22:59-78, 1978.
8. Francis, A.E. & Rippon, J.E. — *Bacillus polymyxa* and its bacteriophages. *J. Gen. Microbiol.*, 3:425-433, 1949.
9. Gibson, T. & Gordon, R.E. — *Bacillus*. In: — Buchanan & Gibbons, eds. — *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8 ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1975.
10. Gordon, R.E.; Haynes, W.C. & Hor-Nay Pang, C. — The genus *Bacillus*. *Agric. Handbook 427*, U.S. Department of Agriculture, Washington D.C., 1973.
11. Jones, D. & Sneath, P.H.A. — Genetic transfer and bacterial taxonomy. *Bacteriol. Rev.*, 34:40-81, 1970.
12. Lazarus, A.S. & Gunnison, J.B. — Action of *P. pestis* phage on strains of *Pasteurella*, *Salmonella* & *Shigella*. *J. Bacteriol.*, 53:705-712, 1947.
13. Line, M.A. & Loutit, M.W. — Non symbiotic nitrogen-fixing organisms from some New Zealand Tussock grassland soils. *J. Gen. Microbiol.*, 66:309-318, 1971.
14. McCloy, E.W. — Studies on a lysogenic *Bacillus* strain. I — A bacteriophage specific for *Bacillus anthracis*. *J. Hygiene*, 49:114-125, 1951.
15. Mendes, W.; Cruz Lemos, P.O.; Costa Lemos, R.; Carvalho, L.G.O. & Rosenburg, R.J. — Contribuição ao mapeamento, em séries, dos solos do Município de Itaguai. *Bol. Inst. Ecol. Exp. Agric.*, 12-5-53, 1954.
16. Reanney, D.C. — Gene transfer as a mechanism of microbial evolution. *Bioscience*, 27:340-344, 1977.
17. Reanney, D.C. & Teh, C.K. — Mapping pathways of possible phage-mediated genetic interchange among soil bacilli. *Soil. Biol. Biochem.*, 8:305-311, 1976.
18. Reilly, B.E. — Bacteriophage of *Bacillus subtilis* as a paradigm of bacteriophage of bacilli. In: — Schlessinger, D., ed. — *Microbiology*. American Soc. Microbiol., Washington, D.C., p. 228-237, 1976.

19. Rima, B.K. & Steensma, H.Y. — Bacteriophages of *Bacillus subtilis*: comparison of different isolation techniques and possible use for classification of *Bacillus subtilis* strains. *Ant. van Leeuwenh.*, 37:425-434, 1971.
20. Romig, W.R. & Brodetsky, A.M. — Isolation and preliminary characterization of bacteriophages for *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 82:135-141, 1961.
21. Saunders, G.F. & Campbell, L.L. — Characterization of a thermophilic bacteriophage for *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.*, 91:341-348, 1966.
22. Seki, T.; Oshima, T. & Oshima, Y. — Taxonomic study of *Bacillus* by deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridisation and interspecific transformation. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 25:258-270, 1975.
23. Staley, T.E. & Colwell, R.R. — Application of molecular genetics and numerical taxonomy to the classification of bacteria. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 4:273-300, 1973.
24. Wilson, G.A. & Young, F.E. — Intergenetic transformation of the *Bacillus subtilis* genospecies. *J. Bacteriol.*, 111:705-716, 1972.

# Single radial haemolysis: a sensitive test for the detection of antibody to Influenza B virus

Jussara Pereira do Nascimento  
José Roberto Salcedo Chaves

*Instituto Oswaldo Cruz, Centro de Virologia Comparada, Caixa Postal 926  
20000 Rio de Janeiro RJ, Brasil*

& Marguerite Scott Pereira  
*Virus Reference Laboratory Colindale, London*

## Summary

A survey for antibody to influenza B virus was done on serum samples from people of all ages in Rio de Janeiro. Two tests were employed; a standard haemagglutination-inhibition and a more recently developed test, single-radial-haemolysis. This latter was found to be considerably more sensitive demonstrating that one fifth of children tested had been infected by the age of five and two thirds by the age of ten. Most adults had some antibody to influenza B.

## Resumo

*Hemólise radial simples: teste sensível para detecção de anticorpo para vírus Influenza B*

Foi realizado um estudo sobre anticorpos para o vírus influenza B, em soros de pessoas residentes no Rio de Janeiro, abrangendo todas as faixas etárias. Empregou-se dois testes: inibição de hemaglutinação, utilizada rotineiramente na pesquisa de anticorpos para vírus influenza; e hemólise radial simples, uma reação mais recentemente desenvolvida. Esta última mostrou-se consideravelmente mais sensível, demonstrando que um quinto das crianças testadas adquiriram a infecção até cinco anos e dois terços até os dez anos de idade. A maioria dos adultos mostrou anticorpos para influenza B.

## Introduction

The technique of single-radial-haemolysis (SRH) for measuring serum antibody to influenza viruses has several advantages over the standard techniques of haemagglutination-inhibition (HI) in its simplicity and its freedom from the effects of non-specific inhibitors of haemagglutinin. The results of HI tests and SRH have been compared and found to correlate closely, so the method has been applied successfully to sero-epidemiological surveys of influenza A (3).

Influenza B antibody as reflected by haemagglutination-inhibition appears to be infrequent and of low titre which conflicts with the evidence that influenza B viruses are widespread infecting predominantly in childhood; and apparently producing long lasting immunity since adults are largely spared. Some preliminary evidence pointed to the SRH test as a possibly more sensitive indicator of antibody to influenza B and this report presents the result of an antibody survey comparing the two tests on serum samples collected from people of all ages in Rio de Janeiro.

## Material and Methods

Influenza viruses B/Lee/40, B/Hong Kong/8/73 and B/Hannover/78 and specific ferret antisera to each were obtained from the WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza, Virus Reference Laboratory, Colindale, London.

**Serum samples** — Were collected from people of all ages with or without respiratory infections, from the Hospital dos Servidores do Estado, Santa Casa de Misericórdia and the Hospital Geral de Bonsucceso all in Rio de Janeiro, during the years from 1976 to 1980.

**Haemagglutination-inhibition tests** — Sera were treated with receptor-destroying enzyme provided by the WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza at Centre for Disease Control, Atlanta. The method used was a standard micro-method using 0.025ml volumes in microtiter plates (2).

**Single-Radial-Haemolysis** — The technique employed was as described by Schild & col. (3) with a few modifications. A 10% (V/V) suspension of freshly washed chicken erythrocytes was made in veronal buffer pH 7.0-7.2. An allantoic fluid infected with an influenza B virus was added to this suspension at a concentration of 500 haemagglutinating units per 1ml. The mixture was held at 4°C for 10 minutes for the virus attach to the erythrocytes and the unattached virus then removed by two cycles of sedimentation by low-speed centrifugation. The erythrocytes were then re-suspended in fresh veronal buffer to the original concentration. Immunoplates (Hyland Costa Mesa, CA, USA) were prepared by incorporating 0.4ml of the virus-treated erythrocytes together with 0.1ml complement (fresh guinea pig serum) in 2.5 ml volumes of melted 1% agarose in veronal buffer (A-37 Indubiose L'Industrie Biologique Française) held at 43°C in a water-bath. Control plates were prepared in the same way with erythrocytes treated with an uninfected allantoic fluid. The gels were allowed to set for 30 minutes after which wells 2mm diameter were cut at appropriate distances, usually 14 to an immunoplate. Sera were inactivated at 60°C for 20 minutes and then each serum was added in 5 µl volumes to wells in a virus-treated and a control plate. A specific control ferret serum was placed in one well in each test and control plate. The immunoplates were then incubated overnight at 37°C in a humidified box. The recognition and measurement of the zones of haemolysis was found to be most easily achieved with the aid of an overhead projector.

## Results

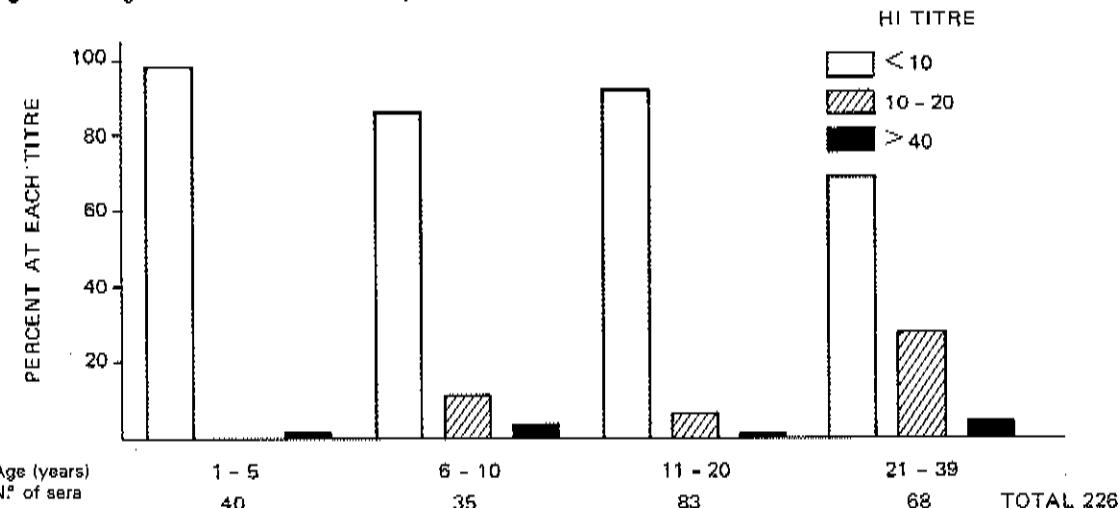
The results of HI tests on human sera are shown in Figure 1. A total of 226 sera were examined from persons of all ages and although the proportion with demonstrable antibody increased with age only a small proportion were positive even in the older group.

The results of SRH are shown in Figure 2. A total of 162 sera were tested. In the youngest age group nearly 20% were found to have antibody, this proportion increasing sharply in the next 5 year age group to 65%. Only a small proportion of adult sera were without antibody.

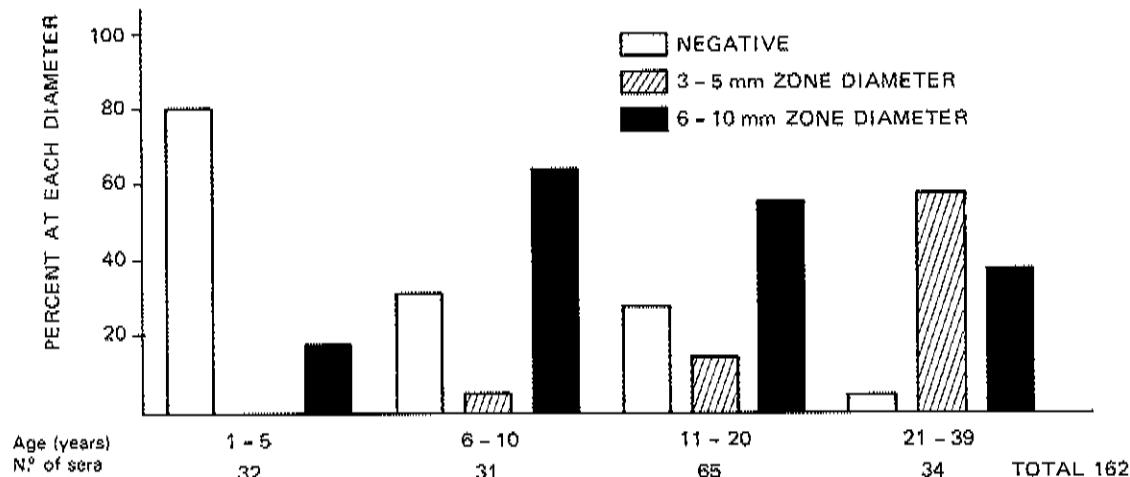
A comparision of the results of the two tests is shown in Table 1 where it can be seen that a third of the sera tested were negative in both tests and of the rest the majority failed altogether to react in the HI test but produced zones of haemolysis by SRH. Figure 3 illustrates the lack of relationship between the HI titres in a larger series of serum samples which did react and the corresponding size of the zone of haemolysis in the SRH test. The correlation coefficient was found to be only 0.13 which contrasts strikingly with the straight line correlation found with influenza A (3).

The three strains of influenza B selected for comparison were B/Lee/40, the first isolate, B/Hong Kong/8/73 and a recent isolate B/Hannover/78. Each was incorporated in

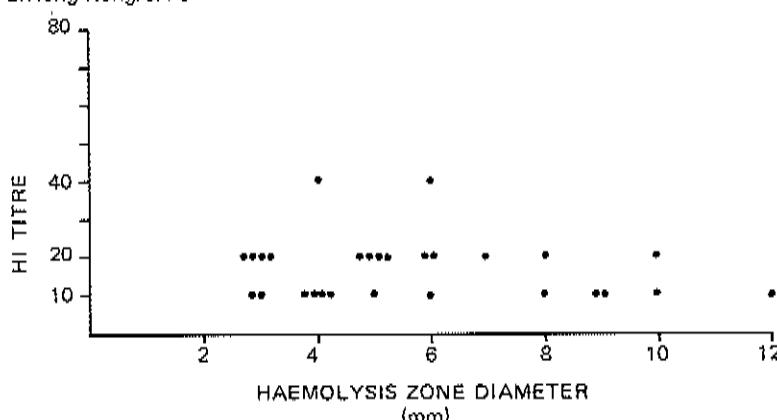
**Figure 1 — Age distribution of HI antibody to influenza B virus**



**Figure 2 — Age distribution of SRH antibody to influenza B virus**



**Figure 3 — Relationship between HI titre and SRH zone diameter in 30 human sera with HI antibody to influenza B/Hong Kong/8/73**



**Table 1 — Comparison of HI titres and SRH zone diameters**

HI <sup>a</sup> SRH <sup>b</sup>	<10	10-20	≥40	Total
NIL	55	0	0	55
3-5	23	4	0	27
6-10	64	11	1	76
>10	1	1	0	2
Total	143	16	1	160

a. Haemagglutination-inhibition titre; b. single-radial-haemolysis zone diameter (mm).

**Table 2 — Cross reactivity of different influenza B strains by SRH**

Virus	Antiserum		
	B/Lee/40	B/Hong Kong/73	B/Hannover/78
B/Lee/40	14*	NIL	NIL
B/Hong Kong/73	7	12	12
B/Hannover/78	14	4	14

\* The numbers denote the diameters of the zones of haemolysis in mm.

a gel and its specific antiserum added to a well in each immunoplate. The results are shown in Table 2. Antiserum to B/Lee/40 produced a zone of haemolysis with each of the viruses, whereas antisera to the two later strains gave zones of haemolysis with each other but not at all with the B/Lee/40 virus.

## Discussion

The HI test is a well-tried and traditional test for antibody to Influenza viruses. Alternative tests have however been sought to overcome the problem of non-specific inhibitors and other factors such as the variation in fowl cells which make haemagglutination inhibition produce sometimes irregular results. One such test, single radial haemolysis has been found to have these advantages with influenza A giving no cross-reactivity between sub-types and being highly correlated with results of HI tests (3). This has made it a useful method for sero-epidemiological studies.

The HI test for influenza B virus however appears to be a poor method for demonstrating antibody with many sera negative or with only low titres among the age groups where influenza B circulates most freely. Adults, who are on the whole spared in outbreaks, appear to have little antibody which might explain this protection.

The observation that SRH reveals antibody not shown by HI has offered a means to correct this situation and the results of this study suggest that antibody to influenza B is widespread, being acquired throughout childhood particularly after children begin to attend school and probably maintained throughout adult life. Similar results to ours have been obtained in the U.K. (personal communication, Chakraverty).

Unlike influenza A viruses which as mentioned can be separated into sharply defined sub-types which do not cross-react, influenza B viruses, although showing considerable antigenic divergence between the earliest B/Lee/40 and more recent strains such as B/Hong Kong/73 all share common antigens (1). From the experiments with ferret antisera

it seems that B/Lee/40 produces a wide spectrum of antibody which reacts with later appearing strains. More recent strains however appear to lack some antigens present in B/Lee and their antibody does not react with the earlier virus.

Influenza B has rarely been isolated in Rio de Janeiro and with the standard HI results it has been impossible to say whether this virus had circulated to any extent or not. It seems that in fact the pattern in this tropical country is similar to that found in temperate lands with the main experience in later childhood. Although this virus is generally considered to provoke only mild respiratory illness there is considerable evidence that it may cause more severe disease at the extremes of life. Whether this holds true in a tropical climate remains to be ascertained. In all events the World Health Organization recommends the inclusion of influenza B in the formula for current influenza vaccines which are intended for those particularly at risk of severe illness should they become infected.

In any future study of antibody to influenza B either as a population survey or for vaccine evaluation it is clear that single radial haemolysis is the method of choice.

### Acknowledgements

We would like to thank the following for kindly providing serum samples for this study: Dr. Gilda Bruno Lobo, Dr. Gladstone Deane and Dr. Clara T. Tachibana Yoshida.

### References

1. Chakraverty, P. — Antigenic relationships between influenza B viruses. Bull WHO, 45:755-766, 1971.
2. Robinson, R.Q. & Dowdle, W.R. — Diagnostic procedures for viral and rickettsial disease. 4. ed. New York, Lennette/Schmidt, 1969.
3. Schild, G.C.; Pereira, M.S. & Chakraverty, P. — Single-Radial-Haemolysis: a new method for the assay of antibody to influenza hemagglutinin. Bull. WHO, 52:43-50, 1975.

## **Partial purification of western equine encephalitis virus by fractionation procedures\***

Sonia Presa Salzberg

*Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, FEA-UNICAMP  
13100 Campinas SP, Brasil*

& Adly Ibrahim

*Biology Department, Georgia State University  
Atlanta Georgia, USA*

### **Summary**

Concentration, partial purification and fractionation of the Western Equine Encephalitis (WEE) virus were carried out by ammonium sulfate precipitation and high speed centrifugation methods. Hemmagglutinins were found in the soluble antigen fractions precipitated by 30, 40 and 50 per cent solutions of the saturated ammonium sulfate solution. Complement-fixing antigens, however were found in both the soluble antigens and the virus pellet preparations. At least two soluble precipitinogens were present in each of the fractions precipitated by 40 and 50 per cent ammonium sulfate solutions and only one in each of the fractions separated by 70 and 80 per cent solutions. The 40 and 50 per cent fractions possessed the highest reactivity in CF, HA and ID tests.

### **Resumo**

*Purificação parcial do vírus da Encefalite Eqüina do Oeste (WEE) utilizando o procedimento de fracionamento*

Concentração, purificação parcial e fracionamento do vírus da encefalite eqüina do oeste (WEE) foram realizados pelos processos de precipitação com sulfato de amônia e centrifugação a alta velocidade. As hemagglutininas foram achadas nas frações de抗igenos solúveis obtidos, pela precipitação com soluções de sulfato de amônio, nas concentrações de 30, 40 e 50 porcento. Os抗igenos do tipo de fixação de complemento foram achados, tanto nas frações de抗igenos solúveis, como nas preparações contendo os抗igenos precipitados. Pelo menos dois抗igenos do tipo precipitina foram determinados nas frações precipitadas pelas soluções de sulfato de amônio, nas concentrações de 40 e 50 porcento respectivamente. Um抗igeno tipo precipitina foi encontrado nas frações separadas pelas soluções de sulfato de amônio, nas concentrações de 70 e 80%. As frações correspondentes à concentração de sulfato de amônio nos valores 40 e 50 porcento apresentaram a maior reatividade nas reações de fixação do complemento (FC) hemaglutinação (HA) e imunodifusão (ID).

### **Introduction**

The Western Equine Encephalitis (WEE) virus, a member of group A arboviruses is most prevalent in the Western United States and Mexico.

\* Parte da tese de mestrado, realizada na Georgia State University.

The infection cycle has been investigated by Hammon & Reeves (4). The main cycle is mosquito-bird-mosquito where birds acquire adequate viremia even though they are apparently infected. Horses and man are accidental hosts.

During the last few years numerous attempts have been made to purify, fractionate and characterize group A arbovirus antigens. In 1961, Smith & Holt (8) demonstrated that this group of viruses possesses two hemagglutinins associated with the virus particle.

In 1968, Sreevalsan & Allen (9) reported two structural proteins in WEE, Igarashi & col. (6) working with the Chikungunya virus, found two components, one associated with the membrane and responsible for hemmagglutination activity and the other associated with the virus core. The latter authors proposed a model that interpreted their results as well as the results of other works in group A arboviruses. Aalestad, Hoffman & Brown (1) reported three different buoyant density hemagglutinins in cesium chloride from Sindbis virus and from Eastern Equine Encephalitis (EEE) virus. The authors observed a certain degree of interconversion among these particles. This finding can explain the differences among the number of subviral particles reported in the literature.

Separation of heterogenous components of viral particles and determination of their biological, physical and chemical properties are useful not only to establish the characteristics of the virus but also to aid in identification or classification.

The purpose of the present investigation is to purify partially WEE virus through fractionation procedures and to determine the serological activity of each fraction.

## Material and Methods

*Virus seed and propagation* — Western Equine Encephalitis virus was obtained from the Center of Disease Control (CDC), Atlanta, Georgia, USA, as infected suckling mouse brain suspension (ISMB). In the laboratory the virus was passed five times intracerebrally into suckling mice. Ten and twenty per cent ISMB suspensions were prepared by homogenization of brains in phosphate buffered saline (PBS) at pH 7.8 with one per cent bovine albumen and stored at -70°C.

Five to six suckling mice litters, about forty animals, two to three days old, were inoculated intracerebrally using 0.01-0.02ml of  $10^{-1}$  ISMB suspension in phosphate buffered saline, 0.02 M, pH 7.8, containing 1% of bovine albumen. At the onset of encephalitic signs in the majority of inoculated animals, approximately 24 hours after injection, they were sacrificed, their brains being harvested under strict aseptic conditions and stored at -70°C.

*Cell culture* — The virus used for purification was propagated in HeLa cell line, passage 307, obtained from Dr. Gary Haller, Ga. State University, Atlanta, USA. Cell monolayers were dispersed using 0.25% trypsin solution and subcultured in 32 oz. prescription bottles. For cell growth it was used dessicated minimal essential medium with glutamine (Grand Island Biological Company). The medium was reconstituted with 100ml of deionized distilled water and sterilized by filtration. On the basic medium were added: a) 10ml of antibiotic mixture of penicillin 1,000,000 units and streptomycin 1.0g diluted in 100ml of water and sterilized by filtration; b) 12.5ml of sodium bicarbonate 8.8% sterile aqueous solution; c) inactivated calf serum to give a final concentration of 10%; d) sterile water to complete one liter, to bring the minimal essential medium to working values according to the specifications of the manufacturer. The medium was subjected to sterility tests using blood agar thioglycollate broth and Sabouraud media.

After the HeLa cells monolayer was developed, the growth medium was substituted by the maintenance medium, identical in composition to the growth medium except for the calf serum final concentration of 2% instead of 10%.

*Partial purification of the virus* — Tables 1 and 2 summarize the procedure followed for partial purification and fractionation of the virus. Table 2 details also the antigenic fractions obtained.

*Antisera preparation* — Two antigenic fractions were used as immunogens for the preparation of antisera: infected tissue culture (ITC) and high speed clarified pellets (HSP).

To obtain the mouse immune ascitic fluid (IAF) infected tissue culture was used as the immunogen. Four mice were inoculated on days 0, 5, 21 and 22 with the ITC antigen using intraperitoneal injections of 0.5ml of ITC mixed and emulsified with complete Freund's adjuvant. On the twenty-first day 0.2ml of sarcoma cells were intraperitoneally (IP) injected. The ascitic fluid was removed by paracentesis after abdomen distension in the mice.

To obtain the rabbit antisera, albino rabbits weighing from four to six pounds were inoculated intramuscularly with 4.0ml of an emulsified mixture of equal parts of antigen and complete Freund's adjuvant. The injections were repeated three or four times at seven-day intervals. One week after the last injection blood samples were collected by cardiac puncture.

*Determination of virus infectivity* — Two antigenic preparations were assayed for infectivity: infective tissue culture and sucrose cushion pellet. Each preparation was serially diluted ten-fold, from  $10^{-3}$  to  $10^{-8}$ . Cytopathogenic effect in the cells was observed and recorded twice daily for three to four days.

*Serological techniques* — *Immunodiffusion* — It was used the micromodification of Ouchterlony double-diffusion in two dimensions. Two controls were used: normal mouse brain and normal tissue culture. To eliminate the host tissue precipitin reaction, it was followed the adsorption-in-gel method described by Ibrahim (5).

*Complement-Fixation* — The Laboratory Branch Complement Fixation (LBCF) method adapted to microtest by Casey (2) was used.

*Hemagglutination* — It was used a modification of the method described by Clarke & Casals (3).

Red blood cells obtained from an adult domestic goose were washed three times in PBS at pH 7.2, suspended in the buffer in a proportion of four volumes of buffer for each volume of cells and stored at 4°C. Before the test, a 2.5% suspension of goose red blood cells was prepared.

## Results

The infectivity titers from infected HeLa cells were TCID<sub>50</sub>  $10^{-7.5}/0.1\text{ml}$  for the clarified supernate and  $10^{-3.5}/0.1\text{ml}$  for the partially purified sucrose cushion pellet.

*Immunodiffusion* — The two antisera, IAF and rabbit antisera, antivirus pellet, prepared in this investigation yielded precipitin lines with the following test antigens: concentrated supernate (CS, that corresponds to the antigenic fraction 2, in Table 2) and each of the five fractions obtained after the precipitation with the various concentrations of ammonium sulfate (antigenic fractions 3, 4, 5, 6 and 7, in Table 2). Some precipitin lines also appeared with the normal tissue culture used as a control. It was necessary, therefore, to adsorb both test antisera with normal tissue culture. The IAF to be adsorbed was used undiluted and with dilutions, 1:2, 1:3 and 1:4. No precipitin lines appeared with the adsorbed

**Table 1 — Centrifugation procedure for preparation of virus pellets and soluble antigens**

Infected Tissue Culture		
Clarified by Centrifugation at 10,000rpm for 20min		
Supernate		
Recentrifuged at 35,000rpm for 90min		
Supernate		Pellet
Fractionated by precipitation with increasing concentrations of ammonium sulfate solutions	Concentrated by dialysis against PVP <sup>a</sup>	Resuspended in 1/40th of the original volume and clarified at 3,000rpm
		Supernate
		Recentrifuged in 30% sucrose cushion at 35,000rpm (high speed supernate: HSS)
		Pellet resuspended in 1/2 of the original volume, homogenized, and clarified at 3,000rpm

a. Polyvinylpyrrolidone.

**Table 2 — Antigenic fractions obtained after centrifugation and fractionation**

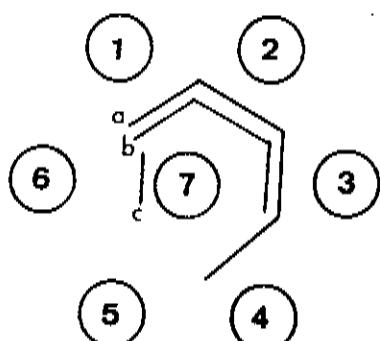
Antigenic fractions	Designation	Method and Preparation
1	Infected tissue culture (ITC)	Supernate obtained after 10,000rpm centrifugation of ITC and concentrated ten times
2	Concentrated Supernate (CS)	Supernate obtained after centrifugation at 35,000rpm for 90 minutes and concentrated twenty times
3	30% Ammonium sulfate (30%)	Reconstituted precipitate obtained after the treatment with 30% ammonium sulfate solution
4	40% Ammonium sulfate (40%)	Reconstituted precipitate obtained after the treatment with 40% ammonium sulfate solution
5	50% Ammonium sulfate (50%)	Reconstituted precipitate obtained after the treatment with 50% ammonium sulfate solution
6	70% Ammonium sulfate (70%)	Reconstituted precipitate obtained after the treatment with 70% ammonium sulfate solution
7	80% Ammonium sulfate (80%)	Reconstituted precipitate obtained after the treatment with 80% ammonium sulfate solution
8	High speed pellet (HPS)	Pellet obtained after centrifugation at 35,000rpm and resuspended in 1/40 th of its original volume
9	30% Sucrose cushion pellet (SCP)	High speed pellet centrifuged through 30% sucrose. Cushion pellet resuspended in 1/2 of its original volume
10	Normal tissue culture (NTC)	Supernate obtained after centrifugation at 10,000rpm of NTC and concentrated ten times with PVP <sup>a</sup>

a. Polyvinylpyrrolidone.

1:2 diluted IAF, indicating adequate adsorption. Two lines appeared with the concentrated supernatant fluid indicating that the soluble antigen preparation contains at least two antigens. The 40% and 50% ammonium sulfate precipitated fractions gave reactions identical to those of the concentrated supernate. With the fraction precipitated with 30% of the salt saturation, no reaction appeared; whereas the 70% fraction showed only one of the aforementioned lines. A different line appeared with the 80% precipitated fraction. Figure 1 shows schematic representation of the precipitin pattern with the above mentioned antigens and antisera. Identical results were obtained with the adsorbed rabbit anti-'partially purified pellet'.

**Complement-fixation test** — Complement-fixation was performed on all antigen fractions obtained during the purification procedure using the rabbit serum prepared against the high speed pellet (HSP). Normal tissue culture antigen was used as a control. The results are summarized in Table 4. The control showed a titer of less than 4. Anti-complementary activity was not more than 1:16 for all the fractions except the ones precipitated by 40% and 50% ammonium sulfate which had values of 1:128 and 1:64, respectively. The highest values in CF activity were present in the last two aforementioned fractions as well as in the sucrose cushion pellet, infected tissue culture, and concentrated supernate. The value obtained for all these fractions was 1:256. Values of 1:64 were present in fractions precipitated by 30% and 70% ammonium sulfate. Lower values, in the range < 1:4 to 1:8,

Figure 1 — Schematic representation of immunodiffusion pattern between mouse anti-WEE virus ascitic fluid and homologous antigen fractions



1. Fraction precipitated by 40% ammonium sulfate solution
2. Concentrated supernate (CS)
3. Fraction precipitated by 50% ammonium sulfate solution
4. Fraction precipitated by 70% ammonium sulfate solution
5. Fraction precipitated by 30% ammonium sulfate solution
6. Fraction precipitated by 80% ammonium sulfate solution
7. Anti-WEE virus ascitic fluid. Precipitin lines are designated a, b, and c

Table 3 — Complement-fixation titers of different WEE virus antigen preparations

Antigen preparations <sup>a</sup>	CF titer
	Ag CFU <sup>d</sup> /0.025ml <sup>c</sup>
ITC	≥ 256
CS	≥ 256
30%	64
40%	≥ 256
50%	≥ 256
70%	64
80%	4
HSP	8
SCP	≥ 256
NTC	≤ 4
	AC <sup>b</sup> CFU/0.025ml
ITC	8
CS	16
30%	16
40%	128
50%	64
70%	8
80%	≤ 4
HSP	4
SCP	≤ 4
NTC	≤ 4

a. These antigens are described in Table 2; b. Anti-complementary activity; c. Reciprocal complement fixation titer and d. CFU = complement fixation unit.

**Table 4 — Reciprocal hemagglutination titers of various WEE virus antigenic preparations at different pH values**

Antigenic preparations <sup>a</sup>	6.2	6.4	pH 6.6	7.0	7.2
ITC	16 <sup>b</sup>	16	32	32	32
CS	32	32	32	32	32
30%	8	16	16	32	32
40%	16	16	16	64	64
50%	≤ 4	≤ 4	≤ 4	64	64
70%	≤ 4	≤ 4	≤ 4	≤ 4	≤ 4
80%	≤ 4	≤ 4	≤ 4	≤ 4	≤ 4
HSP	≤ 4	≤ 4	≤ 4	≤ 4	≤ 4
SCP	≤ 4	≤ 4	≤ 4	≤ 4	≤ 4

a. These antigens are described in Table 2; b. All of these are reciprocal hemagglutination titers.

were obtained with the fraction precipitated by the 80% ammonium sulfate solution and with HSP.

**Hemagglutination test** — Following the tests at pH 6.2, 6.4 and 6.6 performed at 37°C and at room temperature, the optimal condition for the reaction was determined to be pH 6.6 at room temperature. Table 4 shows the results of these tests. The fractions, infected tissue culture, and concentrated supernate presented the titer 1:32, the highest obtained in this experiment. Fractions precipitated by 30% and 40% ammonium sulfate presented the intermediate values 1:16. Fractions precipitated by 50%, 70% and 80% ammonium sulfate, as well as fractions designated and sucrose cushion pellet, showed no hemagglutinating activity. The experiment was repeated using higher pH values of 7.0 and 7.2. The plates were incubated at room temperature. Table 4 summarizes these results. There was an increase in hemagglutinating activity for antigens designated as 30%, 40% and 50% ammonium sulfate. All other antigen preparations showed results identical with those previously obtained with lower pH values. It is noted that some antigens such as infected tissue culture and concentrated supernate have a broad range of pH values for optimum reactivity, but others, as fractions precipitated by 30% and 40% ammonium sulfate solutions, showed a narrow range for optimum reactivity. Fifty per cent ammonium sulfate solution did not demonstrate any reactivity at pH 6.8. However the 30%, 40% and 50% fractions gave a titer of 1:64 when the test was carried out at pH 7.0 and 7.2.

## Discussion

The results of the present studies on the soluble antigens of WEE virus were rewarding, however, those on the virus pellet or virions are difficult to interpret.

The immunodiffusion studies, Figure 1, have clearly shown that the number of soluble antigens are at least three which may be, for convenience, designated as a, b and c antigens. The intensity of a and b precipitin lines suggests that these are the major antigens whereas c is a minor one. The two major components were precipitated by 40% and 50% solutions of saturated ammonium sulfate. This is clearly shown by the patterns of identity with the a and b lines of the unfractionated soluble antigen obtained after high speed centrifugation. The b component apparently was precipitated by 70% salt saturation. The line which appeared with this latter fraction was very faint which indicates that the content of the b antigen was much lower than in the other two fractions. A third precipitin line was observed with the fraction precipitated by 80% salt saturation. This latter line appeared closer to the antiserum well and was designated as the c component. One may argue, however, that no reaction corresponding to the c line appeared with the unfractionated

soluble antigens. This may be due do the concentration of these antigen preparations. The soluble antigen preparations before fractionation were concentrated 20 times whereas the fractions obtained after fractionation were concentrated 50 times. The fraction precipitated by 30% ammonium sulfate did not show any precipitin lines, indicating either that it did not contain any precipitinogen or the concentration of the antigenic component was not enough to produce a reaction. This latter fraction produced some CF reactivity, which supports this explanation or the CF antigen may be different from the precipitinogen. These results correlate to some degree with those of Russell & col. (7) on the dengue subgroup of arboviruses. They showed that the soluble antigen of these viruses was precipitated by a final concentration of 60% ammonium sulfate.

The results obtained from the CF studies indicate that the maximum content of CF antigen(s) is present in 40 and 50% and to a lesser degree 30 and 70% ammonium sulfate fractions. However, the anti-complementary activity of some of these fractions may throw doubt on such results. The hemagglutinins were found to reside in fractions precipitated by 30%, 40% and 50% saturation with maximum reactivity in the latter 2 fractions. The optimum pH of the reaction was found to be pH 7.0. Complement-fixing antigens were also found in the sucrose cushion virus pellet. No hemagglutination was shown with the virus pellets.

The mouse anti-infected cell cultures ascitic fluid and rabbit anti-virus pellet gave identical precipitin reactions in immunodiffusion. To interpret such results, one may speculate that the pellet was contaminated by the soluble antigen(s). These soluble antigens may be highly potent immunogens as compared with those of the pellet. Another speculation may be that the pellet contained the same antigens as those of the supernate obtained after high speed centrifugation.

These studies seem to show that it may be necessary to concentrate the soluble antigen(s) of WEE virus to obtain a precipitin-in-gel reaction.

The question of whether the CF antigen or antigens of the soluble components are the same or different ones from those of the pellet remains to be answered. It was observed that infectivity of the infected cell culture was unexpectedly higher than that of the sucrose cushion pellet. The only plausible explanation is that the several manipulations during the purification procedure resulted in loss or inactivation or both of some virus particles.

## References

1. Aalestad, H.G.; Hoffman, E.J. & Brown, A. — Fractionation of eastern equine encephalitis (EEE) virus by density gradient centrifugation in CsCl. *J. Virol.*, 2:972-978, 1968.
2. Casey, M. — One adaptation of the laboratory branch complement-fixation method to microtest techniques. USPHS Pub. n° 372. Pub. Health Monog. n° 23. New York, US. Dep. Health Educ. Welfare, 1965.
3. Clarke, D.H. & Casals, J. — Techniques for hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 7:561-573, 1958.
4. Hammon, W. McD. & Reeves, W.C. — Laboratory transmission of eastern equine encephalomyelitis virus by mosquitoes of the genera *Culex* and *Culiseta*. *J. Exp. Med.*, 88:425-434, 1943.
5. Ibrahim, A.N. — Elimination of host tissue reactions in immunodiffusion and immunolectrophoretic studies of arboviruses. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Proc.*, 130:784-787, 1969.
6. Igarashi, A.; Fukai, K. & Tuchinda, P. — Studies on Chikungunya virus. II — Purification of mouse brain virus. *Biken J.*, 10:194-198, 1967.
7. Russell, P.K.; Dumrog, C. & Brandt, W.E. — Immunoprecipitation analysis of soluble complement-fixing antigens of Dengue viruses. *J. Immunol.*, 105:838-845, 1970.
8. Smith, C.E. & Holt, D. — Chromatography of arthropod-borne viruses, on calcium phosphate columns. *Bull. Wld. Health Org.*, 24:749-759, 1961.
9. Sreevalsan, T. & Allen, P.T. — Replication of western equine encephalomyelitis virus. II — Cytoplasmic structure involved in the synthesis and development of the virions. *J. Virol.*, 2:1038-1046, 1968.

# The effects of nystatin on *Saccharomyces cerevisiae* in different physiological conditions

Maria Ligia Carvalhal Rosa  
& Flávio Alterthum

Instituto de Química USP, Caixa Postal 20780  
01000 São Paulo SP, Brasil

## Summary

The action of nystatin was studied on *Saccharomyces cerevisiae* containing predominantly ergosterol or cholesterol in the cell membrane. Cells grown in aerobiosis and anaerobiosis were tested in the logarithmic and stationary phases of growth. The action of nystatin was tested by determining the cell death and the rate of liberation of 50% of potassium ions. Cells of *S. cerevisiae* grown in aerobic conditions were more susceptible to the lethal action of nystatin than those which were previously cultured anaerobically. Cells in the stationary phase of growth released more potassium ions. The two events, cell death and release of potassium, although resulting from the action of nystatin, do not seem to be directly related.

## Resumo

Ação da nistatina sobre *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes estados fisiológicos

Varando a composição dos esteróis na membrana citoplasmática de *Saccharomyces cerevisiae*, comparamos células contendo predominantemente ergosterol ou colesterol, submetidas a ação da nistatina. Uma vez que o estado fisiológico é outro fator importante na susceptibilidade aos agentes químicos e quimioterápicos, as células foram testadas em fases logarítmica e estacionária de crescimento, bem como em células previamente cultivadas em aerobiose e anaerobiose. Os parâmetros avaliados foram a velocidade da liberação de 50% dos íons potássio e a morte celular. *S. cerevisiae* cultivado em aerobiose é mais sensível à ação letal da nistatina do que quando as células são provenientes da cultura em anaerobiose. Células em fase estacionária liberam mais potássio. Os dois eventos, morte celular e saída de potássio, embora resultantes da atividade da nistatina, não estão diretamente interligados.

## Introduction

The interaction of polyenes with steroids leads to alterations in the perméability of the citoplasmic membrane (16, 18, 20, 21). By using different models consisting of artificial membranes, the formation of ion-selective aqueous pores has been suggested (8, 9, 10). Apparently, the hydrophilic region of the polyene is directed towards the inner side of the pore, whereas the hydrophobic part interact externally with the sterol (10). One of the immediate consequences of such arrangement is the release of intracellular ions. The objective of the present investigation was to study the outflow of intracellular K ions and to determine how this correlates with cell death in nystatin-treated *Saccharomyces*

*cerevisiae*. This yeast, depending on growth conditions, contains ergosterol or cholesterol in its membranes. In the absence of oxygen this microorganism is auxotrophic for a sterol (2) and for an unsaturated fatty acid (3). When added to the culture medium, both the unsaturated fatty acid (1) and the sterol (13) are incorporated into the cell membrane. The chemical composition of the membrane with respect to the sterol and fatty acid contents can thus be modulated by specific supplementation of the growth medium. In the present work we investigated the possible correlation between the variation in the chemical composition of yeasts and their sensitivity to nystatin.

## Material and Methods

1. *Microorganism* — *Saccharomyces cerevisiae*, NCYC 366 maintained on malt agar and transferred monthly, was used.

2. *Antibiotic* — Nystatin was kindly provided by Squibb Indústrias Químicas S.A., São Paulo, Brazil. On the day of the experiment, a solution was prepared by dissolving 10mg of nystatin in 0.5ml dimethylsulfoxide (DMSO) and the volume made up to 10ml with sterile distilled water. Appropriate dilutions were prepared from this solution.

3. *Experimental cultures* — *Aerobiosis* — An inoculum corresponding to 1  $\mu$ g cells (dry weight) from a 24-hour culture was added to a 2-liter Erlenmeyer flask containing 500ml of the following culture medium: glucose (20.0g),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (3.0g),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (3.0g), yeast extract (2.0g),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (25.0mg),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (25.0mg) and distilled water to 1000ml (Medium A). The culture was incubated in a New Brunswick rotatory shaker at 200r.p.m., at 30°C. *Anaerobiosis* — An inoculum corresponding to 2  $\mu$ g cells (dry weight) from a 24-hour unshaken culture in a New Brunswick Microfermenter at 30°C was used. One liter of Medium A modified to contain 10% glucose, 5mg ergosterol or cholesterol (2.5ml of an alcoholic solution containing 2.0mg/ml) and 30mg oleic acid (1ml of alcoholic solution containing 30.0mg/ml) was distributed in a 2 liter fermentor jar previously washed with chloroform. The fermentor jar was then sterilized in an autoclave and nitrogen was immediately bubbled through the medium before it cooled. To eliminate traces of oxygen, the nitrogen was previously washed through a mixture of zinc amalgam and chrome III chloride (22). The culture was kept at 30°C and shaken at 300r.p.m..

A control flask was prepared containing medium without the sterol or the unsaturated fatty acid which was also bubbled with nitrogen. Under these conditions, no growth occurred. If it did the culture was discarded. Aerobic or anaerobic growth was monitored by reading the absorbance at 550nm. A mixture of chloramphenicol and cycloheximide at a final concentration of 100  $\mu$ g/ml each was added to the culture at the logarithmic phase (absorbance = 0.5) or at the beginning of the stationary phase (absorbance = 1.0), to avoid synthesis of new aerobically-induced enzymes. After antibiotic addition, the cultures were kept in aerobiosis or anaerobiosis for 15 minutes, cells being then centrifuged at 3,015g for 15 minutes at 4°C. The pellet was washed three times with ice-cold twice-distilled sterile water and resuspended in twice-distilled water at 3mg cells (dry weight)/ml. Suspensions of cells from anaerobic cultures were distributed among 20ml tubes which, after 3min bubbling with nitrogen, were sealed and stored at 0°C until required. All solutions and washes contained 100  $\mu$ g/ml each of chloramphenicol and cycloheximide.

4. *Viability* — Viability was determined simultaneously with the measurement of K ion release from cells. Aliquots of 0.1ml from the suspension were appropriately diluted and plated on YPD (0.8% peptone, 2.0% glucose, 0.6% yeast extract, and 1.5% agar). The number of colony-forming units was counted after the plates had been incubated for 48 hours at 30°C.

5. *Potassium ion release* — Quantitative measurements of K ions were made with an Orion K<sup>+</sup>-selective liquid membrane electrode, Model 93-19. K<sup>+</sup> concentration was measured within the limits of the electrode sensitivity, i.e. 10<sup>-2</sup> to 10<sup>-4</sup> M. The cell suspension (20ml) was stirred with a magnetic bar in a 25ml becker at 28°C. Two ml of ion-strength adjuster (6M NaCl solution) was used for 100ml suspensions.

The mv readings were made with a digital Orion Ionanalyzer Model 601. The initial ion concentration was stabilized at ~ 177mv by using a 0.1M KCl solution. Nystatin (0.2ml) was added 3 minutes after the electrode had been in contact with the cells and K<sup>+</sup> concentration was recorded at 30 second intervals. Two controls without antibiotic were carried out for each experiment, one with DMSO.

6. *Determination of cell dry weight* — Cell dry weight was measured in triplicate from 5ml samples on previously weighed aluminum foil cuvettes. After 24 hours at 110°C, the cuvettes were cooled, placed in a vacuum desiccator and weighed.

## Results

1. *Effect of nystatin on S. cerevisiae viability* — The proportion (%) of colony forming units (CFU) after 30 minutes with nystatin (5 µg/ml) to that at the beginning of the incubation is shown in Table 1. In control experiments in the absence of nystatin and in the presence of DMSO no apparent cell death was detected in 30min incubation.

*S. cerevisiae* from logarithmic growth phase previously cultured in aerobiosis, exhibited a significantly\* greater death percentage than cells from anaerobic cultures.

Cells from logarithmic phase, cultured in anaerobic conditions, no matter what sterol was incorporated, showed no significant\* difference in sensitivity to the drug.

All stationary growth phase cells did not present any difference in sensitivity.

2. *Release of K<sup>+</sup> from nystatin — treated cells* — To express the sensitivity to nystatin of the differently cultured cells we determined the speed with which K<sup>+</sup> was released in terms of the time needed for the escape of 50% of the total amount of K<sup>+</sup> eventually liberated ( $T_{50}$ ). The curve formed by plotting log  $T_{50}(y)$  against nystatin doses is assymptotic. To determine the value of the assymptote which may be interpreted as representing the maximum possible state of cell disorganization, we used the general formula:  $\log y = \log K + (\log a).b^x$  which was originally described by Gompertz (7). Since the objective is exclusively to determine the value of the assymptote, the values of doses are irrelevant. Therefore, in an adaptation of Gompert's curve the first dose becomes x = 0, the 2<sup>nd</sup>, x = 1, the 3<sup>rd</sup>, x = 2 and so on. Therefore x varies from 0 to 15 and the curve becomes assymptotic when x = infinite.

In the equation, K = values of the assymptote; a = difference between the value of the assymptote and the value of y when x = 0, b = variation in the decrease of  $T_{50}$ .

## Discussion

By analyzing the sensitivity of *S. cerevisiae* from different cultures on the basis of viability and K<sup>+</sup> release, the existence of a possible relationship between these two apparently interrelated phenomena could be investigated.

Since a variation in the chemical composition of the membrane of differently cultured cells exists (aerobiosis and anaerobiosis, containing different sterols (1, 13, 14),

---

\* Variance Analysis — 0.1% level.

it is logical to assume that differences exist with respect to their internal K<sup>+</sup> content and to the concentration of free K<sup>+</sup>.

The release of K ions can be monitored by use of ion selective electrodes (4, 11, 12) and atomic absorption spectrophotometry (19).

The method most often utilized to measure intracellular K<sup>+</sup> is to submit the suspensions to boiling and then measure the K<sup>+</sup> released in to the medium (5, 6, 15). It should be kept in mind that the membranes of a cell suspension submitted to boiling will not necessarily be so disorganized as to release all of the intracellular K<sup>+</sup>; moreover the temperature may or may not alter the concentration of free ions. When we compare it to the K<sup>+</sup> released by the action of nystatin, we cannot state for sure that the content of K ions eliminated represents the total content of K<sup>+</sup> ions "potentially" able to be liberated by the action of the polyene. Another method used is to submit a spheroplast suspension to lysis, followed by measurement of the total K<sup>+</sup> released in the medium. Even though it eliminated the temperature factor, this type of procedure leaves doubts as to the interference of other simultaneously released ions with electrode selectivity. For this reason we decided to measure the escape velocity of intracellular K<sup>+</sup> ions ( $T_{50}$ ) in terms of the time needed for the release of 50% of the total amount of liberated K<sup>+</sup> ions. This parameter provides a sensitivity measurement, since in the presence of the same nystatin concentration, the cell for which  $T_{50}$  is lowest is that displaying higher sensitivity to the drug. However, the reduction in  $T_{50}$  as a function of drug concentration is not constant, but tends to be increasingly lower, thus producing a curve which tends to be asymptotic. By employing the value of the asymptote which is a limit value, independent of the antibiotic dose, one eliminates the subjective factor of having to choose, for comparison, the results obtained at any specific dose. For identical cells, the asymptotic values are expected to have a normal distribution around the mean. Thus, if previous treatment confers a different organization to the cell, with a different sensitivity to the antibiotic, the asymptote value (K) would be the reflex of the highest point of disorganization of or damage to that cell. Thus the equation for this type of curve was determined:  $\log y = \log K + (\log a)b^x$ . This equation does not permit any deduction with respect to the mechanism of action of the drug, but rather it is used to determine from the experimental data the K values corresponding to the lowest  $T_{50}$  for different cultured cells.

When comparing the data in Table 2 with the results obtained for viability (Table 1) we conclude that the fungicidal effect of nystatin cannot be evaluated directly on the basis of K-ion loss, because the results show that the highest mortality rates (observed in aerobically grown cells — Table 1) are not necessarily associated with high speeds of K<sup>+</sup> release (low  $T_{50} = K$  — Table 2). Similarly, while the anaerobic cells containing cholesterol or ergosterol showed the same level of sensitivity to nystatin (Table 1) in terms of death rate, the K value obtained for ergosterol-containing cells is less than half the value obtained for cholesterol-containing cells (Table 2).

**Table 1** — The effect of nystatin (5 µg/ml) on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* at the logarithmic and stationary phases of growth (30min incubation)

Cells previously grown in	% of death ± 95% confidence limits	
	Logarithmic phase	Stationary phase
Aerobiosis	99.7 ± 0.28 (7)	93.1 ± 4.25 (6)
Anaerobiosis (Ergosterol)	67.5 ± 14.3 (8)	77.5 ± 16.31 (4)
Anaerobiosis (Cholesterol)	68.8 ± 14.00 (7)	87.0 ± 20.32 (5)

( ) The values in parenthesis indicate the number of assays.

Our results are in agreement with those of Kofler-Brajtburg & col. (16) in that the loss of K ions is not necessarily related to cell death or vice-versa. Chen & col. (6), using *C. albicans*, also demonstrated that there is no correlation between death and ion release in cells treated with nystatin and its methyl esters.

The results reported herein suggest that the use of polyene antibiotics, and specifically of nystatin, should be kept under controlled conditions because other factors in addition to membrane sterol must be involved. Care should thus be exercised in evaluating the toxic effect of polyene based on experimental models.

**Table 2** — Mean values of  $\bar{K}$  and  $\bar{b} \pm 95\%$  confidence limits. Cultures of *Saccharomyces cerevisiae* grown in aerobiosis and anaerobiosis (cells from logarithmic and stationary phase of growth)

Cells previously grown in	Logarithmic phase		Stationary phase	
	$\bar{K}$	$\bar{b}$	$\bar{K}$	$\bar{b}$
Aerobiosis	33.45 $\pm$ 3.81	0.77957 $\pm$ 0.0789	19.11 $\pm$ 4.40	0.80391 $\pm$ 0.057
Anaerobiosis (Ergosterol)	23.47 $\pm$ 19.2	0.79945 $\pm$ 0.0870	40.59 $\pm$ 6.04	0.79598 $\pm$ 0.039
Anaerobiosis (Cholesterol)	51.76 $\pm$ 18.24	0.75289 $\pm$ 0.0129	47.97 $\pm$ 4.53	0.75888 $\pm$ 0.018

## References

1. Alterthum, F. & Rose, A.H. — Osmotic lysis of sphaeroplasts from *Saccharomyces cerevisiae* grown anaerobically in media containing different unsaturated fatty acids. *J. gen. Microbiol.*, 77:371-382, 1973.
2. Andreasen, A.A. & Stier, T.J.B. — Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. I — Ergosterol requirement for growth in a defined medium. *J. cell comp. Physiol.*, 41:23-36, 1953.
3. Andreasen, A.A. & Stier, T.J.B. — Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. II — Unsaturated fatty acid requirement for growth in a defined medium. *J. cell comp. Physiol.*, 43:271-281, 1954.
4. Archer, D.B. & Gale, E.F. — Antagonism by sterols of the action of amphotericin B and filipin on the release of potassium ions from *Candida albicans* and *Mycoplasma mycoides* subsp *capri*. *J. gen. Microbiol.*, 90:187-190, 1970.
5. Arnold, N.; Pringle, A. & Garrison, R. — Amphotericin-B induced changes in  $K^+$  content, viability and ultrastructure of yeast — Phase *Histoplasma capsulatum*. *J. Bact.*, 141:350-358, 1980.
6. Chen, W.C.; Cou, D.L. & Feingold, D.S. — Dissociation between ion permeability and the lethal action of polyene antibiotics on *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 13:914-917, 1978.
7. Croxton, F.E. & Cowden, D.J. — Applied general statistics. London, Pitman & Sons, p. 282-319, 1962.
8. De Kruyff, B.; Gerritsen, W.J.; Oerlemans, A.; Van Dijck, P.W.M.; Demel, R.A. & Van Deenen, L.L.M. — Polyene antibiotic sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. II — Température dependence of the polyene antibiotic sterol complex formation. *Biochim. biophys. Acta*, 339:44-56, 1974.
9. Finkelstein, A. & Holz, R. — Aqueous pores created in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B. Membranes. Vol. 2 — Lipid bilayers and antibiotics. Marcel de Kker Inc., p. 377-408, 1973.
10. Gale, E.F. — Perspectives in chemotherapy. *Brit. medical J.*, 4:33-38, 1973.
11. Gale, E.F. — The release of potassium ions from *Candida albicans* in the presence of polyene antibiotics. *J. gen. Microbiol.*, 80:451-465, 1974.
12. Gale, E.F. — Johnson, A.M.; Kerridge, D. & Koh, T.Y. — Factors affecting the changes in amphotericin sensitivity of *Candida albicans* during growth. *J. gen. Microbiol.*, 87:20-36, 1975.
13. Hossack, J.A. & Rose, A.H. — Fragility of plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae* enriched with different sterols. *J. Bact.*, 127:67-75, 1976.
14. Hunter, K. & Rose, A.H. — Lipid composition of *Saccharomyces cerevisiae* as influenced by growth temperature. *Biochim. biophys. Acta*, 260:639-653, 1972.

15. Johnson, B.; White, R.J. & Williamson, G.M. — Factors influencing the susceptibility of *Candida albicans* to the polyenic antibiotics nystatin and amphotericin B. *J. gen. Microbiol.*, 104:325-333, 1978.
16. Kerst, F. & Jund, R. — Sterol replacement in *S. cerevisiae*. Effect on cellular permeability and sensitivity to nystatin. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 71:535-543, 1976.
17. Kotler-Brajtburgh, J.; Medoff, G.; Kobayashi, G.S.; Boggs, S.; Schleysinger, D.; Pandey, C. & Rinehart Jr., K.L. — Classification of polyene antibiotics according to chemical structure and biological effects, *Antimicrob. Agents Chem.*, 15:716-722, 1979.
- 18 Marini, F.; Arnow, P. & Lampen, J.O. — The effect of monovalent cations on the inhibition of yeast metabolism by nystatin. *J. gen. Microbiol.*, 24:51-62, 1961.
19. Ndzinge, I.; Peters, S.D. & Tomas, A.H. — Assay of nystatin based on the measurement of potassium released from *Saccharomyces cerevisiae*. *Analyst*, 102:328-332, 1977.
20. Stachiewicz, E. & Quastel, J.H. — Aminoacid transport in yeast and effects of nystatin. *Can. J. Biochem.*, 41:397-407, 1963.
21. Sutton, D.D.; Arnow, P.M. & Lampen, J.O. — Effect of high concentrations of nystatin upon glycolysis and cellular permeability in yeast. *Proc. Soc. exp. Biol.*, 108:170-175, 1961.
22. Vogel, A.I. — *A text-book of practical organic chemistry*. 3. ed. London, Longmans, 1957.

# **Excretion of dissolved organic matter (DOM) in the photic column by marine phytoplanktonic population from Ubatuba region\***

Armando Augusto Henriques Vieira

*Dept.<sup>o</sup> de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos, Caixa Postal 676  
13560 São Carlos SP, Brasil*

## **Summary**

It was measured the excretion from natural population at three levels in the photic column (surface, 50% and 10% of penetration of incident light on the surface). The absolute rates of excretion are in general, proportional to the total fixed carbon and decrease with the depth. Nevertheless when photoinhibition of carbon assimilation occurred on the surface, the excretion percentage increased. This was not due to the decrease of carbon photoassimilation but effectively because of the increase in the absolute amount of excretion. However, the sample of 10% relative depth, incubated on the surface, has not increased its relative excretion rate regarding to the surface during the photoinhibition period. We have obtained signs that the light intensity can interfere with the excretion rates, not because of damage caused to the cell by shocks, but probably because of interactions with others environmental factors.

## **Resumo**

*Excreção de matéria orgânica dissolvida (MOD) na coluna fótica, por populações fitoplancônticas marinhas da região de Ubatuba*

Medidas da fixação de carbono na fração dissolvida e particulada em três níveis da coluna fótica (superfície, 50% e 10% da luz incidente à superfície), na enseada do Flamengo, Ubatuba, SP. As taxas absolutas de excreção são, de um modo geral, proporcionais à quantidade total de carbono fixado e decrescem com a profundidade. Entretanto, quando ocorreu fotoinibição da assimilação de carbono na superfície, as taxas relativas de excreção aumentaram. Isto não foi devido somente ao decréscimo da assimilação total mas, efetivamente, também ao aumento da quantidade absoluta de carbono excretado. Amostras da profundidade relativa de 10%, incubadas na superfície não tiveram, no entanto, suas taxas aumentadas, comparadas com as da superfície, durante o período de fotoinibição. Foram obtidos indícios de que a intensidade luminosa pode interferir nas taxas de excreção, não por danos causados às células mas, provavelmente, por interações com outros fatores ambientais.

## **Introduction**

Since the sixtieth decade the most papers about excretion of dissolved organic matter (DOM) by marine phytoplanktonic and fresh water populations, had as their main purpose the quantification of excretion and the examination if this one was a natural and normal physiological process of the populations, or not (1, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 22, 23, 24, 31).

\* This work was supported by FINEP by the sub-project Productivity (FINEP-IOUSP)

Those papers partially answered the questions and the present one consists in the determination of the factors which lead to this excretion, interfere with it, and the verification about the meaning of the products of excretion on the marine environment.

Several works have been published on this matter clearing up doubts and outlining important points (2, 3, 4, 8, 12, 18, 19, 25, 30).

However, we are still so far away as to answer many questions and experimental data are rare. Nevertheless it is necessary to emphasize that most of the excretion data collected from marine phytoplanktonic populations, come from temperate regions and that works, with tropical populations are relatively rare and sometimes not available.

This work has aimed to establish the rate of excretion of photosynthesized products in natural populations of the photic column from a region with tropical characteristics, using four experiments at different times.

## Material and Methods

The experiments took place in Flamengo Bay-Ubatuba (SP), (Lat 23° 30'S — Long. 45° 06'W). The measurements of excretion and productivity on the photic column (surface, 50% and 10% of surface incident light penetration) were taken on April, June, and October 1977 and February, 1978. The sampling of water was carried out on Van Dorn bottle of 9 liters and dispensed into dark flasks. The collected water was filtered on a funnel with a nylon sieve, 150  $\mu\text{m}$  pore size, to retain larger zooplankton organisms. From each depth it was taken aliquots of 700ml into glass dark flasks and to them was added four ampoules of labeled  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  (10  $\mu\text{Ci}$  each).

After homogenization the aliquots were divided in four flasks of 175ml for incubation: Two clears, one black and a control fixed with formaldehyde 2% and  $\text{HgCl}_2$  0.2%. It was taken care for the samples not to receive shock by light. The incubation flasks were horizontally hanging at the corresponding depth for a period of four (10:00 — 14:00 h). During April, June and October, 1977, samples collected on a 10% relative depth were also incubated on the surface. After the incubation the samples were immediately filtered under vacuum pressure of 1/3 atmosphere on a Millipore many fold model XX1004700, using membrane filters Millipore HA 47mm diameter size. The filtered liquid was collected on kitassato flasks — 500ml.

Despite of the filtrations being rapid, care was taken for the samples not to undergo light shocks during this period. Then the filters were washed with about 70ml of filtered sea water. This washing was carried out in other kitassato flask avoiding dilutions of the filtrates. The filters were exposed during 5 minutes to HCl fumes and their borders, outside the filtration area, were cut off. After a fast air drying, the filters were dissolved in 10ml of scintillant Bray's solution (6), in boro-silicat scintillation vials. The scintillation vials with the dissolved filters were kept on a freezer till the radioactivity counting. The pH of the filtrates was adjusted to 2,5 — 2,8 with 10 N HCl. Proceeding, the filtrate was bubbled during 30 minutes with filtered air, for total elimination of the formed labeled  $^{14}\text{CO}_2$ . In the preliminary tests it was unnecessary to readjust the pH of the sample, according to the first one. Finishing the bubbling, two aliquots of 10ml were taken from the filtrates and transferred to the scintillation vials to which, by means of an automatic pipet, was added 10ml of Instagel scintillation solution (Packard). After shaking, the vials were kept in a freezer. The radioactivity of the samples was determined by a Packard liquid Scintillator, Model Tri-Carb C2425, at 20°C. The counting effectiveness varied from 78 to 83% on the filtrate measures and 85 to 90% on the filters. The effectiveness was calculated by the external standard of the counter.

The samples of the filtrates were counted during 100 minutes or at least 10.000 counts with 1 to 2% of error. The filters were counted up to 40.000 counts with an error of 0.7%. The absolute excretion rate was calculated by counting the organic dissolved

carbon in the filtrates of the clear flasks against the total organic carbon (particulate and dissolved) fixed in the clear flask. The method used for the determination of primary production was the same as Steemann-Nielsen (26) according to Teixeira (27, 28), using liquid scintillation.

The chlorophyll-a concentration was measured by Richards & Thompson method (21), with the equations of Parsons & Strickland (20).

## Results

The data summarized in Table 1 show the depths and chlorophyll-a concentrations. For a better visualization of the data, they are also shown in Figures 1 to 4.

The four experiments, which include all the seasons, are not enough to consider the work a seasonal study. However, it gives sufficient variability of the carbon assimilation which is necessary to the aim of this work, that is, to collect preliminary data for the study of the behavior of the excretion in relation to the variability in the photoassimilation in a photic column.

The experiments were carried out under different conditions of incident radiations on the surface (Figs. 1E-4E). These different intensities partially explain the variations of the relative depth of 50% and 10%.

The chlorophyll-a concentration increased from the surface to the bottom, in all experiments, especially in the determinations on 21-10-77 and 2-02-78. Nevertheless, we need to take into account, a possible error owing to a probable greater concentration of phaeophytin near to the bottom (32).

Microflagellates were predominant in the phytoplankton composition of the surface samples in all experiments. In the samples of 50% relative depth, they also prevailed, however on 24-6-77, the count of *Phaeodactylum tricornutum* was considerably high.

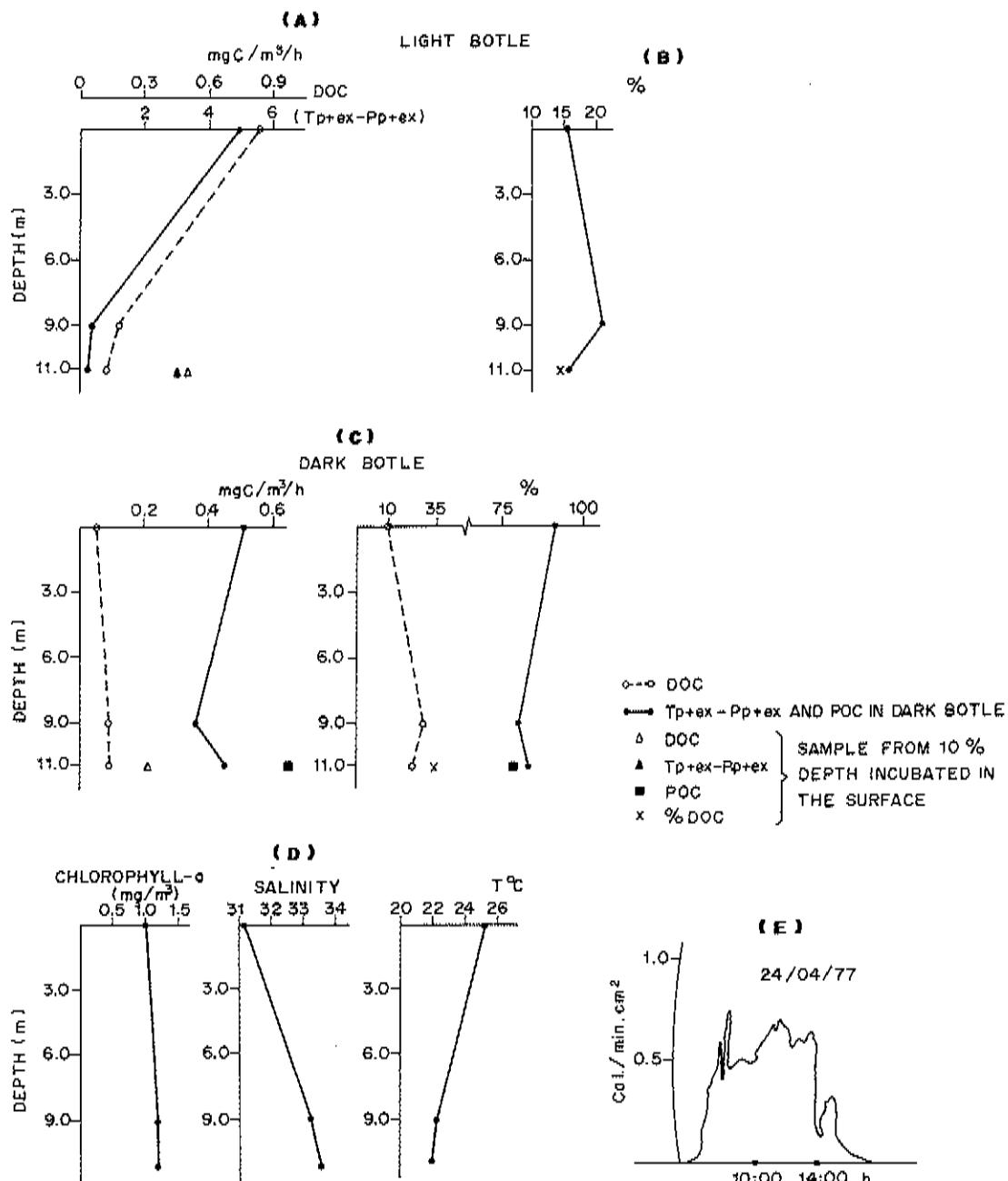
At 10% relative depth, the amount of microflagellates was also the highest, but the number of diatoms was much bigger than in other levels. The diatoms which were more prominent in the three levels were *Chaetoceros* sp., *Phaeodactylum tricornutum*, *Nitz-*

Table 1 — Carbon assimilation ( $\text{mgC/m}^3/\text{h}$ ) in dissolved and particulate fractions

Date	Depth (m)	Chlorophyll a ( $\text{mg/m}^3$ )	Total Photo- assimilation ( $T_p + ex \cdot P_p + ex$ )	Light Bottle			Dark Bottle				
				Total	Particulate	Dissolved $\text{mgC/m}^3/\text{h}$	%	Total	Particulate	Dissolved $\text{mgC/m}^3/\text{h}$	%
24/04/77	0	1.10	4.87	6.43	4.60	0.83	15.3	0.56	0.51	0.05	8.9
	9	1.21	0.38	0.83	0.65	0.18	21.7	0.46	0.36	0.09	20.0
	11	1.21	0.26	0.80	0.68	0.12	15.0	0.54	0.45	0.09	16.7
	*		3.09	4.01	3.51	0.50	12.5	0.91	0.70	0.21	23.1
24/06/77	0	1.00	7.73	8.13	7.65	0.48	5.9	0.41	0.38	0.03	7.3
	3	1.10	4.82	5.51	5.20	0.31	5.6	0.69	0.58	0.11	15.9
	8	1.44	0.33	0.71	0.64	0.07	9.9	0.38	0.33	0.05	13.2
	*		5.35	6.09	5.73	0.36	5.9	0.73	0.57	0.16	21.9
21/10/77	0	0.88	2.81	3.64	2.71	0.93	25.5	0.82	0.59	0.23	28.0
	4.5	1.01	5.29	6.64	6.11	0.53	8.0	1.35	0.83	0.52	38.5
	15	2.70	4.10	5.07	4.70	0.37	7.3	0.97	0.74	0.23	23.7
	*		3.61	4.55	4.14	0.41	9.0	0.94	0.87	0.07	7.4
21/02/78	0	0.50	4.62	5.18	4.86	0.32	6.2	0.56	0.44	0.12	21.4
	1.5	0.77	3.89	4.57	4.40	0.17	3.7	0.67	0.58	0.09	13.4
	9.5	2.53	0.66	1.78	1.68	0.10	5.6	1.12	0.94	0.18	16.1

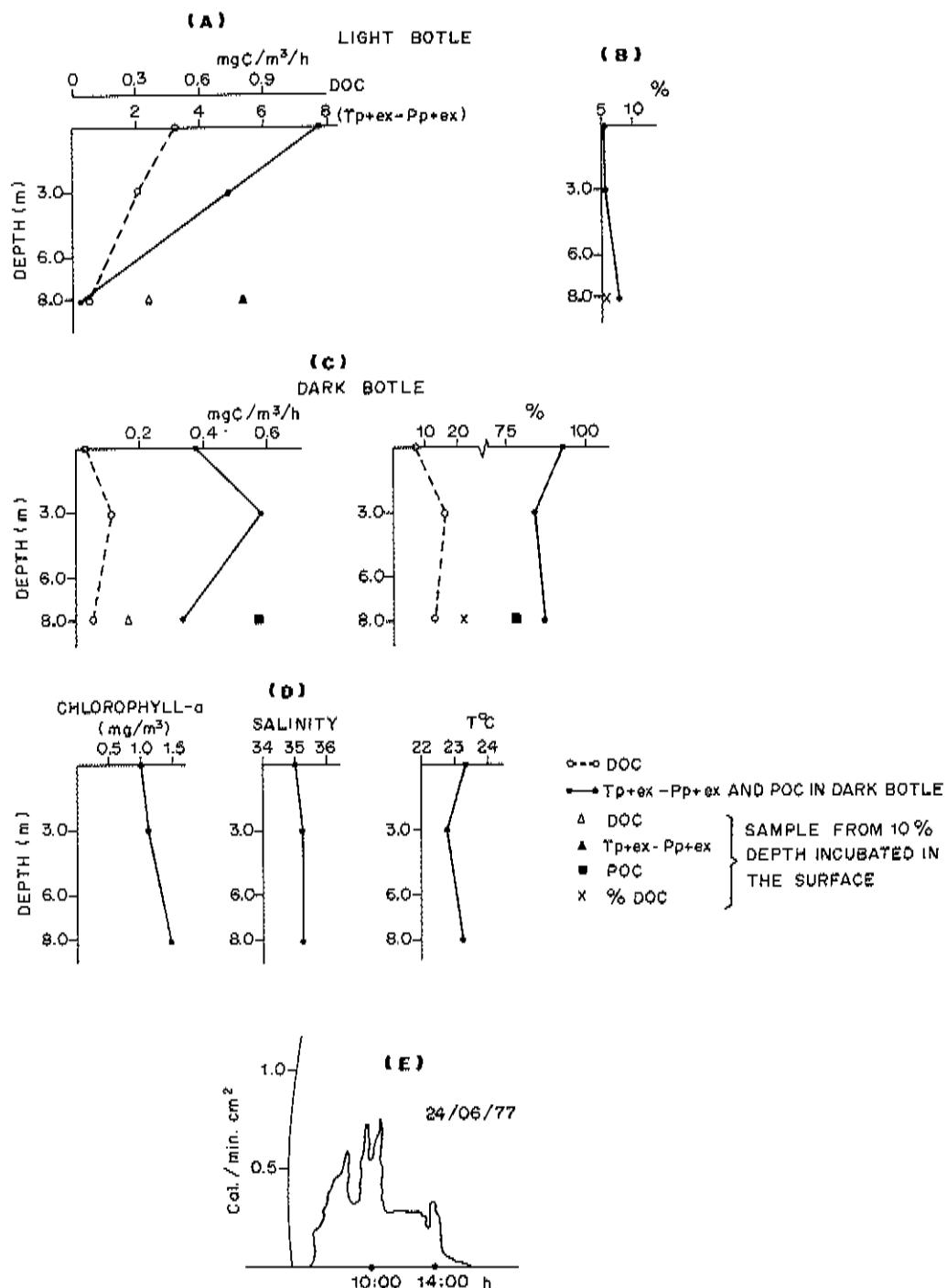
\* Amostras oriundas da profundidade de 10%, incubadas à superfície.

Figure 1 — Experiment on 24-4-77



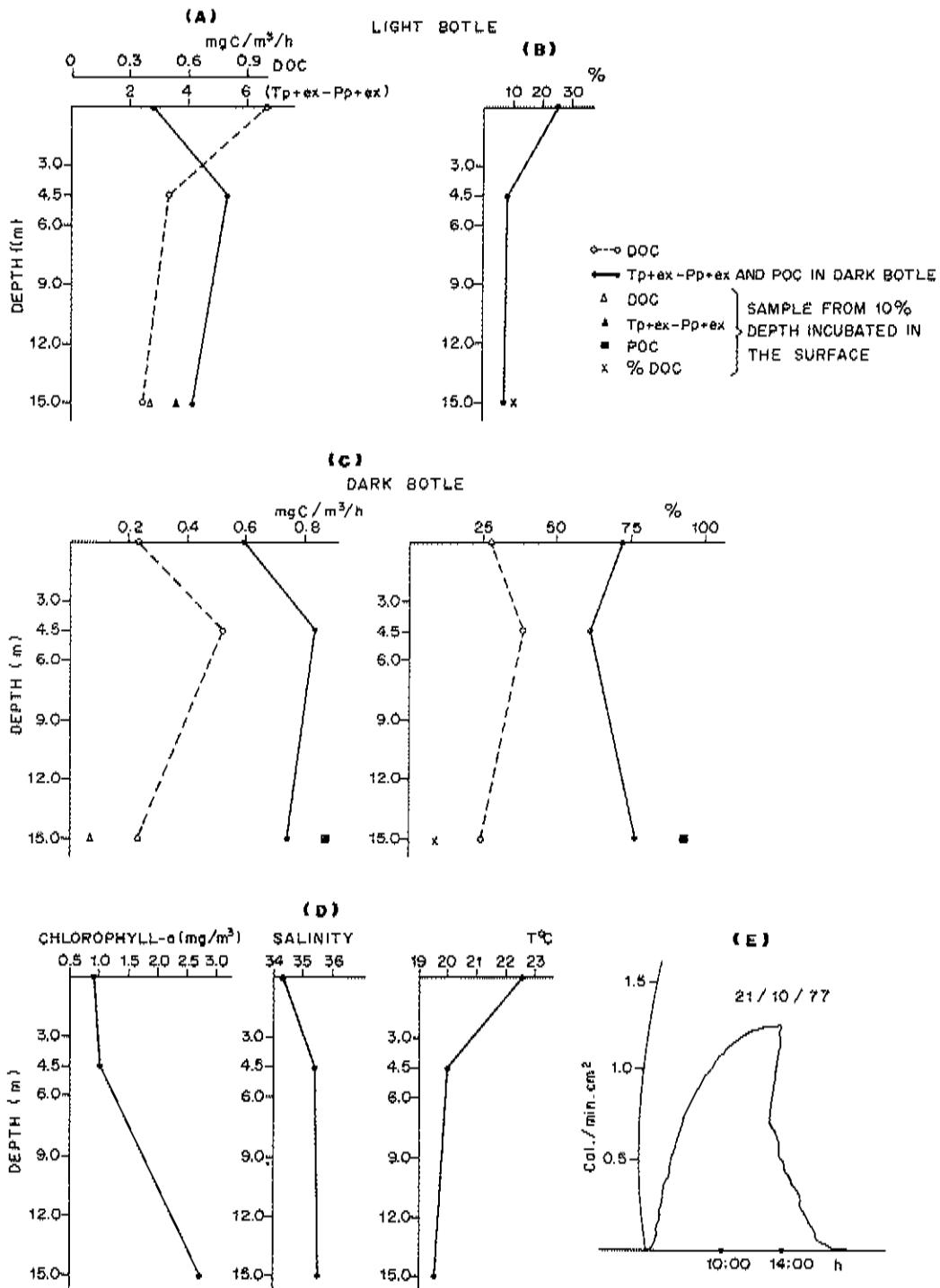
A — Photoassimilation of total carbon and dissolved in clear flask; C — Dissolved and particulate carbon in dark flask; D — Chlorophyll-a, salinity and temperature in profile during experiments; E — Diurnal radiation curve.

Figure 2 — Experiment on 24-6-77



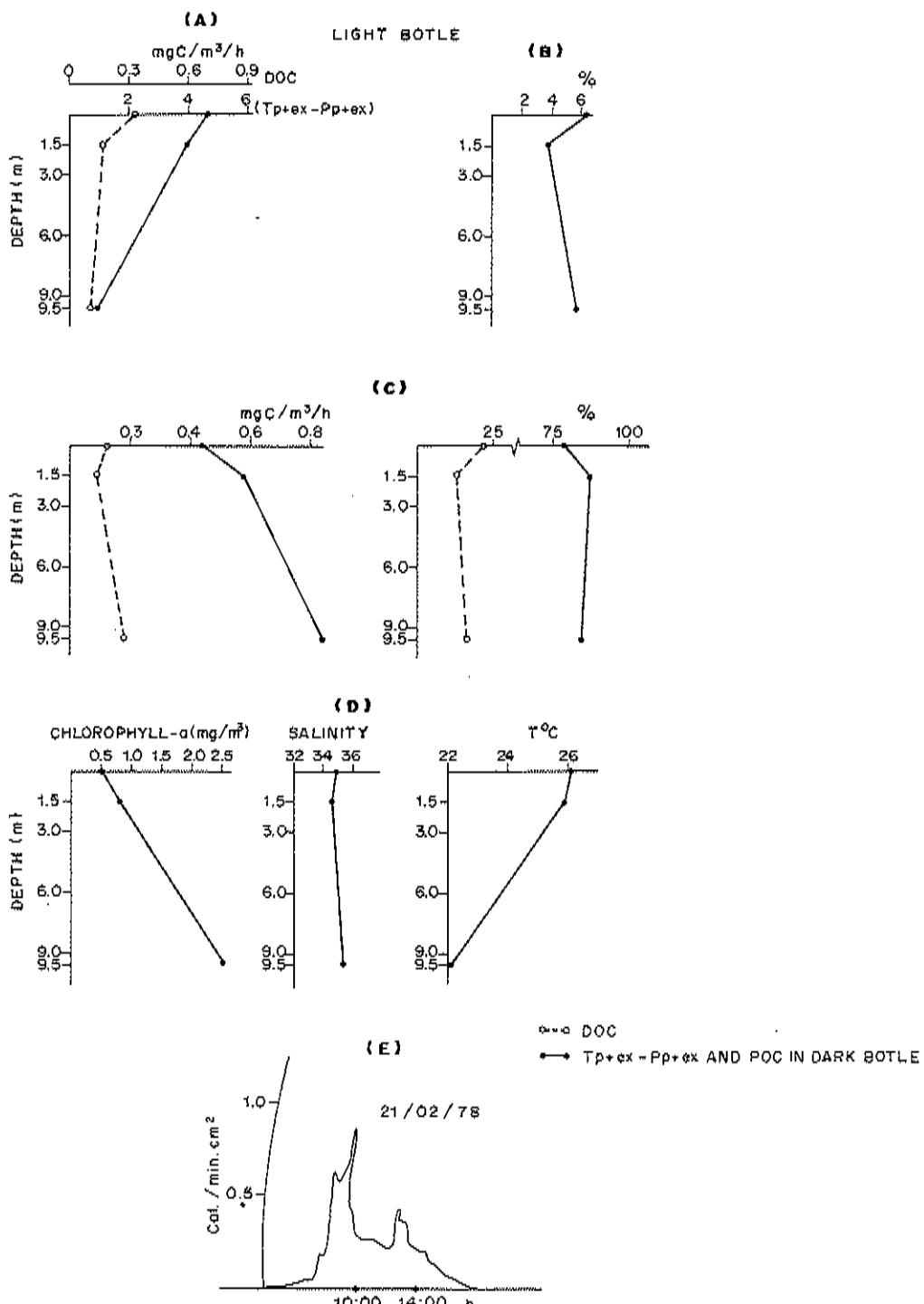
A — Photoassimilation of total carbon and dissolved in clear flask; C — Dissolved and particulate carbon in dark flask; D — Chlorophyll-a, salinity and temperature in profile during experiments; E — Diurnal radiation curve.

Figure 3 — Experiment on 22-10-77



A — Photoassimilation of total carbon and dissolved in clear flask; C — Dissolved and particulate carbon in dark flask; D — Chlorophyll-a, salinity and temperature in profile during experiments; E — Diurnal radiation curve.

Figure 4 — Experiment on 21-2-78



A — Photoassimilation of total carbon and dissolved in clear flask; C — Dissolved and particulate carbon in dark flask; D — Chlorophyll-a, salinity and temperature in profile during experiments; E — Diurnal radiation curve.

*schia longuissima* *Nitzschia* sp., *Guinardia* sp., *Coscinodiscus* sp., *Hemiaulus* sp. and *Hemidiscus* sp. The dinoflagellates were smaller in number than diatoms. The most representative genus was *Ceratium* sp. and *Procentrum* sp. The presence of blue-green alga *Oscillatoria* sp. (*Trichodesmium* sp.) was always noticed on the surface in the four experiments.

The vertical distribution of the temperature generally shows decrease according to the depth.

Teixeira (27) discovered the occurrence of stratification in the water column, during the summer in the same region: a hot surface layer and a deep one with colder water, separated by a thermocline. With just three levels it was not possible to characterize a thermocline in this work, however a vertical distribution in February and October suggests its occurrence (Figs. 3,4D).

The set of environmental conditions in the four experiments was enough variable to obtain, as desired, different patterns and values of carbon photoassimilation.

In the experiment of 21-10-77 the maximal rate for total photoassimilation ( $T_{p+ex} - P_{p+ex}$ ), 5.29mgC/m<sup>3</sup>/h, occurred in the 50% relative depth (4,5m) while in the surface it was obtained a rate of 2.81mgC/m<sup>3</sup>/h. At this same day the total photoassimilation found in a relative depth of 10% (15m) was 4.10mgC/m<sup>3</sup>/h. This, seemingly, was owing to the high luminous intensities occurred during incubation period (Fig. 3E), resulting a photoinhibition on the surface and a greater penetration of light in the photic column.

The maximum rate of total photoassimilation, found on the surface, was obtained in the experiment on 24-6-77 (7.77mgC/m<sup>3</sup>/h).

On that day the rate obtained in the relative depth of 50%, was also relatively high (4.82mgC/m<sup>3</sup>/h) and it may reflect, among other factors, the low depth which the samples were incubated as well as a great homogenization of the water column. On the other hand, in the experiment of 24-4-77, with a greater luminous intensity than 24-6-77, the total photoassimilation on the surface was lower (about 63% of the obtained on 24-6-77). In the 50% relative depth (9m) it was only 8% of the corresponding obtained on 24-6-77, in the depth of 3m. At the depth of 10%, there was no great variation in the total photoassimilation in these two days. However, considering the total productivity in the photic column, the difference stays much less marked: 26.8 and 30.6mgC/m<sup>2</sup>/h at 24-4-77 and 24-6-77 respectively.

Despite of the higher luminous intensity, the low photoassimilation on the surface on 24-4-77, is probably because of a possible stratification in the photic column on that day, not so much evidenced in Figure 1D because of the lack of intermediary points between the surface and 50%. It is also possible that the low photoassimilation was because of the high luminous intensity on that day.

The low value of total photoassimilation (4.62mgC/m<sup>3</sup>/h), on 21-2-78 during the summer, reflects the short rainy period, which began approximately from 12:30 to 14:00h, responsible for the very low intensity of incident light in the surface (Figure 4E) during the incubation period. However it is necessary to emphasize that the concentration of chlorophyll-a at that time was only 0.50mg/m<sup>3</sup>. Therefore this corresponds to less than half of the concentration on 24-4-77 which has a photoassimilation rate nearly identical. This turns the assimilation rate 21-2-78 the highest in the experimental series.

The absolute values of excretion was always higher in the surface, decreasing with the depth going along with the total photoassimilation in all experiments. There was also a decreasing in relative values of the relevant depth at 50%, in relation to the surface with exception of 24-4-77. However it was observed an increase of the relative rates of 10% relative depth, in spite of the decrease of the absolute rates. It is interesting to note that the total photoassimilation rate obtained on 24-4-77 on the surface (4.87mgC/m<sup>3</sup>/h) is very near to those of: 24-6-77 at 3m (4.82mgC/m<sup>3</sup>/h), 21-10-77 at 15m (4.10mgC/m<sup>3</sup>/h) and 21-2-78 on the surface (4.62mgC/m<sup>3</sup>/h). However, it was verified, in this case that the excretion rates do not always follow the total photoassimilation.

Despite of being obtained at different time and depth, the absolute and even the relative rates of 24-6-77 and 21-10-77 are very near, according to the well known pattern of proportionality to the productivity (1, 5, 9, 16, 29).

However the rate of 24-4-77 does not agree with this pattern. The excretion rates of 24-4-77 were much higher reflecting the influence of another factor acting on the excretion besides the fixed carbon, quantity. This factor could be the luminous intensity which was high during the incubation period, on that day. However it could be any other factor which was controlling the photoassimilation.

The action of a factor on the excretion rate of 21-10-77, independent of the fixed carbon quantity, was evident. On that day the high luminous intensity, resulted in a photoinhibition on the surface which was about 47% regarding to the relative depth of 50% (4,5m). Despite of this, the absolute excretion rate on the surface was greater in all experiments, while the total photoassimilation was the smallest obtained on the surface. On this day it was obtained de greatest absolute excretion rate for a 50% relative depth ( $0.53\text{mgC/m}^3/\text{h}$ ). This values also corresponds to a relatively great total photoassimilation ( $5.29\text{mgC/m}^3/\text{h}$ ) which was the greatest found at this depth. Possibly this great productivity must be the reason of this high absolute excretion rate.

The smallest absolute excretion rate obtained at 50% relative depth was on 21-2-78 ( $0.17\text{mgC/m}^3/\text{h}$ ), for a total photoassimilation of  $3.89\text{mgC/m}^3/\text{h}$ . Aproximately the same amount ( $0.18\text{mgC/m}^3/\text{h}$ ), at 9m, was excreted on 24-4-77 in the same relative depth of 50%. Nevertheless, the corresponding total photoassimilation was only  $0.38\text{mgC/m}^3/\text{h}$ , that was responsible for a high value of the relative excretion rate 21.7% while the previous one was only 3.7%.

At the relative depth of 10% it was observed that the relative excretion rates increased not because the increase of the amount of the absolute excretion but mainly because of the diminution of the amount of the total fixed carbon.

The carbon fixation in the particulate fraction of the dark flask, in relation to the particulate in the clear one, increased with the depth, reaching high values like: 66.2% and 51.1% and 56% respectively in the experiments on 24-4-77, 24-6-77 and 21-2-78 in the 10% relative depth. A relative value reasonably low was obtained in the experiments of 21-10-77 that, as mentioned, exhibited the greatest total photoassimilation of the experimental series at this depth.

However, on that day the percentage fixation in the dark on the surface, was greater, reflecting not only increase in the absolute amount of carbon fixation in the dark but also a downfall in the photoassimilation caused by photoinhibition.

The absolute excretion rates in the dark flask as can be seen in Figures 1-4, generally follow the carbon fixation rates in the particulate fraction (except on 24-4-77) in a similar pattern of the clear flask. However, it can be seen that the increase of the relative rates obtained in the botton, are not because of the decrease of the fixation rate of the particulate fraction, but in a general way owing to the increase of the absolute rate of the soluble fraction.

The total photoassimilation of samples at 10% relative depth incubated on the surface, underwent a decrease in relation to those of the surface at 36.5% on 24-4-77 and at 30.8% on 24-6-77, incubated on the same way. Nevertheless, on 21-10-77 there was a decrease of 28% regarding of the surface sample.

The relative excretion rates in the clear flasks of these samples on 24-4-77 and 24-6-77 are similar to the measured on the surface ones: 12.5 and 15.3% to the first and 5.9 and 5.9% to the second one. In the experiment of 21-10-77, the absolute excretion rate of the surface sample was about 75% greater than the obtained in the sample at 10% relative depth incubated on the surface despite of the lower value of the total photoassimilation on the surface sample. This was the cause of the high relative excretion rate on the surface (25.5%).

The fixation of the particulate carbon by samples from 10% relative depth incubated on the surface in the dark flask, was greater in absolute rates than the sample of the sur-

face. Probably this was because of the most higher temperature on the surface since the rate was also greater than the one of 10% samples incubated at this depth.

## Discussion

In spite of the lack of enough data for a categoric assertion, it has become evident that the excretion of DOM in the photic column does not go along with the well known pattern which follow the fixation of total carbon. At least other factors can interfere with the qualitatives aspects of the excretion. Thus, it was evident that the excretion rate on the surface samples of 21-10-77 was determined by others factors but not the total carbon fixation. In this event the most probable factors was the luminous intensity which caused, on the surface, a photoinhibition of the carbon assimilation in the particulate fraction. As there is clear stratification in the water column (Figure 3D) it could be thought in a predominant action of the nutricional deficiency on the surface. However, the assimilation of the 10% sample, incubated on the surface and in the sample of 50% relative depth, discard this probability. In the same way it may be discard the hypothesis of the high excretion rates be due to damage caused to the cells ocasioned by exposure to high luminous intensity since the 10% samples incubated on the surface, has not increased its excretion rates. On 24-4-77 when the luminous intensity was relatively high, the excretion rates of the bottom samples incubated on the surface was also lower than that of the surface.

The fact of the excretion rate at 10% depth incubated on the surface on 24-6-7, to have the same greatness of the surface sample, reinforce this hypothesis although it presents a smaller total photoassimilation when the luminous intensity was not enough high for the inhibition occurrence.

The increase verified in the excretion rates on the surface samples would be due the luminous intensity which directly or not interfere with the excretion processes, through photoassimilation process but not by damages caused to the cells. These data are not in accordance with those of Ignatiades (17) who has observed an increase of the excretion in samples of several depth incubated on the surface. However it is necessary to consider that the author has worked with populations (where *Skeletonema costatum* were predominant) from temperate zones and shade adapted. Seemingly, it did not occur in this work an increase of excretion of the surface photoinhibited samples by light shock after a short photoassimilation (19).

The increase of the excretion rates of the surface would reflect further normal processes (probably related from the adaptation to the environmental conditions, not so much favourable) like a period which these populations were previously exposed to high luminous intensity, interacting with nutritional conditions. This increase, therefore, would not be because of damages caused by light shocks. Berman & Holm-Hansen (5) attributed the highest surface excretion rates at California Gulf, to the increase of photorespiration caused by high luminous intensities.

Finally, it must be emphasized that the excretion relative rates, when there was no striking photoinhibition in the surface vary in a relatively narrow stretching, with no high absolute values. This fact points out that, at least in these experiments, great variations on the relative rates come just from the fact that changes of the total photoassimilation did not happen (19) and that the increase verified on the surface was really influenciated by other mentioned factors.

## Acknowledgments

I thank MsC. Maria Luiza Delavechia and MsC. Gilberto Moraes for their colaboration.

## References

- Anderson, G.C. & Zeutschel, R.P. — Release of dissolved organic matter by marine phytoplankton in coastal and offshore areas of the Northeast Pacific Ocean. *Limnol. Oceanogr.*, 15:402-407, 1970.
- Aubert, M. — Telemédiateurs chimiques et équilibre biologique océanique. I — Théorie générale. *Rev. Intern. Oceanogr. Méd.*, 21:5-16, 1971.
- Aubert, M. & Pesando, D. — Telemédiateurs chimiques et équilibre biologique océanique. II — Nature chimique de l'inhibiteur de la synthèse d'un antibiotique produit par une diatomée. *Rev. Intern. Océanogr. Méd.*, 21:17-22, 1971.
- Barber, R.T. & Ryther, J.H. — Organic chelators: factors affecting primary production in the Cromwell Current upwelling. *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, 3:191-199, 1969.
- Berman, R. & Holm, H.O. — Release of photoassimilated carbon as dissolved organic matter by marine phytoplankton. *Mar. Biol.*, 28:305-310, 1974.
- Bray, G.A. — A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in liquid scintillation. *Anal. Biochem.*, 1:279-285, 1960.
- Bul'yon, V.V. — Phytoplankton production measurement using  $^{14}\text{C}$  with allowance for losses of labeled organic matter during filtering. *Oceanol. Acad. Sci. URSS*, 15:347-350, 1976.
- Carlucci, A.F. & Bowes, P.M. — Production of vitamin B-12, thiamine and biotin by phytoplankton. *J. Phycol.*, 6:351-357, 1970.
- Choi, I.C. — Primary production and release of dissolved organic carbon from phytoplankton in the western North Atlantic Ocean. *Deep. Sea Res.*, 19:731-735, 1972.
- Fogg, G.E. — Extracellular products of phytoplankton and the estimation of primary production. *Rapp. Cons. Expl. Mer.*, 144: 56-60, 1958.
- Fogg, G.E. — The extracellular products of algae. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 4:195-212, 1966.
- Fogg, G.E. — Biochemical pathways in unicellular plants. In: — Copper, J.P., ed. — *Photosynthesis and Productivity in different environments*. Cambridge University Press p. 437-457. (International Biological Programme, 3), 1975.
- Hellebust, J.A. — Excretion of some organic compounds by marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 10:192-206, 1965.
- Hellebust, J.A. — Excretion of organic compounds by cultured and natural populations of marine phytoplankton. In: — Lauff, G.H., ed. — *Estuaries*. Washington, p. 361-366, 1967.
- Hellebust, J.A. — Ligths. In: — Kinne, O., ed. — *Marine Ecology*. London, Wiley Interescience, vol. 1 part 1, p. 125-158, 1970.
- Herblant, A. & Dandonneau, Y. — Excretion organique du phytoplancton et activité bactérienne hétérotrophe dans le Dôme de Guinée (Océan Atlantique Tropical est). *Doc. Scient. Centre Rech. Oceanogr. Abidjan*, 6:1-18, 1975.
- Ignatiades, L.A. — Studies on the factors affecting the release of organic matter by *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve in field conditions. *J. Mar. biol. Ass. U. K.*, 53: 923-935, 1973.
- Larsson, V. & Hagstrom, A. — Phytoplankton exudate release as an energy source for the growth of pelagic bacteria. *Mar. Biol.*, 52:199-206, 1979.
- Mague, T.H.; Friberg, E.; Hughes, D.J. & Morris, I. — Extracellular release of carbon by marine phytoplankton: a physiological approach. *Limnol. Oceanogr.*, 25:262-279, 1980.
- Parsons, T.R. & Strickland, J.D.H. — Discussion of spectrophotometric determination of marine-plant pigments, with revised equations for certaining chlorophylls and carotenoids. *J. Mar. Res.*, 21:115-163, 1963.
- Richards, F.A. & Thompson, T.G. — The estimation and characterization of plankton populations by pigment analysis. II — A spectrophotometric method for the estimation of plankton pigments. *J. mar. Res.*, 11:156-172, 1952.
- Samuel, S.; Shah, N.M. & Fogg, G.E. — Liberation of extracellular products of photosynthesis by tropical phytoplankton. *J. Mar. biol. Ass. U. K.*, 51:793-798, 1971.
- Silner, K.G.; Zingmark, R.G. & Miller, T.G. — Interpretations of  $^{14}\text{C}$  method of measuring the total annual production of phytoplankton in a South Carolina estuary. *Bot. mar.*, 19:119-125, 1976.
- Sharp, J.H. — Excretion of organic matter by marine phytoplankton: Do healthy cells do it? *Limnol. Oceanogr.*, 22:381-399, 1977.

25. Sharp, J.H.; Underhill, A. & Hughes, D.J. — Interaction (allelopathy) between marine diatoms: *Thalassiosira pseudonana* and *Phaeodactylum Tricornutum*. *J. Phycol.*, 15:353-362, 1979.
26. Steemann-Nielsen, E. — The use of radioactive carbon ( $^{14}\text{C}$ ) for measuring organic production in the sea. *J. Cons. perm. int. Explor. Mer.*, 18:117-140, 1952.
27. Teixeira, C. — Preliminary studies of primary production in the Ubatuba region. *Bol. Inst. oceanogr. (S. Paulo)*, 22:49-58, 1973.
28. Teixeira, C. — Introdução aos métodos para medir a produção primária do fitoplâncton marinho. *Bol. Inst. oceanogr. (S. Paulo)*, 22:59-92, 1973.
29. Thomas, J.P. — Release of dissolved organic matter from natural populations of marine phytoplankton. *Mar. Biol.*, 11:311-323, 1971.
30. Tolbert, N.E. — Photorespiration. In: — Stewart, W.D.P., ed. — *Algal physiology and biochemistry*. Oxford, Blackwell, p. 474-504 (Botanical Monographs, 10), 1974.
31. Williams, P.J.B. & Yentsch, C.S. — An examination of photosynthetic production excretion of photosynthetic products, and heterotrophic, utilization of dissolved compounds with reference to results from coastal subtropical sea. *Mar. Biol.*, 35:31-40, 1976.
32. Yentsch, C.S. — The relationship between chlorophyll and photosynthetic carbon production with reference to the measurement of decomposition products of chloroplastic pigments. *Mem. Inst. ital. Idrobiol.*, 18 (suppl.):323-346, 1965.

**Primeiro Seminário e Grupo de Trabalho Internacional sobre Normas de Segurança nos Laboratórios de Microbiologia, Química e rádio-química. São Paulo, 1981.**

Foi realizado em S. Paulo, de 01 a 12 de junho de 1981 e organizado pela FIOCRUZ e OPAS (Projeto BRA-3600). Constou de uma série de conferências, aulas, filmes e grupos de trabalho. As conferências foram ministradas por profissionais brasileiros representantes das Universidades e de Instituições de Pesquisas e Tecnologia. No período de 8 a 12 de junho foi ministrado curso sobre Segurança em Laboratórios Microbiológicos cujos instrutores foram os Drs. John Forney e Monica Schaeffer ambos dos EE.UU. e consultores da OPAS.

Durante o evento foram discutidos aspectos gerais e legais de segurança nos laboratórios, foram considerados os principais riscos como gases e vapores, eletricidade, substâncias químicas e rádio-químicas, incêndios; especificação de capelas; toxicologia; substâncias mutagênicas, teratogênicas e carcinogênicas; histórico e ocorrência de infecções de laboratório; aerosóis infectados e seu controle; boas práticas de laboratório e higiene pessoal; descontaminação, esterilização e controle de riscos. Foi também enfatizada a importância da formação de pessoal em prevenção e controle de acidentes de laboratório e do desenvolvimento de programas de segurança.

Um documento final sobre conclusões e recomendações foi elaborado e enviado às autoridades governamentais. Neste documento é relatado que 80% dos riscos de laboratório poderão ser evitados por uma conduta correta dos técnicos e que os 20% restantes são controláveis pelo uso adequado de instalações e equipamentos. Recomendou-se: treinamento de pessoal em todos os níveis de formação, em segurança de trabalho em laboratórios.

Que as associações de classe discutam o tema segurança de trabalho em laboratório em Congressos e Seminários. Que os Ministérios da Saúde, da Agricultura, da Previdência Social e todos os setores da Administração Pública e as Instituições que prestam serviços laboratoriais para pesquisa, ensino, controle de qualidade, implantem um programa de segurança com provimento de locais e equipamentos adequados à Segurança e Higiene do Trabalho, estabelecimento de normas de segurança e organização de comitês de segurança. Que sejam elaborados manuais de segurança em trabalhos laboratoriais e que a Associação Brasileira de Normas Técnicas elabore normas visando a segurança na construção de diversos tipos de laboratórios bem como dos equipamentos utilizados.

Uma recomendação muito especial foi feita às Entidades Financiadoras de Pesquisas para que avaliem os riscos associados às mesmas com relação às condições individuais e das instalações, reservando-se o direito quando e, se necessário, de inspecionar as condições mínimas e de segurança do local onde se realizará a pesquisa. Esta última recomendação é muito importante, pois estudos realizados no Brasil têm evidenciado um grande número de acidentes de trabalho em laboratórios principalmente entre pesquisadores e foi verificado que as normas de segurança mínimas para trabalho em laboratório não têm sido obedecidas.

Maria Therezinha Martins  
CETESB  
Av. Prof. Frederico Hermann Jr., 345  
05459 São Paulo SP

Kunkel & Dixon, eds. — *Advances in immunology*. New York, Academic Press, vol. 29, 1980.

Prosseguindo na excelente série de revisões em imunologia, o presente volume de 330 páginas aborda 6 temas: 1) Química e biologia da via alternativa do complemento; 2) Mediadores da imunidade linfocinas e monocinas; 3) Diferenciação de adaptação dos linfócitos; implicações teóricas para mecanismos de reconhecimento célula-célula e regulação da resposta imune; 4) Destrução mediada por anticorpo de células infectadas por vírus; 5) "Doença aleutiana da Marta"; 6) Influência da idade sobre o sistema imune.

O primeiro capítulo de Müller-Eberhardt & Schneider, constitui revisão quase completa de trabalhos recentes sobre a ativação da via alternativa do complemento. O assunto deixou de ser confuso e contraditório quando seis proteínas da via alternativa foram isoladas e suas propriedades como enzimas, substratos enzimáticos e reguladores foram determinados e esclarecidos, como se verifica detalhadamente na presente revisão. A descoberta da ativação da via alternativa por vários sistemas além do anticorpo é estudado com minúcias, assim como o papel preponderante de C3 e seus componentes.

O segundo capítulo sobre Mediadores da imunidade é de autoria de Rocklin, Bendzen & Greineder que atualizam o já vasto campo das linfocinas e monocinas, com efeitos biológicos sobre vários tipos de células, incluindo linfócitos T e B e macrófagos. Fatores quimiotáticos e mitogênicos, MIF, fatores auxiliares e supressores, linfotoxinas e outros, são discutidos em detalhes. Algumas destas substâncias foram isoladas e anticorpos a fatores individuais estão sendo identificados. Há evidência de que fatores considerados individuais tenham atividades múltiplas, cujo significado biológico é evidente em alguns fatores, mas ainda indefinido em outros casos.

No terceiro capítulo de autoria de Katz, as interações célula-célula na resposta imune e suas relações à região Ir e outros sítios do "complexo maior de histocompatibilidade" são revistos em detalhe. Conceito próprio, altamente especulativo, envolvendo interação celular e molecular e produtos de gen Ir resulta em teoria na qual moléculas de Cl e seus respectivos receptores anti-Cl, ainda não identificados, servem de base para explcação do fenômeno de auto-reconhecimento.

No quarto capítulo, Sissons e Oldstone estudam o efeito de anticorpo e complemento sobre células infectadas por vírus. Ativação da via alternativa é colocada em destaque. O efeito do sistema ABCC envolvendo抗ígenos vírais na destruição celular é também discutido. Reações mediadas por anticorpo participando nas infecções virais constituem o escopo principal desta revisão.

Porter, Larsen & Porter apresentam suas experiências na "doença aleutiana da Marta", modelo experimental de várias doenças imunológicas humanas, principalmente das doenças por imunecomplexos que induzem afecção renal severa.

O capítulo final é dedicado às alterações do sistema imune na velhice. Makinodam & Kay recapitulam o declínio da função imune descrita no animal de experiência e no ser humano. Muitas observações são contraditórias e conflitantes e os autores pretendem harmonizar as opiniões. Parece haver declínio gradual da função de célula-T com a idade, havendo secundariamente alteração da função da célula-B, paralelamente ao acréscimo na função supressora e consequente aumento na formação de auto-anticorpos. Aumento de imunoglobulinas monoclonais é outro achado freqüente. Tentativas em reverter estes defeitos são promissoras, pois em alguns deles são referidos sucessos.

**Abstracts of the Second International Symposium on Microbial Ecology. Coventry, England, University of Warwick, 1980.**

Apresenta resumos bastante suscintos do tema discutido durante o 2º Simpósio Internacional sobre Ecologia de Microrganismos, realizado na Universidade de Warwick, Inglaterra, de 7 a 12 de setembro de 1980. As conferências apresentadas por especialistas convidados versaram sobre: luz e atividade microbiana; atividade da água e ecologia microbiana; ambientes extremos; mecanismos de posicionamento (movimentos e quimiotaxia); aerobiologia; ecologia microbiana das interfaces; microrganismos e o desafio das moléculas recalcitrantes (não biodegradáveis ou de difícil biodegradação); seleção e evolução dos microrganismos no ambiente natural; resposta fenotípica às alterações ambientais; conservação da energia microbiana; fluxo energético e biomassa; reações e interações nos ciclos biogeoquímicos; a ecologia dos micróbios em relação aos seres humanos; interação vegetal-microrganismo; interações animal-microrganismos; antagonismo microbiano — o potencial para o controle biológico; relações predador-presa; simbiose algal; forma e função ecológica; interações positivas nas comunidades microbianas.

Cerca de 80 conferências foram apresentadas em relação a estes temas. A seção de temas livres por apresentação oral ou "posters" constou de aproximadamente 360 trabalhos.

Muitos dos resumos são excessivamente genéricos e pouco conclusivos. Consta de uma coletânea de importância para quem se dedica à área da ecologia de microrganismos pois nos dá o estado da arte deste setor. Como contém nomes e endereços de especialistas participantes é um documento útil para que se possa estabelecer contatos com pessoal de uma área que ainda não é muito bem estudada no Brasil.

Infelizmente parece ser um documento de distribuição restrita e não está sendo comercializado. Talvez seja possível obtenção de cópia do mesmo junto à Universidade de Warwick, Coventry, England.

Maria Therezinha Martins

CETESB

Av. Prof. Frederico Hermann Jr., 345  
05459 São Paulo SP

**Mac Faddin, J. — Biochemical tests for identification of medical bacteria. 2. ed. Baltimore/London, Williams & Wilkins, 1981.**

A presente edição do livro de Mac Faddin é um excelente texto de consulta para a compreensão da metodologia, da importância, interpretação e os fundamentos bioquímicos das principais provas usadas no diagnóstico dos principais grupos bacterianos patogênicos do ser humano.

São excelentes os esquemas de identificação das bactérias patogênicas incluídas nos capítulos: 37 (bactérias Gram-positivas), 38 (bactérias Gram-negativas não entero-bactérias) e 39 (Enterobactérias).

Em cada um dos capítulos existe uma vasta revisão bibliográfica que permite ao consultante aprofundar seus conhecimentos no capítulo respectivo.

Por estes motivos, recomendamos esta 2.<sup>a</sup> edição como texto obrigatório no arsenal de livros de consulta para o bacteriologista em sua atividade diária e para o estudante de bacteriologia.

Igor Mimica

*Faculdade de Ciências Médicas  
Santa Casa de São Paulo  
Rua Dr. Cesário Mota Jr., 112  
01221 São Paulo SP*

Randall, L.L. & Philipson, L., eds. — *Virus receptors. Part I-Bacterial viruses receptors and recognition*. Série B, Vol. 6. London/New York, Chapman & Hall, 147p., 1980.

O livro "Virus receptors, part I, Bacterial Viruses" faz parte da série B de volume sobre tópicos especiais de Biologia e Microbiologia, com a denominação geral de "Receptors and Recognition". É editado, desde 1976, por Chapman e Hall. Apesar deste tomo representar somente o primeiro volume de dois livros sobre a interação dos vírus com as células, pode, na realidade, ser lido independentemente do outro, por se tratar de sistemas de interação célula/bacteriófago, um grupo diferente de vírus. Já o volume II (Virus Receptors, Part 2. Animal Viruses, editado por L. Philipson e K. Lonberg-Holm) aborda exclusivamente os vírus animais. Trata-se, como indica o título "Receptors and Recognition", de uma série de volume sobre tópicos específicos no campo de estruturas de superfície das células, e a interação com outras estruturas (celulares, virais etc.) e com o meio ambiente. Cada volume é composto de algumas revisões sobre tópicos especializados da literatura, escritas por diferentes autores, eminentes especialistas nas respectivas áreas.

A interação de fagos com as bactérias é um assunto que vem sendo estudado desde as pesquisas iniciais realizada pelo grupo de Delbrück, com os fagos T-par de *Escherichia coli*. Tornou-se, porém, um tópico atual após a constatação que o uso de fagos e de mutantes bacterianos a eles resistentes facilita muito o estudo da estrutura de superfícies em Prokariotos.

Este livro apresenta os conhecimentos, adquiridos até 1980, sobre os diversos tipos de interação fago/hospedeiro, descritos na forma clara e concisa.

A introdução, de autoria de um dos editores, L.L. Randall, é escrita de forma bastante direta, representando, em 2 páginas, o menor capítulo do livro. Há, além da introdução, 5 outros capítulos de autores diferentes. Esta divisão em capítulos se dá de acordo com a estrutura celular que serve como receptor para o fago; além disso, há 2 capítulos tratando de tópicos isolados. Esta divisão é bastante aceitável, porque ordena de maneira lógica a grande quantidade de dados nos diversos sistemas de integração fago/hospedeiro. Assim sendo, há capítulos sobre: Receptores em bactérias gram-positivas; Lipopolissacáideos como receptores para fagos; Intereração de fagos com receptores proteicos; Adsorção e penetração dos fagos contendo lipídios; Penetração do ácido nucléico do fago. De uma maneira geral, em cada capítulo são revisados e discutidos, detalhadamente, os dados da literatura. Porém sem nunca perder uma visão ampla do assunto e levantando, quando possível e necessário, hipóteses para averiguação de dados conflitantes. O capítulo 2 (Phage Receptors in Gram-positive Bacteria, A.R. Archibald) é dedicado às interações entre fago e hospedeiro, encontradas nas bactérias Gram-positivas. É justificável a discussão desse assunto numa revisão, visto que a estrutura de superfície disponível como recepto-

Rains, D.W.; Valentine, R.C. & Hollaender, A., eds. — *Genetic engeneering of osmoregulation: impact on plant productivity for food, chemicals and energy*. University of California, 1979.

Entende-se por Engenharia Genética ao conjunto de técnicas que aplicam conhecimentos multidisciplinares e voltadas para a solução de problemas biológicos através da manipulação dirigida do material genético. Geralmente estas técnicas complementam aos recursos da genética, onde estes são poucos eficientes ou dificilmente aplicáveis. Este livro ilustra muito bem estes princípios discutidos durante o Simpósio sobre Engenharia Genética da Osmoregulação (Brokhaven National Laboratories College of Agricultural and Environmental Sciences, University of California, Davis, 1979). Neste simpósio ficou evidente a tentativa para interligar os esforços de cientistas de plantas e microrganismos e neste volume procura-se elucidar as bases genéticas bioquímicas e fisiológicas da tolerância a condições de stress apresentada por diferentes sistemas biológicos. Aplicando a engenharia genética da osmoregulação à área aplicada do cultivo de plantas e microrganismos, espera-se alcançar um aumento da produtividade em ambientes agrestes e eventualmente contribuir para o aumento dos suprimentos mundiais de alimentos, produtos químicos e energia.

Este volume examina o problema da osmoregulação sob vários aspectos em microrganismos procariotos e também, em plantas. Os mecanismos de osmoregulação, bem como os mecanismos de tolerância à seca e ao frio são debatidos, enfocando-se sua aplicação no melhoramento de plantas. Do mesmo modo, procura-se levantar questões ligadas às estratégias biológicas, a pesquisas colaterais de interesse e os possíveis recursos que podem ser aplicados no estudo da osmoregulação. Um dos capítulos do livro se prenega a avaliação do direcionamento da pesquisa por agências financeiras da pesquisa nos Estados Unidos, o que pode servir de exemplo para a política científica nacional.

É importante salientar que o mundo vegetal representa uma fonte ilimitada e renovável para a produção de alimentos, produtos químicos e energia. A utilização ampla desta fonte geralmente é ineficiente devido a condições inadequadas de umidade, calor e salinidade. Uma maneira de estudar e propor soluções para o problema sem dúvida está representada pelo conceito unificado das formas de stress envolvendo a seca, salinidade, condições térmicas e outras. Neste sentido o livro *Genetic Engeneering of Osmoregulation* apresenta uma proposição merecedora da atenção especial dos pesquisadores da área vegetal, além do interesse imediato de microbiologistas, fisiologistas, bioquímicos, agrônomos e outros pesquisadores.

Flávio C.A. Tavares  
Dept.<sup>o</sup> Genética ESALQ  
Caixa Postal 83  
13400 Piracicaba SP

ra, não possue a diversidade conhecida nas bactérias Gram-negativas. Sem a pretensão de ser completo, faz a revisão dos sistemas de interação mais estudados em diversos gêneros de bactérias Gram-positivas. Após uma descrição sumária da parede celular, segue-se uma discussão da interação de fagos com algumas estruturas que servem como receptores, tais como flagelos e receptores associadas com a parede celular e a membrana citoplasmática. Finaliza-se com um resumo dos temas abordados e propostas para modelos de adsorção de fagos nesse grupo. Fica claro para o leitor, que, freqüentemente, os dados ainda são sumários quando comparados com os conhecimentos sobre interação dos fagos com as bactérias Gram-negativas. No capítulo 3 (Lipopolsaccharide as a Bacteriophage Receptor, A. Wright., et al), é revisado o papel dos lipopolissacarídeos (LPS) como receptores nas bactérias Gram-negativas. Após uma descrição bastante detalhada da estrutura dos LPS, tomando-se por base seus 3 componentes principais: LPS, antígeno-O e cerne-R, segue-se a descrição de cada um desses 3 componentes como receptores de fagos. Há uma discussão bastante clara sobre os modelos de adsorção dos fagos  $P_{22}$  (em antígeno-O de *S. typhimurium*) e  $T_4$  (no cerne-R de *E. coli*). Nesse artigo, o autor foi feliz em conseguir captar e resumir a grande quantidade de dados disponíveis. O papel das proteínas da superfície como receptoras em bactérias Gram-negativas é esclarecido no capítulo seguinte. (capítulo 4. Interaction of phages with their receptor protein, M. Schwartz). Essa revisão extensa (talvez refletindo a grande quantidade de trabalhos recentes), sumariza e discute as várias proteínas que fazem parte de receptores para fagos. É sugerida, pelo autor, uma hipótese interessante de que alguns fagos só adsorvem em receptores membranosos quando em estado ativado. Além disso, recomenda-se uma modificação no modelo clássico da adsorção de fagos em 2 etapas. Também, transparece que a chamada hipótese de "Cooperação de fibras", pela quantidade de vezes que é citada, chegue a ser algo mais do que uma hipótese. O 5º capítulo (Attachment and Penetration of Lipid-Containing Bacteriophages, T. Palva & D. Bamford), é o menor, em virtude da relativa novidade do assunto e da escassez de dados. Trata dos modos de interação dos fagos contendo lipídios com os seus diversos hospedeiros. Há uma (boa) compilação de dados sobre esse novo grupo de fagos, e há uma proposta de classificação e nomenclatura dos mesmos. Ressalta a maneira especial de interação destes fagos com as células bacterianas. As conclusões se baseiam basicamente em dados obtidos por microscopia eletrônica e torna-se evidente que muitas investigações são ainda necessárias nesta área. O 6º capítulo (Bacteriophage Nucleic Acid Penetration, E. Goldberg) revisa os modos de penetração do ácido nucléico dos fagos mais bem estudados, de forma muito profunda e detalhada. O artigo apresenta, porém, uma certa redundância com os capítulos anteriores, evidentemente por se tratar de sistemas fago/hospedeiro já discutidos. Fora isso, na introdução desse artigo, se encontra uma listagem de termos específicos para o assunto, que já foram usados em capítulos anteriores. O autor, contudo, conseguiu aprofundar bem o assunto, aproveitando-se dos conceitos e termos específicos nesse campo. As referências bibliográficas citadas são bem recentes, denotando ser um assunto novo.

Uma observação deve ser feita: O sistema de referências da literatura não é constante em todos os capítulos, variando o sistema nome/ano com o sistema de números.

Resumindo: O livro é bastante atualizado e completo, sem contudo perder-se em detalhes inúteis. Será, sem dúvida, muito útil para aqueles pesquisadores que se dedicam ao estudo de fagos e para aqueles que estudam as estruturas de superfície em microorganismos procariotos. Requer, porém, conhecimentos básicos na área geral de fagos e de estruturas celulares em procariotos, impedindo portanto o seu uso como livro texto.

Jan Dirk van Elsas

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