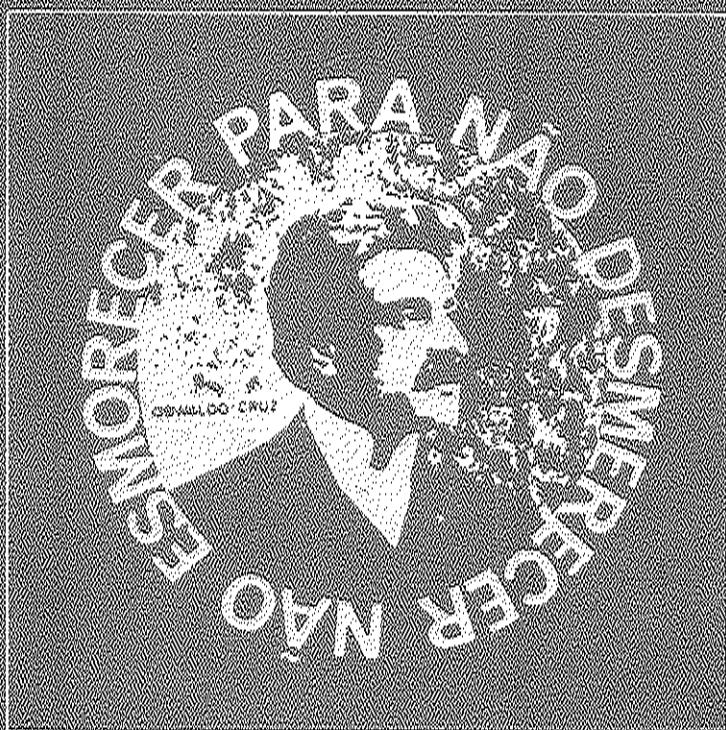


# Revista de Microbiologia



# SBM

Sociedade  
Brasileira de  
Microbiologia

São Paulo — Brasil

Volume 13 Número 3 Jul.-Set. 1982

## Instruções aos autores

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

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

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

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

**NOMENCLATURA DE MICRORGANISMOS** — A combinação binomial, nome do gênero seguido do da espécie, é adotada e a nomenclatura apresentada no "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (8.ª ed., 1974) obedecida. Se o Autor divergir dessa nomenclatura, seu julgamento será respeitado, mas a classificação correspondente ao Manual de Bergey deverá ser mencionada entre parênteses, à primeira vez em que o nome figurar no texto e no resumo.

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

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

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

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

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

Exemplo:

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

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

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

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

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

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

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

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

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



Pertence à:  
**REVISTA DE MICROBIOLOGIA - SBM**  
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374  
Cid. Universitária - USP  
(5500-9000) - São Paulo/SP

# Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia  
São Paulo — Brasil

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

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

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

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

**Aquisição por não-membros** Assinatura anual para quatro números: Cr\$ 4.000,00 para o Brasil; US\$ 25.00 (via marítima) ou US\$ 30,00 (via aérea) para o Exterior. Cheques em nome da Sociedade Brasileira de Microbiologia, para o endereço do Diretor Executivo da Revista de Microbiologia.

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

**Composição** AM Produções Gráficas Ltda.

**Impressão** Gráfica Editora Hamburg Ltda.

## Sociedade Brasileira de Microbiologia

<b>Diretoria</b>	Presidente João S. Furtado Instituto de Botânica Caixa Postal 4005 01000 São Paulo SP	Secretário Geral Maria Therezinha Martins CETESB Av. Prof. Frederico Hermann Jr., 346 05459 São Paulo SP
	Vice-Presidente Paulo Pinto Gontijo Filho Instituto de Microbiologia UFRJ Centro de Ciências da Saúde Bloco I — Ilha do Fundão 20000 Rio de Janeiro RJ	Tesoureiro Milton Mangini 01000 São Paulo SP

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

## **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  
Depto. de Microbiologia - ICB II - USP  
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 - Cid. Universitária  
CEP 05508-900 - São Paulo - SP - BRASIL  
Site: [www.revmicro.icb.usp.br](http://www.revmicro.icb.usp.br)

**REVISTA DE MICROBIOLOGIA**  
**PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA**  
**VOLUME 13 JULHO-SETEMBRO 1982 NÚMERO 3**  
**REV. MICROBIOL. (S. PAULO), 13(3)**

**CONTEÚDO**

**CONTENTS**

José Antonio G. Aleixo Carlos Gil Turnes & João B. da Silva	197	Comparação de meios de sulfito na recuperação de esporos de <i>Clostridium perfringens</i> tratadas termicamente	<i>Comparison of the recovery capacity of three sulphite media for heat treated Clostridium perfringens spores</i>
Armando A.H. Vieira & Clóvis Teixeira	206	Excreção diurna de matéria orgânica dissolvida em populações naturais do fitoplâncton marinho	<i>Excretion of dissolved organic matter by natural populations of marine phytoplankton at different time lenghts during the photo-period</i>
Maria José S. Fernandes	211	Preservação dos fungos Dematiaceae em óleo mineral I	<i>Dematiaceous fungi preserved under mineral oil I</i>
Leon Rabinovitch & Moacelio V. Silva Filho	215	<i>Bacillus licheniformis</i> IOC 2390 (ATCC 33632), nova amostra produtora de bacitracina	<i>Bacillus licheniformis</i> IOC 2390 (ATCC 33632), a new bacitracin producer strain
Francisca P. de França & Angela C.D. de Castro	225	Seleção de linhagens de <i>Aspergillus niger</i> para produção de ácido cítrico	<i>Selection of citric acid producing strains of Aspergillus niger</i>
Maria Regina F. de Toledo Cleuber F. Fontes & Luiz R. Trabulsi	230	MILI - um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase	<i>MILI - a medium for detection of motility, indole, and lysine decarboxylase</i>

Isabel C.A. Scaletsky Maria de Lourdes M. da Silva Maria Henriqueta L. dos Reis & Luiz R. Trabulsi	236	<i>Escherichia coli</i> produtoras da toxina LT, isoladas de alimentos processados	<i>Escherichia coli</i> strains producing LT toxin isolated from processed food
Hermann G. Schatzmayr Rita Maria R. Nogueira Jorge Antonio Z. Bermudez Angela T. Pinhão Brivaldo Queiroz Leila R. Venâncio Cinira E.R. de Assis & Tizuko Shiraiwa	242	Resposta sorológica à vacina de sarampo em população de baixa renda no Rio de Janeiro	<i>Serological response to measles vaccine (Schwarz strain) in a low-income population at Rio de Janeiro</i>
Ricardo Ishak Warren A. Andiman Maria de Lourdes C. Gomes & Célia M. Nakauth	244	A imunohemadsorção, através de receptores Fc, como prova diferencial no isolamento de herpetovírus	<i>Immune hemadsorption through Fc receptors as a differential routine test in the isolation of herpetovirus</i>
José Ivo Baldani Vera Lúcia D. Baldani Deise F. Xavier Robert M. Boddey & Johanna Döbereiner	250	Efeito da calagem no número de actinomicetos e na porcentagem de bactérias resistentes à estreptomicina na rizosfera de milho, trigo e feijão	<i>Effect of liming on the number of actinomycetes and on the percentage of streptomycin resistant bacteria in the rhizosphere of maize, wheat and dry beans</i>
Hassan A. Bolkan José C. Dianese Cláudio B. da Silva & José Cristino B. de Araújo	264	Influência da fonte de carbono, luz, potencial hídrico e temperatura sobre crescimento e esporulação de <i>Fusarium moniliforme</i> var. <i>subglutinans</i>	<i>Influence of carbon source, light, water potential and temperature on growth and sporulation of <i>Fusarium moniliforme</i> var. <i>subglutinans</i></i>
Alda Luiza L. dos Santos & João Lúcio de Azevedo	272	Resistência do fungo entomopatogênico <i>Metarrhizium anisopliae</i> em relação a três fungicidas	<i>Resistance of the entomopathogenic fungus <i>Metarrhizium anisopliae</i> to three fungicides</i>
Selma G.F. Leite & Francisca P. de França	279	Influência de diferentes fontes de nitrogênio no crescimento de <i>Chlorella homosphaera</i>	<i>The influence of different nitrogen sources in growth of <i>Chlorella homosphaera</i></i>

Octávio A.C. Pereira & Rosa Maria Silva	291	Vacinação oral anti- <i>Propionebacterium acnes</i> : avaliação por níveis de anticorpos séricos	<i>Anti Propionebacterium acnes oral vaccination: evaluation based on levels of seric antibodies</i>
Luiz R. Trabulsi Neusa P. Silva & Lilian R.M. Marques	297	Atividade comparada da cefoperazona e cinco cefalosporinas frente a 628 amostras de enteobactérias, <i>Pseudomonas</i> e <i>Staphylococcus</i>	<i>Comparative activity of cefoperazone and five other cephalosporins against 628 strains of Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Staphylococcus</i>

Informação Técnico-Científica SBM 301

## TRANSFORMAÇÕES 2

Conforme prevíamos ao iniciar o novo formato da Revista de Microbiologia, vol. 13(1), não conseguimos manter o sistema de fotocomposição, sem dúvida alguma responsável pela estética e característica visual da publicação.

A partir do vol. 13(3), estamos iniciando o processo de datilografia direta, que ajudará a cortar custos de produção e fazer frente às dificuldades financeiras resultantes de dois fatores: a elevação dos custos de produção e o aumento do número de páginas impressas, necessárias para atender à crescente chegada de artigos para publicação.

Esperamos que as novas transformações sejam devidamente compreendidas por autores e leitores.



## **Comparação de meios com sulfito na recuperação de esporos de *Clostridium perfringens* tratados termicamente\***

José Antonio Guimarães Aleixo

*Faculdade de Ciências Domésticas, Universidade Federal de Pelotas  
96100 Pelotas RS, Brasil*

Carlos Gil Turnes

*Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas  
96100 Pelotas RS, Brasil*

& João Baptista da Silva

*Instituto de Física e Matemática, Universidade Federal de Pelotas  
96100 Pelotas RS, Brasil*

### **Resumo**

Três meios com sulfito, disponíveis comercialmente, foram comparados quanto à sua capacidade de recuperação de esporos de *Clostridium perfringens* não tratados e tratados termicamente e quanto à produção de colônias negras. Os meios comparados foram Agar SFP (Shahidi — Ferguson — perfringens), Agar SPS (sulfito — polimixina — sulfadiazina) e Agar TSN (triptona — sulfito — neomicina), incubados a 30°C/40hs e 37°C/24hs. As contagens em SFP e SPS não foram estatisticamente diferentes. As contagens em TSN foram significativamente mais baixas. As contagens obtidas nas duas temperaturas de incubação não diferiram estatisticamente. Produziram-se colônias negras características em SFP. Em SPS e TSN produziram-se colônias negras e brancas, tanto com esporos tratados como não tratados termicamente. Progêniés de colônias brancas, cultivadas nos três meios considerados produziram colônias negras.

### **Summary**

*Comparison of the recovery capacity of three sulphite media for heat treated *Clostridium perfringens* spores*

Recovery of heat treated *Clostridium perfringens* spores in three commercially available sulphite media was compared. SFP, SPS and TSN inoculated with untreated and treated spores were incubated at 30°C/40hs and 37°C/24hs. Counts in SFP and SPS were statistically different; counts in TSN were significantly lower. Counts at both incubation temperatures were not significantly different. Black colonies were produced in SFP. In SPS and TSN black and white colonies were produced with treated and non treated spores. Subcultures of white colonies in the three media produced black colonies.

---

\* Pesquisa financiada pelo CNPq (Processo n.º 2222.0922/78).

## Introdução

*Clostridium perfringens* tipo A é um dos principais responsáveis por surtos de intoxicação alimentar na Inglaterra (23) e Estados Unidos (22). Serrano (19) relatou, em 1976, um surto de intoxicação alimentar por *Cl. perfringens* com 2.016 pessoas atingidas. Também comunicou a presença deste microrganismo em vários alimentos destinados ao consumo humano.

Os métodos utilizados na enumeração e isolamento de *Cl. perfringens* de alimentos baseiam-se na observação da reação hemolítica, em agar sangue seletivo, ou na formação de colônias negras, em agar com sulfito e ferro (21). Desde que Mossel & col. (15) propuseram um meio de cultura sólido com sulfito, para a quantificação de clostrídios sulfito-redutores em alimentos, vários meios seletivos para *Cl. perfringens* foram desenvolvidos. Destes, são correntemente usados o Agar SPS (sulfito-polimixina-sulfadiazina) (3), Agar TSN (triptona-sulfito-neomicina) (14), Agar SFP (Shahidi-Ferguson-perfringens) (20) e o Agar TSC (triptose-sulfito-cicloserina) (13).

A maioria dos estudos procura testar a eficiência do meio na recuperação de células vegetativas e esporos viáveis de *Cl. perfringens* (3, 12, 13, 14, 20). Existe, porém, pouca informação sobre a recuperação de esporos submetidos a tratamento térmico. Sabe-se que esporos de *Cl. perfringens* podem ser danificados sub-lealmente quando aquecidos, requerendo lisozima para germinarem (1, 2, 6, 7). Dos meios citados anteriormente, SFP e TSC possuem lisozima de gema de ovo.

Algumas espécies esporuladas apresentam melhor recuperação de esporos tratados por calor, quando incubadas à temperatura mais baixa que a ótima, para recuperar esporos não-tratados. Futter & Richardson (9), usando temperaturas de incubação na faixa de 18 a 45°C, para recuperar esporos de *Cl. perfringens* tratados termicamente, obtiveram contagens mais altas a 27°C. Sugiyama, citado por Roberts (18), comprovou que a incubação a 24°C ou 29°C era a mais adequada para a recuperação de esporos de *Cl. botulinum*. Prentice & Clegg (16) encontraram, para esporos de *Bacillus subtilis* 8057, tratados termicamente, contagens maiores a 30°C; porém, com esporos não tratados, as contagens foram similares na faixa de 16 a 48°C.

Shahidi & Ferguson (20) comprovaram que culturas puras de *Cl. perfringens*, cultivadas em meio SPS, foram inconsistentes na produção de colônias negras. Hall & col. (11), observaram o mesmo fato com outros *Clostridium* sulfito-redutores. Gil Turnes & col. (10) verificaram que a produção de colônias negras em meios com sulfito diminuía, à medida que aumentava o dano térmico dos clostrídios.

O objetivo deste trabalho foi comparar a eficiência de três meios com sulfito, disponíveis comercialmente, o SPS, TSN e SFP, incubados a 30 e 37°C, na recuperação de esporos de *Cl. perfringens* tratados pelo calor e verificar se o tratamento térmico influí na produção de colônias negras.

## Material e Métodos

*Meios de cultura* — Agar SPS\*, Agar TSN\*\* e Agar SFP\*\*\* foram preparados segundo as instruções dos fabricantes.

*Culturas* — Foram utilizadas as seguintes cepas de *Cl. perfringens*: III e 246, cedidas pelo Professor A.M. Serrano, do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, UNICAMP, e a cepa NCTC 8238, obtida do Central

\* Merck, lote nº 7459/601

\*\* Merck, lote nº 7511794

\*\*\* Difco, lote nº 646103

Public Health Laboratory, London, England. As cepas III e NCTC 8238 foram isoladas de surtos de intoxicação alimentar e a cepa 246 de músculo de peixe.

*Suspensão de esporos* — Culturas estoques em meio de Robertson (CMM) (21), foram conservadas em refrigerador. Para o preparo da suspensão de esporos as cepas foram cultivadas em CMM por 18hs a 37°C, transferidas (1ml) para o meio de esporulação TPAY — GT (18), e incubadas a 37°C. A porcentagem de esporulação foi determinada microscópicamente, usando-se o método de coloração de Wirtz (21). Culturas com mais de 50% de esporulação foram centrifugadas a 2040g por 30 minutos e lavadas com solução salina 0,85% estéril. O sedimento foi diluído em salina, de forma a se obter uma concentração entre  $10^5$  —  $10^7$  esporos/ml e conservado em refrigerador.

*Tratamento térmico* — Alíquotas de 0,5ml, da suspensão estoque de esporos em salina, foram distribuídas em ampolas de vidro de 100 × 7mm e seladas à chama. Cada cepa foi submetida a duas temperaturas de aquecimento, em banho-maria. Em cada experimento foram utilizadas quatro ampolas, a fim de realizar contagens após 15, 30, 45 e 60 minutos de aquecimento. No tempo 0 (zero), a contagem foi feita a partir da suspensão estoque de esporos. Não foi realizada ativação térmica dos esporos. Logo após o tratamento térmico, as ampolas foram colocadas em água gelada.

*Contagem de esporos* — Dez microlitros de diluições decimais das suspensões de esporos em meio de manutenção (0,1% peptona e 0,9% de cloreto de sódio) foram colocadas em cada uma de quatro placas de Petri, estéreis, de 5cm de diâmetro, adicionando-se a seguir os meios em estudo, fundidos e resfriados a cerca de 43°C, homogeneizando-se imediatamente. Após solidificados os meios, as placas foram colocadas em jarras anaeróbicas (Permutation, Curitiba, PR, Brasil) com Sistema Gas Pack (BBL, Cockeysville, MD, USA). A metade das placas foi incubada a 30°C/40hs e a outra a 37°C/24hs. As contagens foram calculadas pelo método de Farmiloe & col. (8).

*Análise estatística* — Os resultados dos experimentos com cada cepa constituiram um fatorial A × B × C, com os tratamentos inteiramente casualizados e em duas repetições. Os fatores de variação estudados foram, meios de cultura (A), temperatura de incubação (B) e tratamento térmico (C). Além da análise da variância, foi feita a análise de regressão polinomial para o fator C e o teste de Duncan ( $\alpha = 0,05$ ) para comparar as médias do fator A. As análises foram realizadas sobre o logarítmico das contagens.

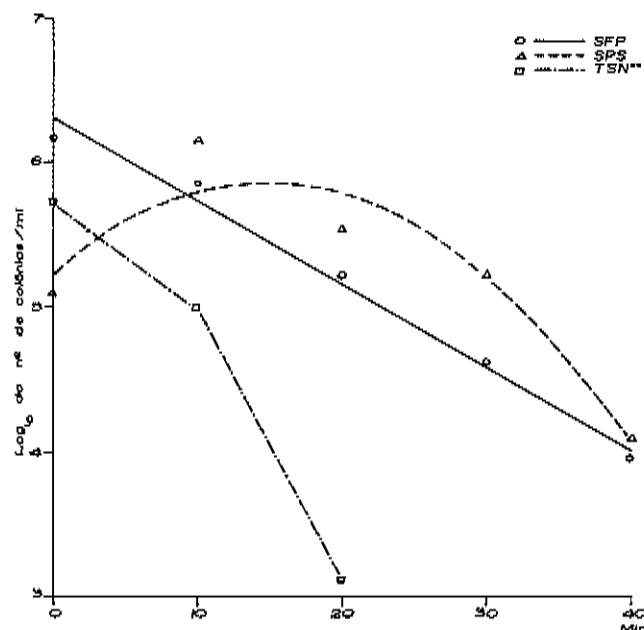
## Resultados

*Meios de recuperação* — As contagens de esporos das três cepas de *Clostridium perfringens*, antes e após o tratamento térmico, nos meios de cultura em estudo incubados a 37°C/24hs, são apresentadas nas Figuras 1, 2 e 3.

A mais alta recuperação de esporos não tratados por calor foi obtida em SFP nas duas temperaturas de incubação, exceto com a cepa 246 a 37°C. SPS foi o meio que melhor recuperou esporos tratados por calor. Em TSN ocorreram as contagens de esporos mais baixas, em todas as cepas. Com a cepa NCTC 8238 após 30 minutos a 95°C, TSN não apresentou recuperação enquanto SPS e SFP indicavam contagens ao redor de  $10^4$ /ml.

A análise da variância da recuperação dos esporos em todos os tempos de tratamento térmico é apresentada na Tabela 1. O teste F revelou que as contagens de esporos da cepa NCTC 8238 em SFP e SPS não foram estatisticamente diferentes. Os dados obtidos em TSN não foram computados para a realização desta análise, visto que, em vários tempos, este meio não apresentou recuperação. Com as cepas 246 e III as contagens nos

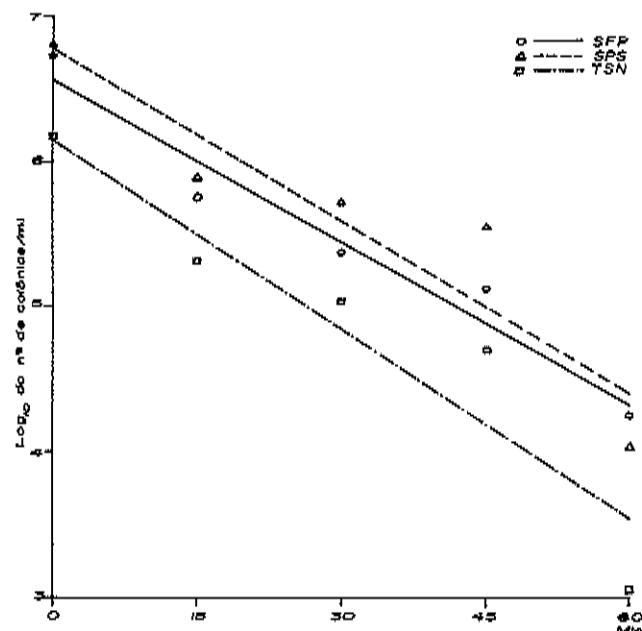
**Figura 1 — Contagem de esporos de *Clostridium perfringens* cepa NCTC 8238, aquecidos a 95°C, recuperados em SFP, SPS e TSN incubados a 37°C/24hs\***



\* Média de duas repetições.

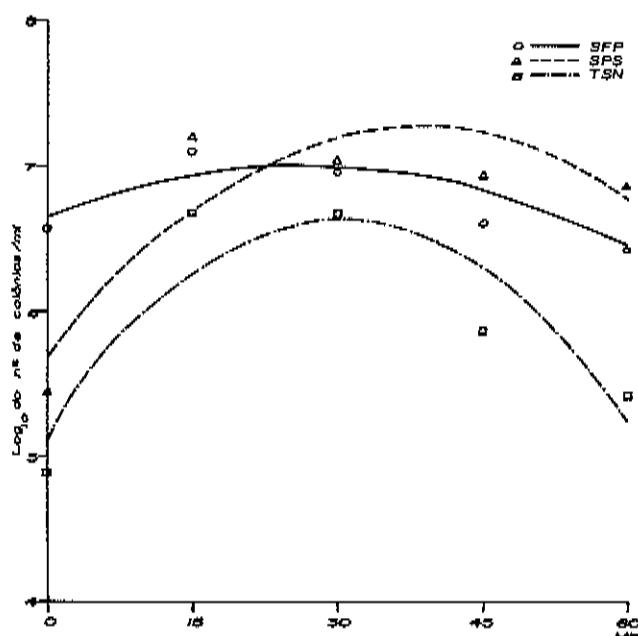
\*\* Não foi feito estudo de regressão.

**Figura 2 — Contagem de esporos de *Clostridium perfringens*, cepa 246, aquecidos a 75°C, em SFP, SPS e TSN incubados a 37°C/24hs\***



\* Média de duas repetições.

Figura 3 — Contagem de esporos de *Clostridium perfringens*, cepa III, aquecidos a 80°C, incubados a 37°C/24hs\*



\* Média de duas repetições.

três meios diferiram estatisticamente ( $\alpha = 0,05$  e  $\alpha = 0,01$ , respectivamente). Não houve diferença significativa, entre as contagens em SPS e SFP, porém, as contagens em TSN foram significativamente mais baixas ( $\alpha = 0,05$ ) (Tabela 2).

Observou-se ativação térmica dos esporos da cepa III em todos os meios. Após 60 minutos a 80°C as contagens eram ainda superiores às obtidas antes do aquecimento. Com a cepa NCTC 8238 verificou-se ativação térmica apenas em SPS e, com a cepa 246, não se observou ativação em nenhum meio de cultura.

Tabela 1 — Resumo das análises das variâncias na recuperação de esporos das cepas NCTC 8238, III e 246

Causa de variação	NCTC 8238		III		246	
	G.L.	Teste F	G.L.	Teste F	G.L.	Teste F
Meios de cultura (A)	1	0,57	2	5,63**	2	4,42*
Temp. de incubação (B)	1	0,82	1	0,16	1	0,60
Tratamento térmico (C)	4	11,70**	4	7,63**	4	10,33**
Interação A × B	1	0,22	2	0,35	2	0,13
Interação A × C	4	2,50	8	1,07	8	0,10
Interação B × C	4	0,01	4	0,01	4	0,11
Interação A × B × C	4	0,01	8	0,01	8	0,09
Resíduo	20		30		30	
Total	39		59		59	

\* = 0,05

\*\* = 0,01

G.L. = Graus de liberdade.

**Tabela 2 – Teste de Duncan ( $\alpha = 0,05$ ) para os meios de cultura nas cepas III e 246**

Cepa III		Cepa 246	
Meios de Cultura	Médias*	Meios de Cultura	Médias*
SPS	6,71 <sup>a</sup>	SPS	5,59 <sup>a</sup>
SFP	6,68 <sup>a</sup>	SFP	5,33 <sup>a</sup>
TSN	6,05 <sup>b</sup>	TSN	4,64 <sup>b</sup>

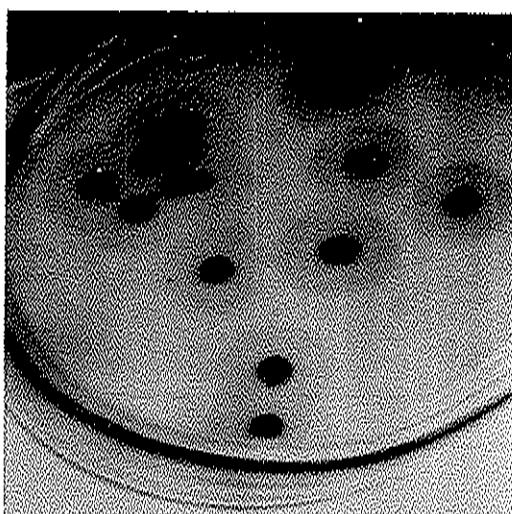
\* As médias acompanhadas da mesma letra não diferiram entre si.

*Temperatura de incubação* — As contagens a 30°C foram, geralmente mais baixas que a 37°C, tanto com esporos tratados como não tratados por calor, porém, as diferenças não foram estatisticamente significativas (Tabela 1).

*Colônias negras* — Esporos de todas as cepas, tratados termicamente ou não, produziram, em Agar SFP, colônias negras típicas, com 3 a 5mm de diâmetro (Figura 4). Eventualmente, formaram-se colônias com o centro negro e a periferia branca, na superfície da camada superior. Colônias próximas mostraram tendência a se confluirem, dificultando a contagem. O halo que se forma, devido à ação da toxina  $\alpha$  na lecitina da gema do ovo, foi perfeitamente visualizado em todas as cepas.

Em SPS e TSN, independentemente do tratamento térmico, temperatura de incubação ou cepa utilizada, surgiram, além das colônias negras, colônias brancas (Figuras 5 e 6). As colônias em SPS tinha de 1 a 2mm de diâmetro e, em TSN, 2 a 3mm. Progêneres das colônias brancas das três cepas de *Clostridium perfringens* produziram colônias negras, quando semeadas novamente em SPS, TSN e SFP.

**Figura 4 — Colônias de *Clostridium perfringens* em agar SFP (cepa NCTC 8238, 37°C/24hs)**



**Figura 5 — Colônias de *Clostridium perfringens* brancas em agar SPS (cepa III, 37°C/24hs)**

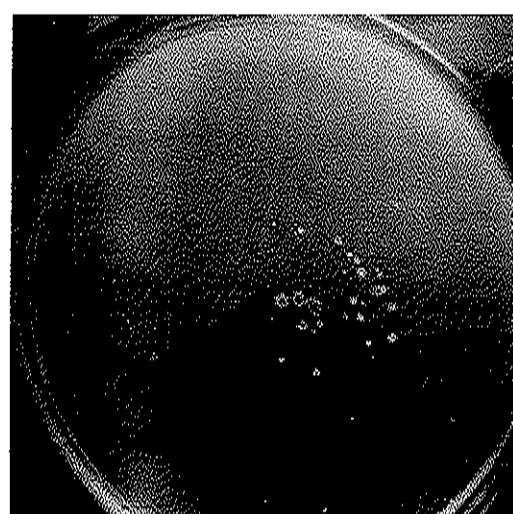
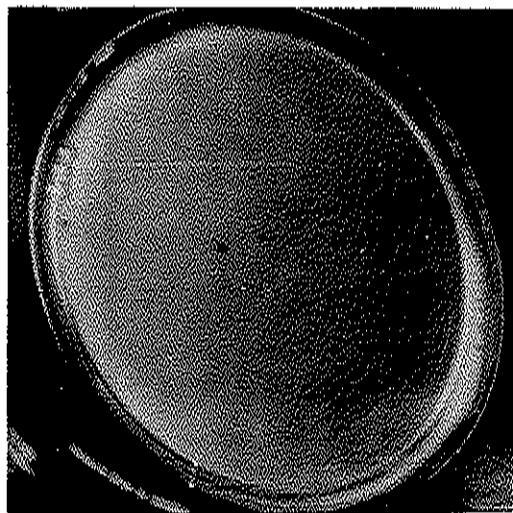


Figura 6 — Colônias de *Clostridium perfringens* em agar TSN (cepa III, 37°C/24hs)



## Discussão

Com uma exceção (cepa 246 incubada a 37°C), SFP permitiu maior recuperação de esporos de *C. perfringens* não tratados por calor. Esta recuperação foi feita a partir de suspensões de esporos não submetidos a choque térmico, portanto a contagem poderia incluir células vegetativas. Harmon & col. (2), usando estes mesmos meios preparados em laboratório e suspensões de esporos ativados termicamente, obtiveram resultados semelhantes com 10 cepas de *C. perfringens*. Porém, Barach & col. (4) não encontraram diferença entre os meios SFP, SPS e TSN na recuperação de esporos não aquecidos das cepas NCTC 8798, NCTC 10240 e ATCC 3624.

Com esporos tratados por calor, SFP e SPS mostraram recuperação significativamente ( $\alpha = 0,05$ ) mais alta que TSN, o qual mostrou-se fortemente inibidor dos esporos da cepa NCTC 8238. Cassier & Sebald (6), Duncan & col. (7) e Adams (1, 2), demonstraram a necessidade de se adicionar lisozima ao meio de cultura para conseguir melhor recuperação de esporos de *C. perfringens* tratados termicamente. Observamos, em nossas experiências, que SFP, contendo lisozima, permitiu a recuperação de esporos, de modo semelhante a SPS, que não a contém. Esta observação possivelmente seja decorrente de os tratamentos térmicos empregados não terem sido suficientes para provocar danos nos esporos que demonstrassem o efeito favorável da lisozima. Adams (1) verificou este efeito quando empregou temperaturas de aquecimento superiores a 95°C.

Dos três meios estudados, apenas Agar SFP mostrou constância na formação de colônias negras. Nos meios TSN e SPS, surgiram, freqüentemente, colônias não redutoras de sulfito, tanto com esporos tratados como não tratados por calor.

Colônias de *C. perfringens* não redutoras de sulfito foram observadas anteriormente, atribuindo-se esta característica à composição do meio (20) ou ao efeito do tratamento térmico sobre os esporos (10). Gil Turnes & col. (10) observaram que a proporção de colônias negras, na contagem total, diminuía à medida que o dano térmico aumentava. Também observaram que a incubação a 30°C/40h permitiu uma recuperação de colônias negras maior à verificada para o mesmo inóculo incubado a 37°C. Em nossas experiências não foi observada relação entre intensidade de tratamento térmico, temperatura e tempo de incubação e recuperação de colônias não redutoras de sulfito. Foi observado, porém

que a porcentagem de colônias negras aumentava, quando o meio era inoculado imediatamente após sua preparação. Brodsky & Ciebin (5) comprovaram que a forma de preparação de um meio com sulfito tinha influência na aparência das colônias de duas cepas de *Clostridium perfringens*.

A recuperação de colônias brancas não depende da intensidade do dano térmico. As progêneres obtidas de colônias brancas foram capazes de reduzir sulfito, quando semeadas nos meios testados, demonstrando que, nos tratamentos térmicos utilizados, não se foi alterada a capacidade genética de produzir as enzimas redutoras de sulfito.

O conhecimento dos mecanismos que reprimem a expressão da capacidade de produção de enzimas sulfito-redutoras, em populações de *Clostridium perfringens* recuperados de alimentos, é importante para avaliar a utilidade dos meios de recuperação no controle sanitário de alimentos.

A influência da temperatura de incubação, na recuperação de células vegetativas ou esporos, danificados pela ação de calor, radiações ou óxido de etileno, foi verificada por vários autores citados por Roberts (17). Em nossos experimentos, não foi possível detectar diferenças significativas nas recuperações de esporos tratados termicamente e incubados a 30°C/40hs ou 37°C/24hs.

Nas condições experimentais, comprovou-se que SFP é o meio mais adequado para recuperar esporos de *Clostridium perfringens*, tratados ou não por calor, já que, além de permitir recuperação, comparável à verificada em SPS e superior à obtida em TSN, permite a produção de colônias negras típicas. A temperatura de incubação de 37°C permite, em prazo menor que a 30°C, recuperações de *Clostridium perfringens* comparáveis. Não se observou relação entre a capacidade de redução do sulfito e intensidade do dano térmico.

## Referências Bibliográficas

1. Adams, D.M. — Inactivation of *Clostridium perfringens* type A spores at ultrahigh temperatures. *Appl. Microbiol.*, 26:282-287, 1973.
2. Adams, D.M. — Requirements for and sensitivity to lysozyme by *Clostridium perfringens* spores heated at ultrahigh temperatures. *Appl. Microbiol.*, 27:797-801, 1974.
3. Angelotti, R.; Hall, H.E.; Foter, M.J. & Lewis, K. — Quantitation of *Clostridium perfringens* in foods. *Appl. Microbiol.*, 10:193-199, 1962.
4. Barach, J.T.; Adams, D.M. & Speck, M.L. — Recovery of heated *Clostridium perfringens* type A spores on selective media. *Appl. Microbiol.*, 28:793-797, 1974.
5. Brodsky, M.H. & Ciebin, B.W. — Effect of heat treatment on the performance of Tryptose Sulfite-Cycloserine Agar for enumeration of *Clostridium perfringens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37:1038-1040, 1979.
6. Cassier, M. & Sebald, M. — Germination lysozyme — dépendante des spores de *Clostridium perfringens* ATCC 3624 apres traitement thermique. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, 117:312-324, 1969.
7. Duncan, C.L.; Labbe, R.G. & Reich, R.R. — Germination of heat and alkali — altered spores of *Clostridium perfringens* type A by lysozyme and an initiation protein. *J. Bacteriol.*, 109:550-559, 1972.
8. Farmiloe, F.J.; Cornford, S.J.; Coppock, J.B. & Ingram, M. — The survival of *Bacillus subtilis* spores in the baking of bread. *J. Sci. Fd. Agric.*, 5:292-304, 1954.
9. Futter, B.V. & Richardson, G. — Viability of clostridial spores and the requirements of damaged organisms. I — Method of colony count, period and temperature of incubation, and pH value of the medium. *J. Appl. Bact.*, 33:321-330, 1970.
10. Gil Turnes, C. & Roberts, T.A. — Observaciones sobre la utilidad de distintos medios de recuperación de *Clostridium* tratados por calor. *Anais Quintas Jornadas Veterinárias, La Plata, Argentina, Tomo I*, p. 1-12, 1970.
11. Hall, W.M.; Witzeman, J.S. & Janes, R. — The detection and enumeration of *Clostridium perfringens* in foods. *J. Food Sci.*, 34:212-214, 1969.
12. Harmon, S.M.; Kautter, D.A. & Peeler, J.T. — Comparison of media for the enumeration of *Clostridium perfringens*. *Appl. Microbiol.*, 22:668-692, 1971.

13. Harmon, S.M.; Kautter, D.A. & Peeler, J.T. — Improved medium for enumeration of *Clostridium perfringens*. *Appl. Microbiol.*, 22:688-692, 1971.
14. Marshall, R.S.; Steenbergen, J.F. & McClung, L.S. — Rapid technique for the enumeration of *Clostridium perfringens*. *App. Microbiol.*, 13:559-563, 1965.
15. Mossel, D.A.A.; Bruin, A.S.; Van Diepen, H.M.J.; Vendrig, C.M.A. & Zoutewelle, G. — The enumeration of anaerobic bacteria, and of clostridium species in particular, in foods. *J. Appl. Bact.*, 19:142-154, 1956.
16. Prentice, G.A. & Clegg, L.F.L. — The effect of incubation temperature on the recovery of spores of *Bacillus subtilis* 8057. *J. Appl. Bact.*, 37:501-513, 1974.
17. Roberts, T.A. — Sporulation of mesophilic clostridia. *J. Appl. Bact.*, 30:430-443, 1967.
18. Roberts, T.A. — Recovering spores damaged by heat, ionizing radiations or ethylene oxide. *J. Appl. Bact.*, 33:74-94, 1970.
19. Serrano, A.M. — Incidência de *Clostridium perfringens* em alimentos, um surto de intoxicação e evidenciação da prova de lecitinase. Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, UNICAMP, 1976. (Tese de Doutorado).
20. Shahidi, S.A. & Ferguson, A.R. — New quantitative, qualitative, and confirmatory media for rapid analysis of food for *Clostridium perfringens*. *Appl. Microbiol.*, 21:500-506, 1971.
21. Thatcher, F.S. & Clark, D.S. — Análisis microbiológico de los alimentos. España, Zaragoza, Acribia, 1973.
22. U.S. Department of Health, Education, and Welfare — Foodborne and waterborne disease outbreaks. Annual Summary, 1976. HEW Publ. No. (CDC) 78:8185, 1977.
23. Vernon, E. — Food poisoning and salmonella infections in England and Wales, 1973 — 75. *Public Health (London)*, 91:225-235, 1977.

## **Excreção diurna de matéria orgânica dissolvida em populações naturais do fitoplâncton marinho\***

Armando Augusto Henriques Vieira

*Dept.<sup>o</sup> de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos  
Via Washington Luiz, km. 235  
13560 São Carlos SP, Brasil*

& Clóvis Teixeira

*Instituto Oceanográfico USP, Cidade Universitária  
05508 São Paulo SP, Brasil*

### **Resumo**

Com o objetivo de se determinar as taxas de excreção em diferentes horários do fotoperíodo e em tempos de incubação diferentes, visando a utilização dessas taxas na correção de medidas de produção primária, efetuou-se vários experimentos com populações naturais da região de Ubatuba. Foram feitas "in situ" medidas de excreção e de produtividade de 2 em 2 horas, do nascer ao pôr do Sol; de 6 horas e de 12,5 horas. A produtividade diurna calculada através de incubação de 6 horas foi cerca de 8% menor do que quando calculada por períodos de incubação de 2 horas, do nascer ao pôr do Sol. Quando a produtividade é calculada por incubação durante todo o fotoperíodo (12,5 horas) a diferença é bem mais acentuada, cerca de 57% daquela calculada por períodos de 2 horas. Apesar das variações das taxas de produtividade, as taxas de excreção tiveram uma variação insignificante, quando integradas para o fotoperíodo total.

### **Summary**

*Excretion of dissolved organic matter by natural populations of marine phytoplankton at different time lengths during the photoperiod*

Several experiments were done with natural populations from the Ubatuba region, for establishing the excretion rates at different hours of the photoperiod and at different incubation times. The purpose was the correction of primary production measurements. Excretion and productivity measurements were carried out "in situ" at surface each 2 hours from sunrise to the sunset, and periods of 6 and 12.5 hours were also used. The diurnal productivity calculated through 6 hours of incubation was about 8% smaller than when it was calculated for incubation periods of 2 hours. The productivity rate obtained with the use of a 12.5h incubation period (whole photoperiod) was about 57% of that obtained with the 2 hours period.

---

\* Trabalho efetuado com o apoio financeiro da FINEP através do sub-projeto Produtividade (FINEP-IOUSP).

## Introdução

Atualmente o fato das espécies do fitoplâncton excretarem matéria orgânica dissolvida (MOD) para o meio como, aliás, qualquer outra célula viva o faz, já é bem aceito e comprovado (1, 2, 3, 4, 6, 9, 10, 18).

Entretanto, muitas dúvidas ainda restam no que se refere ao entendimento desse processo fisiológico quanto aos fatores que interferem e a maneira como interferem na excreção. Entre eles poderíamos citar a intensidade luminosa, a duração do período de luz e o período diurno em que é feita a determinação. O nosso objetivo com este trabalho foi determinar o efeito não só do tempo de duração da incubação bem como do horário do foto-período (do nascer ao pôr do sol) nas taxas de excreção, para considerá-las, ou não, nas correções das medidas de produção primária.

## Material e Métodos

Os experimentos foram efetuados no dia 18/03/78 com populações naturais da Enseada do Flamengo, Ubatuba (SP) (Lat. 23°30'S — Long. 045° 06'W). As amostras da população foram coletadas à superfície a cada 2 horas, desde o nascer até o pôr do Sol. Depois de filtradas em malha de 150 µm as amostras foram incubadas durante 2 horas. Foram também incubadas amostras durante 6 horas (das 06:00h às 12:00h e das 12:00 às 18:30h), e também por 12,5h (das 06:00h às 18:30h). Em cada horário, foi coletada uma amostra de 700ml. A essa amostra foi adicionado o  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  (40 µm) e após ser bem homogeneizada, a amostra foi subdividida em quatro frascos de incubação: dois transparentes, um preto e um controle. Os frascos, a seguir, foram incubados "in situ" à superfície. Detalhes sobre a preparação dos controles e de toda a metodologia empregada na determinação da atividade dos excretados, são dados em Vieira & Aidar-Aragão\*.

Os dados de excreção são apresentados em  $\text{mgC/m}^3/\text{h}$  e  $\text{mgC/m}^3/\text{dia}$  e em porcentagem do total assimilado no frasco transparente (T).

A metodologia empregada nas determinações da produção primária é a de Steemann-Nielsen (13) como descrita em Teixeira (16), com o uso de cintilação líquida. A concentração de clorofila *a* foi medida pelo método descrito por Richards & Tompson (12), utilizando-se das equações apresentadas por Strickland & Parsons (14).

## Resultados

Na Tabela 1 são apresentados os resultados de excreção e produtividade, quantificados de 2 em 2 horas desde o nascer até o pôr do sol e em 6:00h e 12,5h de incubação. São apresentados também os valores de clorofila *a*. Na Figura 1, os dados de excreção e produtividade são mostrados graficamente, para uma melhor visualização, bem como a curva de radiação global, da variação da temperatura e clorofila *a* durante o período de luz do dia 18/03/78.

Aparentemente as marés tiveram pouca influência nas variações de temperatura e concentração de clorofila *a* durante o período. Na composição do fitoplâncton durante o experimento, predominaram os microflagelados seguidos pelas diatomáceas *Nitzschia longissima*, *Chaetoceros* sp., *Guinardia* sp., *Thalassiosira* sp. e *Coscinodiscus* sp. A seguir vieram os dinoflagelados *Ceratium* sp. e *Peridinium* sp. Silico-flagelados apareceram ocasio-

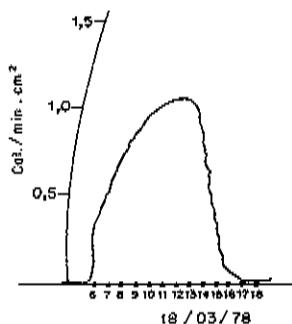
\* Vieira A.A.H. & Aidar-Aragão, E. — Utilização de técnicas de cintilação líquida no estudo da excreção de matéria orgânica dissolvida pelo fitoplâncton. Bol. Inst. Oceanogr., S. Paulo. (no prelo).

**Tabela 1 — Assimilação diurna de carbono na fração particulada e dissolvida. Fotoassimilado total e porcentagem de excreção. Dados em mgC/m<sup>3</sup>/h e porcentagem da excreção em relação ao fixado total no frasco T**

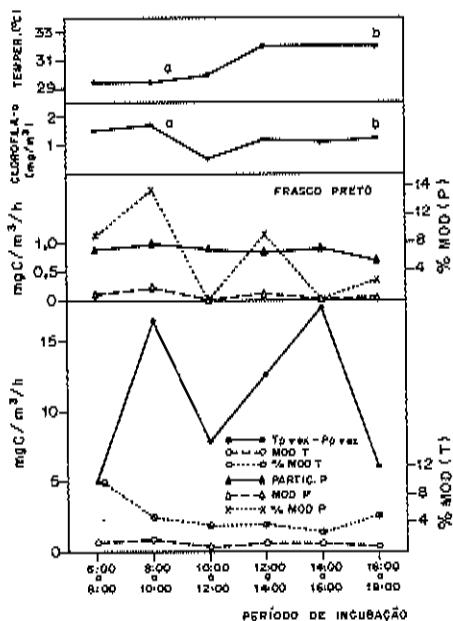
Horário de Incubação	Clorofila a (mg/m <sup>3</sup> )	Fotoassimilado Total ( $T_{p+ex} - P_{p+ex}$ )	Assimilado Total no Frasco T	Excretado (MOD)			Produção diurna (mgC/m <sup>3</sup> )	
				(mgC/m <sup>3</sup> /h)	%	Dissolvida	Particulada	Fotoassimilado Total ( $T_{p+ex} - P_{p+ex}$ )
06:00 - 08:00	1.54	4.50	5.52	0.55	10.0			
08:00 - 10:00	1.67	16.35	17.82	0.80	4.5			
10:00 - 12:00	0.55	7.85	8.74	0.32	3.7			
12:00 - 14:00	1.22	12.72	13.72	0.52	3.8			
14:00 - 16:00	1.10	17.38	18.28	0.49	2.7			
16:00 - 18:30	1.33	6.20	6.92	0.34	4.9			
06:00 - 12:00	1.54	10.04	10.46	0.47	4.5	5.9(4.5%)	124.8	125.5
12:00 - 18:30	1.22	10.05	10.40	0.40	3.8	5.0(3.8%)	125.0	125.6
06:00 - 18:30	1.54	6.20	6.56	0.43	6.6	5.4(6.6%)	76.6	77.5

**Figura 1 — Curva diurna da excreção e produção primária.**

Fotoassimilação de carbono total, dissolvido e particulado no frasco transparente e fixação do carbono particulado dissolvido no frasco preto. Excreção relativa ao assimilado total no frasco transparente



Curvas diurnas de temperaturas, clorofila-a e radiação solar global, T = frasco transparente; P = frasco preto; a = maré alta; b = maré baixa



nalmente e em pequeno número. A cianofícea *Oscillatoria* sp. (*Trichodesmium*) também esteve presente em todo o período de luz.

É importante notar-se que valores diferentes de produtividade primária diurna são obtidos com diferentes tempos de incubação das amostras. A produtividade integrada para o período de luz (12,5h) foi 135,4mgC/m<sup>3</sup>/dia quando determinada por incubação de 2 em 2 horas, do nascer ao pôr do Sol. Em períodos de incubações de 6 horas, das 06:00 às 12:00 horas e das 12:00 às 18:30 horas, a produtividade diurna, calculada pelos dois períodos, sofreu um decréscimo de 8%, apesar de haver boa concordância nos dois períodos de 6 horas; 125,5 e 125,6mgC/m<sup>3</sup>/dia no período da manhã e da tarde, respectivamente. O decréscimo foi maior quando a produtividade foi determinada por valores de fixação de carbono obtidos em 12,5 horas de incubação; 77,5mgC/m<sup>3</sup>/dia, ou seja, apenas 57,2% da taxa diurna determinada com incubação de 2 em 2 horas durante todo o período de luz.

A curva de variação do fotoassimilado total ( $T_{p+ex} - P_{p+ex}$ ) da Figura 1, mostra uma pronunciada inibição da produção no período 10:00 - 12:00 horas o que coincide com o pico máximo da curva da radiação global obtida nesse dia. Pode-se observar ainda na curva de produtividade dois picos de fixação de carbono com valores muito próximos, um no

período 08:00 – 10:00 horas e outro no período 14:00 – 16:00 horas, que fazem a curva tomar um aspecto quase simétrico. Porém, o pico da manhã que é ligeiramente menor ( $16\text{mgC/m}^3/\text{h}$ ) do que o da tarde ( $17,38\text{mgC/m}^3/\text{h}$ ), foi obtido com uma radiação de quase o dobro daquela do período da tarde e também com uma concentração de clorofila a ligeiramente maior.

A fixação de carbono na fração particulada do frasco preto, em termos de porcentagem do fixado total no frasco transparente, foi alta nas primeiras e últimas horas do período de luz. Isso foi uma consequência direta dos baixos índices de assimilação de carbono na luz, nesses horários, e da pequena variação da fixação no escuro durante o período de luz, incluindo-se (o que é de se ressaltar) o período 10:00 – 12:00 horas quando houve inibição da fixação de carbono nos frascos transparentes.

A curva da variação da fixação de carbono na fração dissolvida (MOD), de um modo geral, acompanha a do fotoassimilado total, com variações que podem ser consideradas de pequena amplitude, se comparadas com as variações do fotoassimilação total.

A excreção de MOD durante o máximo de fotoassimilação total no período da manhã (08:00 – 10:00 horas), foi  $0,80\text{mgC/m}^3/\text{h}$  e no horário de máxima fotoassimilação total do período da tarde (14:00 – 16:00 horas) foi  $0,49\text{mgC/m}^3/\text{h}$ . As taxas de excreção, ligeiramente maiores durante o período da manhã, podem refletir a maior quantidade de luz nesse período o que se pode evidenciar pela inibição da fotoassimilação total no período 10:00 – 12:00 horas.

## Discussão

Apesar de se verificar uma relação direta entre a quantidade excretada e o total fotoassimilado, verifica-se também, no início do fotoperíodo, que a taxa relativa de excreção é alta (10%). Isso não se deve, como pode parecer, somente à baixa assimilação total no início do período (20) mas, efetivamente, também à maior quantidade absoluta de MOD excretada. Infelizmente, não se pode manter uma discussão consistente com apenas um dado.

As taxas de excreção diurna, no entanto, foram relativamente baixas e concordam com as obtidas, para populações costeiras, por outros autores (5, 7, 21).

Pela produtividade obtida, essas populações enquadram-se naquelas encontradas nas estações do Tipo "V", Vieira & Teixeira\*.

As taxas absolutas de excreção, ligeiramente mais elevadas no período da manhã (06:00 – 12:00h) do que no período da tarde, poderiam refletir a maior intensidade luminosa naquele período, não por danos causados às células pelas altas intensidades luminosas mas, provavelmente, decorrentes de um processo fisiológico normal de adaptação das populações ao regime de luz (19).

O fato das taxas determinadas com 2, 5 e 12,5 horas de incubação serem muito próximas, considerando-se a variação da produtividade, foi até certo ponto surpreendente.

Esperava-se que com o aumento do tempo de incubação a quantidade de MOD diminuisse devido à atividade heterotrófica nos frascos de incubação. Contudo, essa diminuição foi muito pequena. Uma explicação possível seria que com o aumento de tempo de exposição das populações ao  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  a reserva, ou estoque, de carbono nas células fosse uniformemente marcado e a quantidade de MOD marcada excretada aumentaria até uma taxa constante (8, 11, 17).

Para concluir, podemos afirmar que para efeito de correção de medidas de produção primária, as taxas de excreção, com exceção daquelas determinadas no início do foto-

\* Vieira, A.A.H. & Teixeira, C. — Excreção de matéria orgânica dissolvida por populações fitoplancônicas marinhas da costa leste e sudeste do Brasil. Bol. Inst. Oceanogr., S. Paulo (no prelo).

período, variaram insignificantemente com o período de incubação e podem portanto ser desprezadas, já que são relativamente baixas, quando se efetua as medidas em populações costeiras.

Contudo, o efeito qualitativo dessa MOD excretada no meio e a cinética desse processo fisiológico são assuntos que não podem deixar de ser considerados.

Assim, como já foi ressaltado, a presente pesquisa deverá ser corroborada com novas medições e observações.

## Referências Bibliográficas

1. Aaronson, A. — The synthesis of extracellular macromolecules and membranes by a population of the phytoflagellate *Ochromonas danica*. Limnol. Oceanogr., 16:1-9, 1971.
2. Aaronson, S. — Excretion of organic matter by phytoplankton "in vitro". Limnol. Oceanogr., 23:838, 1978.
3. Aaronson, S.; Dhawale, W.; Patni, N.J.; De Angelis, B.; Frank, O. & Baker, H. — The cell content and secretion of water: soluble vitamins by several freshwater algae. Arch. Microbiol., 112:57-59, 1977.
4. Aubert, M. — Telemédiateurs chimiques et équilibre biologique océanique. I — Théorie générale. Rev. Intern. Oceanogr. Méd., 21:5-16, 1971.
5. Berman, R. & Holm-Hansen, O. — Release of photoassimilated carbon as dissolved organic matter by marine phytoplankton. Mar. Biol., 28:305-310, 1974.
6. Carlucci, A.F. & Bowes, P.M. — Production of vitamin B-12, thiamine and biotin by phytoplankton. J. Phycol., 6:351-357, 1970.
7. 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.
8. Eppley, R.W. & Sloan, P.R. — Carbon balance experiments with marine phytoplankton. J. Fish. Res. Bd. Canada, 22:1083-1097, 1965.
9. Guillard, R.R.L. & Wangersky, P.J. — The production of extracellular carbohydrates by some marine flagellates. Limnol. Oceanogr. 3:449-454, 1958.
10. 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.
11. Nalewajko, C. & Marin, L. — Extracellular production in relation to growth of four planktonic algae and of phytoplankton populations from Lake Ontario. Can. J. Bot., 47:405-413, 1969.
12. 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.
13. 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.
14. Strickland, J.D.H. & Parsons, T.R. — A manual of sea-water analysis. 2. ed. (rev.) Bull. Fish. Res. Bd. Can., 125:1-203, 1968.
15. Teixeira, C. — Preliminary studies of primary production in the Ubatuba region. Bol. Inst. Oceanogr. (S. Paulo), 22:49-58, 1973.
16. Teixeira, C. — Introdução aos métodos para medir a produção primária do fitoplâncton marinho. Bol. Inst. Oceanogr. (S. Paulo), 22:59-92, 1973.
17. Thomas, J.P. — Release of dissolved organic matter from natural populations of marine phytoplankton. Mar. Biol., 11:311-323, 1971.
18. Tolbert, N.E. & Zill, L.P. — Excretion of glicolic acid by some algae during photosynthesis. J. Biol. Chem., 222:895-906, 1956.
19. Vieira, A.A.H. — Excretion of dissolved organic matter (DOM) in the photic column by marine phytoplankton population from Ubatuba region. Rev. Microbiol. (S. Paulo), 13:83-94, 1982.
20. Wangersky, P.J. — Production of dissolvid organic matter. In: — Kinne, O., ed. — Marine ecology. Chichester, John Wiley, v. 4, p. 115-220, 1978.
21. Williams, P.J. de B. & Yentsch, C.S. — A examination of photosynthetic production, excretion of photosynthetic products, and heterotrophic utilization of dissolved organic compounds with reference to results from coastal subtropical sea. Mar. Biol., 35:31-40, 1976.

## Preservação dos fungos Dematiaceae em óleo mineral I

Maria José S. Fernandes

Dept.<sup>a</sup> de Micologia, Centro de Ciências Biológicas UFPE, Cidade Universitária  
50000 Recife PE, Brasil

### Resumo

Foram examinadas culturas de 34 espécies de fungos *Dematiaceae*, pertencentes ao acervo da Micoteca do Departamento de Micologia (URM), da Universidade Federal de Pernambuco, mantidas em óleo mineral esterilizado, num período entre 8 e 22 anos. Dessas espécies, 31 conservaram as características morfológicas e se mostraram viáveis, quando repicadas para batata-dextrose-ágar (BDA), enquanto três desenvolveram-se pobremente e não apresentaram esporulação.

### Summary

*Dematiaceous fungi preserved under mineral oil I*

Cultures of 34 species of *Dematiaceae* fungus kept in sterilized mineral oil, at the culture collection of the Department of Mycology (URM) at the Federal University of Pernambuco, for periods ranging from 8 to 22 years were examined for their viability. Thirty one species remained viable and maintained their morphological characteristics when transplanted into potato-dextrose-agar (BDA), while three species showed poor growth and no sporulation.

### Introdução

O método de preservação de culturas de fungos em óleo mineral esterilizado vem sendo usado, com sucesso, na Micoteca do Departamento de Micologia da UFPE, desde o início do seu funcionamento, em 1954. No acervo, encontram-se cerca de 2.500 culturas de diferentes grupos taxonômicos, procedentes de instituições científicas locais, nacionais e estrangeiras.

O estudo, iniciado com as culturas dos fungos *Dematiaceae*, tem como objetivo fazer uma revisão das espécies mantidas na Micoteca URM, testando sua viabilidade.

O método de preservação em óleo foi utilizado pela primeira vez, para fungos, por Sherf (13), em 1943 e a sua eficiência vem sendo demonstrada desde então por diversos pesquisadores (2, 4, 8, 9, 12). Braverman (1), em estudos com *Helminthosporium*, comprovou a longevidade e a patogenicidade de algumas espécies desse gênero, com cinco a 15 anos de preservação por esse método. Da mesma forma, foi comprovada a viabilidade de 26 cultivos de Basidiomycetes isolados de madeira, após 27 anos de estocagem (10).

Outros métodos de conservação para fungos têm sido reconhecidos como eficientes, sendo usados em muitos centros de pesquisa. Entre esses, destacam-se a liofilização,

ideal para fungos que esporulam em cultura (4) e o nitrogênio líquido, utilizado para muitas formas de fungos, geralmente micelianas, que não esporulam em cultura (6, 7). Contudo, para utilização de tais métodos faz-se necessário equipamento de alto custo, o que dificulta sobremaneira a sua utilização.

Onions (9), cita ainda outras técnicas, empregadas com sucesso, na estocagem de culturas de fungos e faz comentários sobre as vantagens e desvantagens de cada uma delas.

A destacar, há o método de Castellani, utilizado rotineiramente em muitas instituições, inclusive nacionais (5, 11). Consiste na transferência de uma porção do meio de cultivo com o fungo a ser conservado, para frascos de vidro contendo água destilada estéril. Pimentel & col. (11), destacam a importância da conservação de culturas por esse método, do ponto de vista fitopatológico, uma vez que tem sido comprovada a manutenção da patogenicidade dos fungos assim preservados. Na verdade, o método de Castellani pode ser considerado como um dos mais eficientes e práticos para a conservação de fungos, da mesma forma que o método de preservação em óleo mineral, embora esse último seja pouco mais dispendioso.

## Material e Métodos

Foram revisadas culturas de 34 espécies de fungos *Dematiaceae* da Micoteca URM, perfazendo o total de 68 amostras, visto que cada espécie é mantida em duplicata. Essas culturas, mantidas entre 8 e 22 anos, são preservadas em batata-dextrose-agar (BDA) inclinado, imersas em óleo mineral (Nujol) esterilizado, tamponados com gelatina, água e sulfato de cobre (6%) e mantidas em temperatura de 22° a 25°C.

Em câmara asséptica, retirou-se, de cada cultura, um inóculo que foi transferido para tubo de ensaio com BDA. Após 15 a 20 dias de desenvolvimento, foram observadas as características macroscópicas da colônia, procedendo-se montagem em lâmina com azul de Amann para observação microscópica da morfologia das estruturas vegetativas e reprodutivas. Para confirmação dos caracteres específicos, foi consultada a bibliografia especializada (3).

## Resultados

Das 68 culturas examinadas, 51 eram viáveis e apresentavam os caracteres morfológicos inalterados. Constatou-se ainda que, em 20 espécies, as duplicatas germinaram e produziram novos esporos; em 11 espécies, apenas uma das culturas manteve a viabilidade, com esporulação e, em três, nas duas cepas examinadas os fungos germinaram, mas desenvolveram-se fracamente, não atingindo sequer a fase reprodutiva. Assim, embora tivesse sido obtido 100% de germinação, nas 68 culturas, a esporulação foi de 75%.

As três espécies que não atingiram a fase reprodutiva, nas duas cepas, foram: *Helminthosporium carbonum* Ullstrop (19 anos), *Pithomyces chartarum* (Berk e Kurt) M.B. Ellis (20 anos) e *Cephaliophora tropica* Taxter (20 anos) as quais, observadas ao microscópio, estavam com os seus caracteres morfológicos bastante alterados.

Na Tabela 1 estão relacionadas as cepas mais antigas das 31 espécies que conservaram inalteradas as suas características morfológicas; constam ainda da tabela, a origem da cultura e o seu número de registro na Micoteca URM.

O método de conservação de culturas em óleo mineral, utilizado na Micoteca URM, é bastante eficiente, quanto aos fungos *Dematiaceae*.

Das espécies estudadas, 91% foi conservado, após 20 anos de estocagem. Pequena parcela das culturas exibiram modificações nos seus caracteres morfológicos.

Tabela 1 -- Fungos Dematiaceae da Micoteca URM preservados em óleo Mineral

Espécie	Origem	Nº URM	Idade da cultura (anos)
<i>Acrospeira macrospinosa</i> (Berk) Sacc.	URM	2.347	8
<i>Alternaria brassicae</i> (Berk) Sacc.	IBB	120	21
<i>Alternaria chartarum</i> Preuss	Myc.M.Paris-641	906	21
<i>Alternaria brassicicola</i> (Schw.) Wilts.	QMCC-620	756	20
<i>Aspergillus niger</i> van Tieghen	IFO-4280	949	22
<i>Aureobasidium pullulans</i> (De Bary) Arnaud	QMCC-279	827	13
<i>Betulania indica</i> Subram.	URM	1.521	20
<i>Cladosporium fulvum</i> Cooke	LBFHC-1071	1.196	11
<i>Cladosporium olivaceum</i> (Cda) Bonar	IBB	1.042	21
<i>Cladosporium werneckii</i> da Fonseca	NRRL-26	704	15
<i>Curvularia lunata</i> var. <i>aeria</i> (Batista, Lima e Vasconcelos) M.B. Ellis	URM	1.635	20
<i>Curvularia brachyspora</i> Boedijn	QMCC-93	750	15
<i>Curvularia eragrotides</i> (P. Henn) J.A. Meyer	URM	2.250	11
<i>Deightoniella torulosa</i> (Syd) Ellis	URM	2.298	9
<i>Gliomastix convoluta</i> (Harz) Mason	QMCC-452	788	21
<i>Heterosporium tschwachii</i> Doty	QMCC-540	824	18
<i>Helminthosporium nodulosum</i> Berk & Curt	URM	1.957	16
<i>Nigrospora sacchari</i> (Speg.) Mason	URM	1.674	15
<i>Nigrospora sphaerica</i> (Sacc.) Mason	QMCC-1253	777	13
<i>Phialophora melinii</i> (Nannf.) Conant	QMCC-226	776	21
<i>Phialophora verrucosa</i> Medlar	Tulane Univ.	525	21
<i>Periconia cookei</i> Mason & Ellis	URM	2.197	13
<i>Periconia macrospinosa</i> Lefebure & Johnson	URM	2.320	9
<i>Scyphalidium lignicola</i> Pesante	URM	2.313	9
<i>Scolecosporium constrictum</i> Abbott	URM	2.054	13
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (Sacc) Bain.	IPP-210	587	21
<i>Thievaliopsis paradoxa</i> (Dade) C. Moreau	IBSP	1.907	16
<i>Tetracoccosprium paxiamum</i> Szabo	UCLAB-220	1.569	16
<i>Torula caligans</i> (Batista & Upadhyay) M.B. Ellis	URM	1.999	15
<i>Trichurus terrophilus</i> Swift & Povah	QMCC	818	22
<i>Wardomyces anomala</i> Brooks & Hansf.	QMCC-903	828	10

Abreviações que indicam a origem das culturas:

IBB	— Instituto Biológico da Bahia-Brasil
IBSP	— Instituto Biológico de São Paulo-Brasil
IFO	— Institute for Fermentation Osaka-Japão
IPP	— Institut Pasteur Paris-França
LBFHC	— Lab. Botânica, Fac. de Human Y Ciências, Montevideu-Uruguai
Myc.M.P.	— Mycoteca Museo Paris-França
NRRL	— Cult. Collet. Ferment. Sect. Northern Utiliz. Res. Branch-USA
QMCC	— Q.M. Cultures Collect. Natick, Mass., Peoria Ill-USA
UCLAB	— University of California Laboratory-USA
URM (DEMUFPE)	— Departamento Micologia, Universidade Federal de Pernambuco-Brasil.

## Referências Bibliográficas

1. Braverman, S.W. & Crosier, W.F. — Longevity and pathogenicity of several *Helminthosporium* species stored under mineral oil. Plant Disease Reporter, 50:321-323, 1966.
2. Buell, C.B. & Weston, W.H. — Application of the mineral oil conservation method to maintaining collections of fungous cultures. Amer. Jour. Bot., 34:555-561, 1947.
3. Ellis, M.B. — Dermatiaceous hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 1971.

4. Fennel, D.I. — Conservation of fungous cultures. *Bot. Rev.*, 26:79-141, 1960.
5. Figueiredo, M.B. — Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patógenos em plantas. *O Biológico*, 33:9-12, 1967.
6. Hwang, S.W. — Investigation of ultra-low temperature for fungal culture. I — An evaluation of liquid-nitrogen storage for preservation of selected fungal cultures. *Mycologia*, 60:613-621, 1968.
7. Hwang, S.W. — Investigation of ultralow temperature for fungal cultures. III — Viability and growth rate of mycelial cultures following cryogenic storage. *Mycologia*, 68:377-387, 1976.
8. Norris, D. — Preservation of tube cultures of fungi and bacteria with liquid paraffin. *Jour. Aust. Inst. Agric. Sci.*, 10:77, 1944.
9. Onions, A.H.S. — Preservation on fungi. In: — Booth, C., ed. — *Methods in microbiology*. London, Academic Press, p. 113-151, 1971.
10. Perrin, W.P. — Long-term storage of cultures of wood-inhabiting fungi under mineral oil. *Mycologia*, 4:867-869, 1979.
11. Pimentel, C.P.V.; Pitta, G.P.B. & Figueiredo, M.B. — Preservação da patogenicidade de alguns fungos conservados em água destilada. *O Biológico*, 46:279-308, 1980.
12. Reischer, H.S. — Preservation of *Saprolegniaceae*, by the mineral oil method. *Mycologia*, 41:177-179, 1949.
13. Sherf, A.F. — A method for maintaining *Phytophthora sepedonica* in culture for long periods without transf. *Phytopath.*, 33:330-332, 1943.

## **Bacillus licheniformis IOC 2390 (ATCC 33632), nova amostra produtora de bacitracina\***

Leon Rabinovitch  
& Moacelio Veranio Silva Filho

*Dept.<sup>o</sup> de Bacteriologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Caixa Postal 926  
20000 Rio de Janeiro RJ, Brasil*

### **Resumo**

O antibiótico excretado pelo *Bacillus licheniformis* IOC 2390 (ATCC 33632), foi analisado, em seguida à sua extração do meio de produção com n-butanol. Concentrados aquosos finais (Fração III), submetidos à filtração por colunas de Sephadex G-25, mostraram três componentes com identidades de peso molecular (i.e., mesmo volume de eluição com picos em  $A_{252nm}$  e atividade antibiótica) e de perfil cromatográfico com o grupo das bacitracinas.

### **Summary**

*Bacillus licheniformis* IOC 2390 (ATCC 33632), a new bacitracin producer strain

The antibiotic excreted from *Bacillus licheniformis* IOC 2390 (ATCC 33632) was analysed after extraction with n-butanol from the production medium. The final concentrated water solution (Fraction III) was filtered throughout columns packed with Sephadex G-25. In the eluate, there were three components with identical molecular weights (i.e., same elution volume with peaks at  $A_{252nm}$  and antibiotic activity) and identical chromatographic patterns with that of the group of bacitracins.

### **Introdução**

A bacitracina é um complexo de estruturas polipeptídicas semelhantes, algumas dotadas de propriedades antibióticas, elaboradas por amostras de *Bacillus licheniformis* (3, 4, 17, 21, 22, 23, 24). Atribui-se também esta propriedade a amostras de *B. subtilis*, provavelmente em virtude de serem espécies taxonomicamente muito próximas, diferenciáveis por um número restrito de caracteres, nem sempre observados por certos autores. O próprio *B. subtilis* Tracey I, do qual se descreveu, em 1943, pela primeira vez, o antibiótico, demonstrou tratar-se de *B. licheniformis* (8), atual amostra ATCC 10716; do mesmo modo, a amostra A5 de *B. subtilis*, produtora de "ayfivin" — antibiótico depois reconhecido como sendo bacitracina, foi reclassificada, na Universidade de Oxford, como *B. licheniformis* A5 (2).

---

\* Parte da Tese de Livre Docência do primeiro autor.

Análises recentes do complexo-bacitracina permitiram demonstrar a existência de pelo menos 22 componentes (23). Do produto existente no comércio, o componente A é o mais ativo, microbiologicamente, talvez pelas maiores proporções na mistura (24). A bacitracina A é um dodecapeptídio, em cuja estrutura situa-se um anel tiazoliníco delta-2 e um peptídio cíclico, integrado por sete aminoácidos (23, 24).

Outros antibióticos, como a licheniformina — polipeptídio de alto peso molecular e estrutura desconhecida (5), e a proticina — um trieno contendo fósforo (15), podem ser produzidos por certas amostras de *B. licheniformis*, mas somente a bacitracina oferece interesse industrial. Sob as formas de bacitracina-zinco, bacitracina-manganês, bacitracina-metileno-disalicilato ou simplesmente bacitracina, é um dos antibióticos mais usados em mistura com rações para animais, em virtude de integrar um contingente de 12 antibióticos antibacterianos de primeira linha, aprovados para esse fim pela Food and Drug Administration (16).

Em comunicação anterior (19), foi descrito um mutante de *B. licheniformis* 2390 (amostra Spolp-72), que ficou caracterizado, juntamente com a linhagem parental, como produtor de substância dotada de propriedade antibiótica contra *Staphylococcus*. Na ocasião, tal substância foi identificada perfunctoriamente por cromatografia em camada delgada (c.c.d.), sendo comparada à bacitracina. No presente trabalho, os autores apresentam mais evidências que sustentam esta identidade.

## Material e Métodos

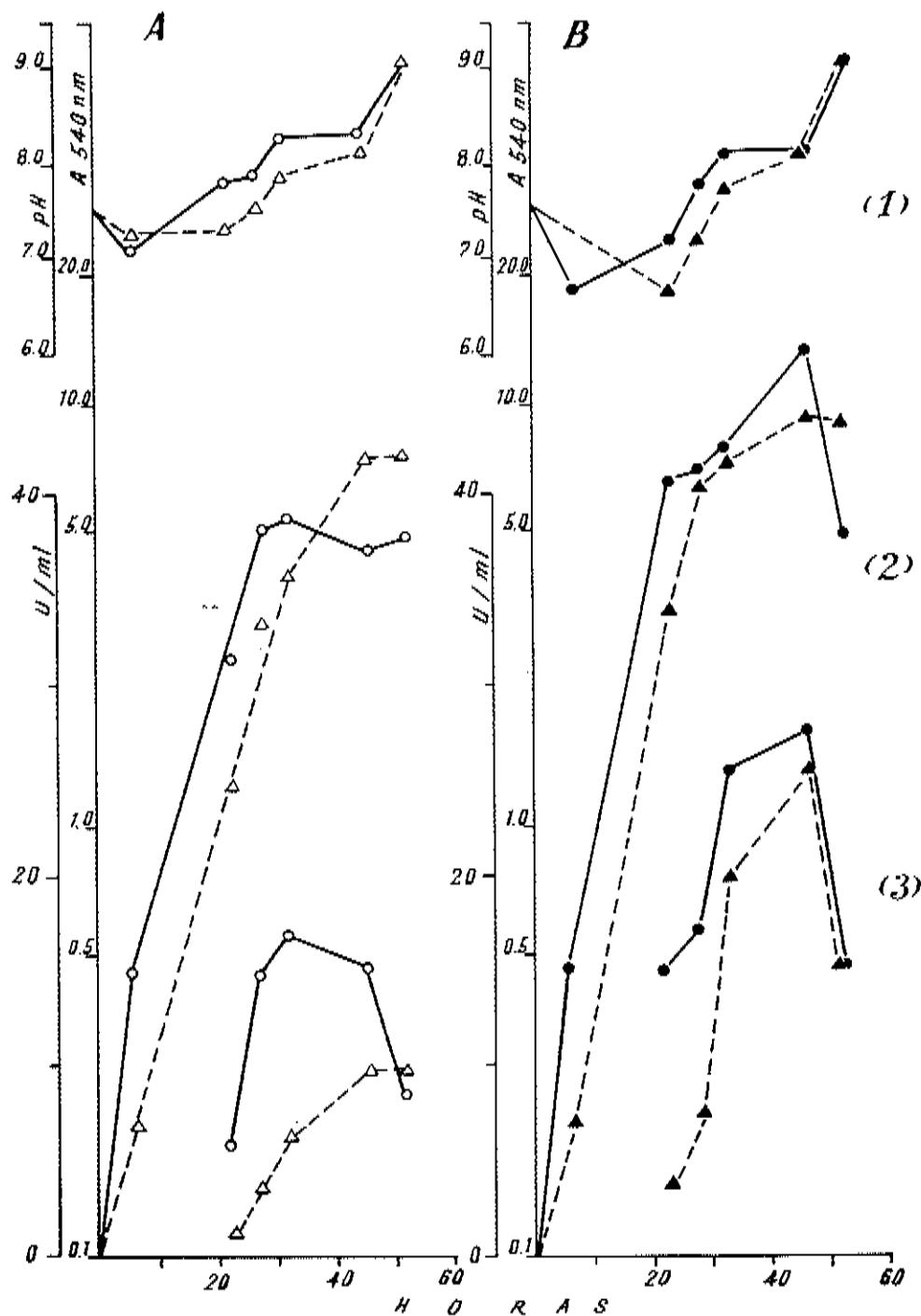
**Amostras** — A amostra 2390 foi primeiramente identificada por José Guilherme Lacorte (Instituto Oswaldo Cruz — IOC) como *Bacillus* sp., em seguida a isolamento de sedimento urinário humano, figurando na Coleção de Culturas do Departamento de Bacteriologia do IOC, desde 1969. Posteriormente, foi classificada como *B. licheniformis*, conforme já relatado (18) e, mais tarde, reexaminada em conjunto com o seu mutante de esporulação Spolp-72 (19). A amostra 2390 encontra-se atualmente depositada na American Type Culture Collection sob o número 33632. Os procedimentos de estocagem de ambas as culturas já foram relatados (19).

**Meios de cultura** — Para os cultivos das amostras estudadas, empregou-se o seguinte meio (g/l): isolado protéico de soja (Proteimax-90, S.A. Moinhos RioGrandenses), solubilizado em NaOH 0,6g/l a 70°C, 20,0; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3,28; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,0; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5; NaCl, 0,2 e MnSO<sub>4</sub>, 0,027 (meio básico-MB). O pH foi ajustado a 7,5 com HCl concentrado, seguindo-se a autoclavagem a 120°C/15 min. A sacarose, quando usada, foi adicionada asseticamente ao meio básico. Na dosagem do antibiótico, foi utilizado o meio Bacto Penassay Seed Agar (DIFCO).

**Condições de cultivo e preparo de inóculos** — A germinação de esporos da amostra 2390 e o pré-inóculo da amostra Spolp-72 foram conduzidos em caldo nutritivo (6) contendo 5,0g/l de sacarose, durante 16h a 37°C. Os inóculos foram preparados nos próprios meios de crescimento, seguindo-se a centrifugação das células (1500xg), ressuspensão em salina estéril (NaCl 8,5g/l) e ajuste da absorbância para 2,0 ( $A_{540\text{nm}}$  em aparelho Spectronic 20, Bauch & Lomb). Desta suspensão, foram tomados 5,0ml para inocular cada Erlenmeyer de 500ml, encerrando 95ml de meio concentrado, de modo a perfazer a turvação inicial de células equivalente a 0,1 de  $A_{540\text{nm}}$  em 100ml. Todos os cultivos foram feitos em agitador recíproco (Waner-Chilcott Lab.) a 120 oscilações/min e a 37°C ± 0,5°. Para as determinações cinéticas, foram utilizados dois frascos de cultivo para cada condição, alternando-se as retiradas de amostras.

**Controles durante o cultivo** — Os crescimentos foram avaliados, determinando-se a absorbância (540nm) das culturas após centrifugação (2000xg) e uma lavagem das células.

Figura 1 — Cinéticas de pH (1), crescimento (2) e produção de antibiótico (3)



*B. licheniformis* 2390 (●) e *B. licheniformis* Spol p-72 (△) (▲), amostras crescidas em MB (A) e MB + sacarose, 5,0g/l (B).

No primeiro sobrenadante, determinou-se o pH e a atividade antibiótica (U/ml) pelo método dos cilindros-em-placas, utilizando-se *Micrococcus flavus* ATCC 10240 como germe-teste e uma bacitracina SIGMA (53500 U/g) como padrão de dosagem. O sobrenadante era previamente centrifugado a 14000xg a 5°C/20 min. Quando necessário, fazia-se diluições em tampão fosfato 0,07M, pH=6,0. Outros controles da atividade antibiótica foram feitos pelo mesmo método.

**Extração e purificação do antibiótico** — Cultivos da amostra 2390 em MB adicionados de 5,0g/l de sacarose com 25h tiveram os pH ajustados com HCl concentrado, seguindo-se centrifugação (14000xg a 5°C) e filtração por papel (Fração I). O filtrado foi extraído duas vezes, com n-butanol/água (2:1), sendo o extrato butanólico (Fração II) concentrado sob vácuo (40mm de Hg) a 30°C, em presença de água destilada, gerando um resíduo aquoso (Fração III) que foi conservado a -20°C. Este resíduo foi parcialmente purificado por filtração em gel (Sephadex G-25, Pharmacia, em leito com 1,8 x 29cm); as eluições foram feitas com tampão fosfato 0,15g% e pH=6,0 sob pressão constante e, nestas, a atividade antibiótica foi determinada como indicado. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro Beckman DU.

**Cromatografias** — Formam utilizados: papel (Whatman nº 4) revelado com ninhidrina e biorrevelado com *M. flavus* ATCC 10240, cromatofolha de silica-gel 60 F254, E. Merck (c.c.d.), revelada com ninhidrina a 90-100°C e luz ultravioleta (U.V.). Em todos os desenvolvimentos o solvente empregado foi o n-butanol, ácido acético e água (4:1:2) em corridas unidimensionais. Outras bacitracinas, empregadas para comparação, além da de procedência SIGMA, foram: NBC (Nutritional Biochem. Co.) e uma amostra comercial.

## Resultados e Discussão

Dois grupos de experimentos foram feitos com vistas ao confronto entre *B. licheniformis* 2390 e *B. licheniformis* Spolp-72, no tocante à produtividade do antibiótico. Os resultados cinéticos representados na Fig. 1 mostram que, nas condições empregadas, tanto na ausência como na presença de sacarose, os cultivos da amostra 2390 foram mais efetivos na produção do antimicrobiano. Possivelmente, isto se deve ao fato, já verificado (20), de que esta amostra oferece um crescimento mais eficiente que a Spolp-72, quando comparada sob idênticas condições experimentais. Por outro lado, tem-se demonstrado que, dentro de certos limites, o aumento da população celular é acompanhado do aumento da produção de antibióticos peptídicos, como sucede no caso da bacitracina (10, 11, 13, 25) e de outros antibióticos bacterianos, como as gramicidinas, tirocidinas, polimixinas, micobacilina e bacilisina (15). Relativamente ao pH, a variação aqui encontrada mostra similitude e outros achados (3, 12, 14), referentes a germes produtores de bacitracina. Em função destes resultados, a amostra 2390 foi eleita para fornecer os cultivos destinados à extração do antimicrobiano.

A seqüência de extração e concentração aqui adotada, está baseada nos procedimentos de Anker & col. (1), em que a bacitracina é solubilizada em butanol sendo daí transferida para a água. Os resultados encontram-se na Tabela 1, e mostram que a Fração III (5ml de resíduo aquoso) reteve o correspondente a cerca de 32% da atividade antibiótica do total inicialmente existente. No sentido de se controlar a extração do antibiótico, analisou-se os perfis cromatográficos destas frações, tanto em c.c.d. (Fig. 2) como em papel (Fig. 3). Por intermédio da c.c.d., foi possível verificar a presença de uma mancha amarelo-castanha (C), presente em todas as frações e também no padrão utilizado (Fig. 2). Este tipo de mancha já foi correlacionada com a bacitracina (9). Na Fração III, mais concentrada, notou-se a presença de outros componentes revelados pela ninhidrina. De modo a pesquisar as possíveis atividades antimicrobianas, a mesma foi também cromatografada em papel, analisando-se os perfis por biorrevelação e ninhidrina, conforme descrito na Fig.

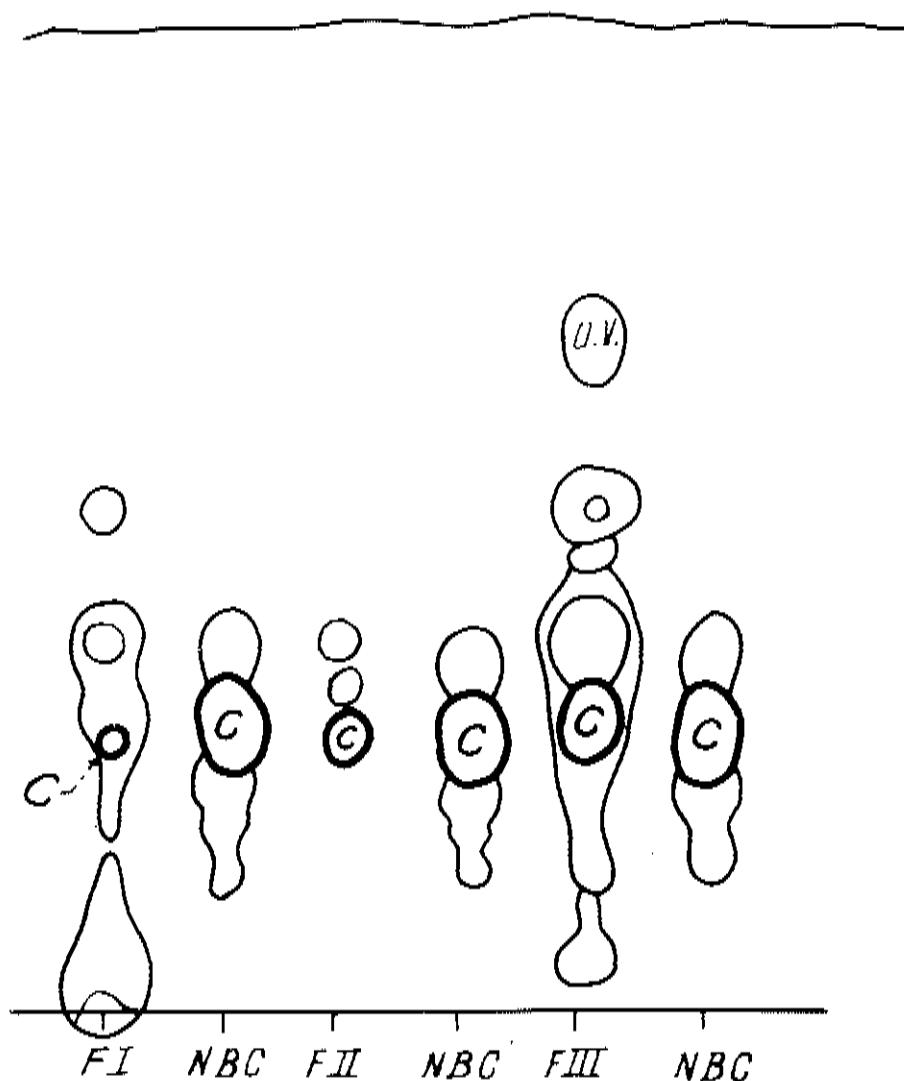
Tabela 1 — Recuperação da atividade antibiótica durante o processo de extração

Fração	Volume	U/ml	U totais	Rendimento(*) %
I	150	29,0	4 350	—
II	150	20,2	3 030	69,7
III	5	277,7	1 385,5	31,9
IV(**)	150	4,7	705	16,2

(\*) Considerando-se as U totais na Fração I como 100%

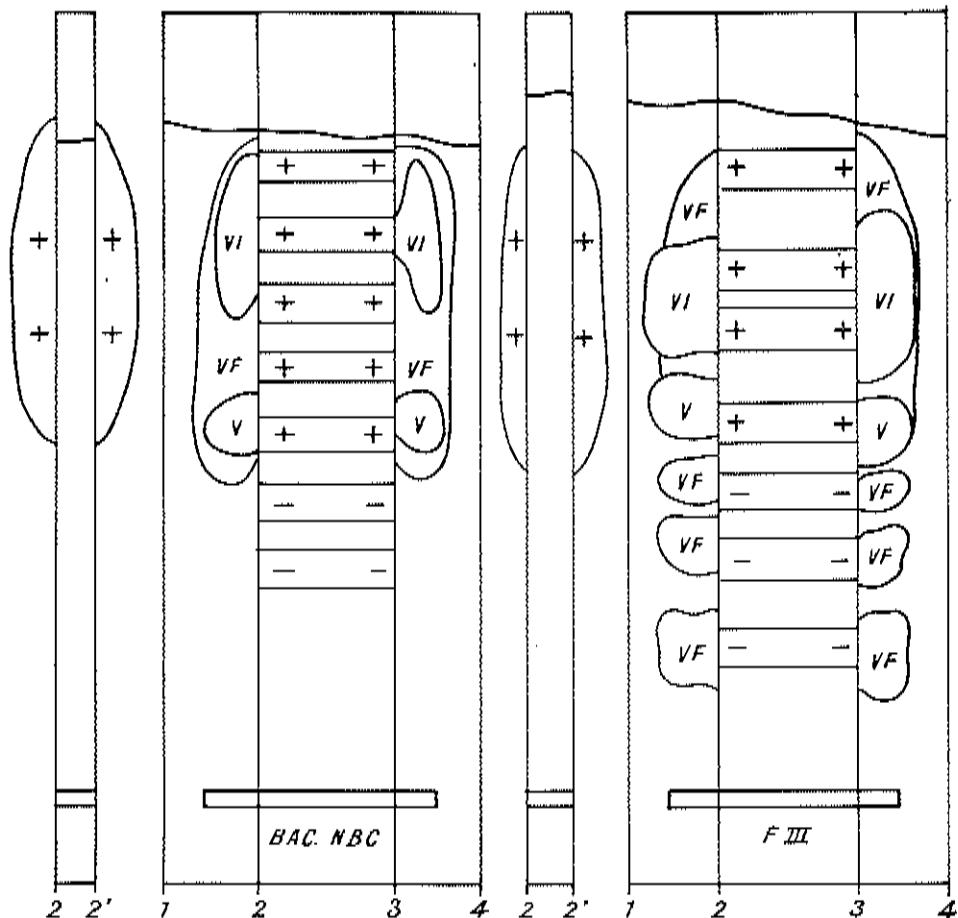
(\*\*) Atividade residual na Fração I, após a extração com n-butanol.

Figura 2 — c.c.d. ascendente das frações obtidas na seqüência de extração do antimicrobiano



NBC-bacitracina com 250U/ml (20 µl); FI a FIII—Frações I a III (20 µl). Revelação: ninhidrina e ultravioleta (U.V.). Uma mancha foi revelada somente ao U.V.

Figura 3 — Mapa da corrida ascendente em papel, de uma solução aquosa de bacitracina NBC ( $\approx 2500\text{U/ml}$ ) e da Fração III ( $277,7\text{U/ml}$ )

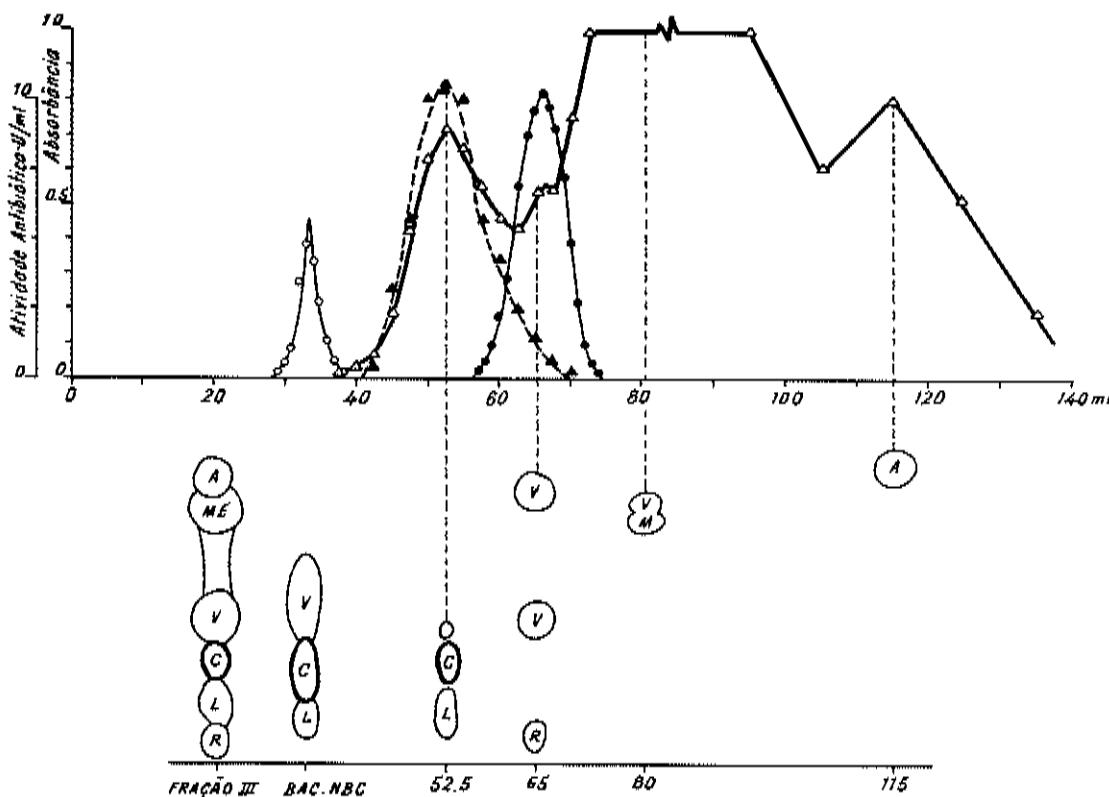


Aliquotas de  $100 \mu\text{l}$  de cada material foram dispostas em barras horizontais (1-4); após o desenvolvimento (3h), o cromatograma foi cortado em tiras verticais (1-2; 2-2; 2-3 e 3-4). As tiras 1-2 e 3-4 foram reveladas com ninhídrina, enquanto que as 2-2 submeteu-se à biorrevelação diretamente. As tiras 2-3 foram subdivididas em segmentos horizontais (como mostrado), de acordo com as indicações da prévia revelação das tiras 1-2 e 3-4 com ninhídrina, e foram também biorreveladas diretamente. + = biorrevelação positiva ou inibição do *M. flavus* ATCC 10240; nas tiras 2-2 estão demarcadas as áreas de inibição. - = ausência de inibição. VF = violeta fraca, VI = violeta intensa e V = violeta, cores obtidas com ninhídrina.

3. Assim, foi possível comprovar-se que a Fração III continha também componentes inativos, que não encontravam correspondentes no padrão utilizado.

Com o intuito de obter, sob forma mais purificada, o componente biologicamente ativo presente na Fração III, a fim de melhor resolvê-lo e compará-lo com os padrões de bacitracina, aliquotas desse resíduo aquoso foram passadas por coluna de Sephadex G-25. Nestas condições, a filtração permitiu selecionar componentes nos padrões e no resíduo aquoso, possuidores de pesos moleculares compreendidos entre 1000 e 5000, uma vez que se sabe que a bacitracina A apresenta peso molecular ao redor de 1400-1500 (8), e difere das bacitracina B e F, respectivamente, pelas substituições da iso-leucina por valina e da estrutura tiazolinica por um ceto-tiazol (8, 24). Os perfis de eluição, assim como os mapas cromatográficos dos picos característicos destes perfis, encontram-se representados

Figura 4 — Perfil de eluição da Fração III após filtração em Sephadex G-25, e o correspondente mapa cromatográfico (c.c.d.) dos picos característicos



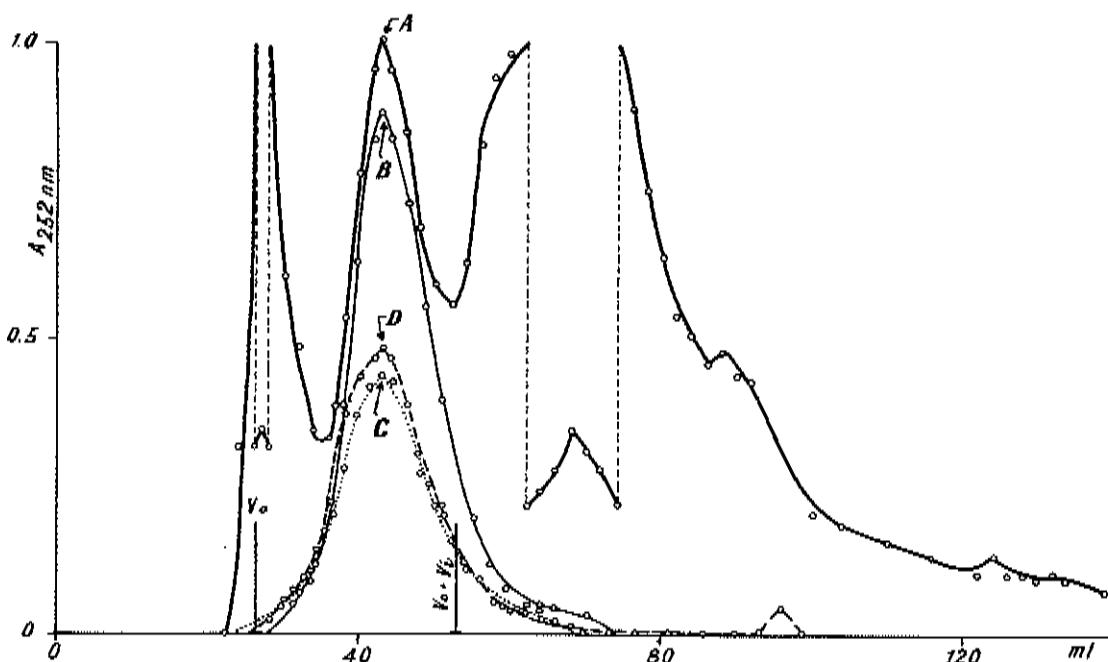
O --- Blue dextran 2000 (peso molecular =  $2 \times 10^6$ , Pharmacia),  $A_{625\text{nm}}$ ; ● —  $\text{CoCl}_2$ , (peso molecular = 129,85),  $A_{510\text{nm}}$ ; △ — Fração III,  $A_{252\text{nm}}$ ; ▲ — Fração III, atividade antibiótica no eluato.

na Fig. 4. Aí estão esboçados e correlacionados o perfil de eluição da Fração III, mapa cromatográfico dos picos característicos elucidados e a atividade antibiótica encontrada nos eluatos. Denota-se que a Fração III, após a filtração, conservou três componentes (V, C e L), concentrados em bloco no volume de eluição (Ve) de 52,5ml, os quais originaram um dos picos característicos do perfil de eluição ( $A_{252\text{nm}}$ ) que, por sua vez, exibiu a mais elevada atividade antibiótica no sistema experimentado. Além disso, os três componentes são comparáveis cromatograficamente aos seus similares, encontrados na Fração III, não submetida à filtração em gel, assim como na própria bacitracina NBC, usada como referência. O componente (C), por seu turno, ofereceu homologia cromatográfica com aquele encontrado na Fig. 2, tomando-se por base, para esta comparação, a igualdade de resposta quanto aos critérios de revelação adotados e seu deslocamento na cromatofolha. Ainda na Fig. 4, pode-se observar as impurezas afastadas da Fração III após filtração; o pico obtido com o Ve de 65ml, deve corresponder a aminoácidos livres presentes nesta fração, sendo, os demais, outros compostos que foram adsorvidos pela coluna, uma vez que seus Ve foram maiores que o do  $\text{CoCl}_2$ .

A partir deste ponto, um novo grupo de experimentos foi realizado, com a finalidade de se comparar o antimicrobiano elaborado pela amostra 2390 com bacitracinas de diferentes fabricantes. Para tanto, preparou-se nova partida da Fração III. Esta foi filtrada

através de Sephadex G-25, do mesmo modo que soluções de bacitracinas SIGMA, NBC e comercial. Suas concentrações foram referidas em peso (cerca de 4,7mg/ml em tampão fosfato), e, a Fração III, referida em atividade antibiótica equivalente à contida no padrão SIGMA. De conformidade com os resultados estampados na Fig. 5, vale ressaltar a nítida diferença entre as absorbâncias máximas de cada pico. Este fato deve estar correlacionado com a queda do teor de bacitracina A e, talvez, de outros componentes semelhantes, os quais apresentam também absorção nesse comprimento de onda (8); é sabido que as bacitracinas inativas F são produtos da oxidação dos componentes ativos A e B (7). De fato, ao determinar-se as potências das bacitracinas SIGMA e NBC, encontrou-se respectivamente 53,5U/mg e 13,4U/mg, que são resultados que corroboram a suposição formulada, e que permitem sugerir este método para uma avaliação rápida da potência de amostra filtrada.

Figura 5 — Perfis de eluição, após filtração em Sephadex G-25, da Fração III (A) e das bacitracinas SIGMA (B), NBC (C) e comercial (D)

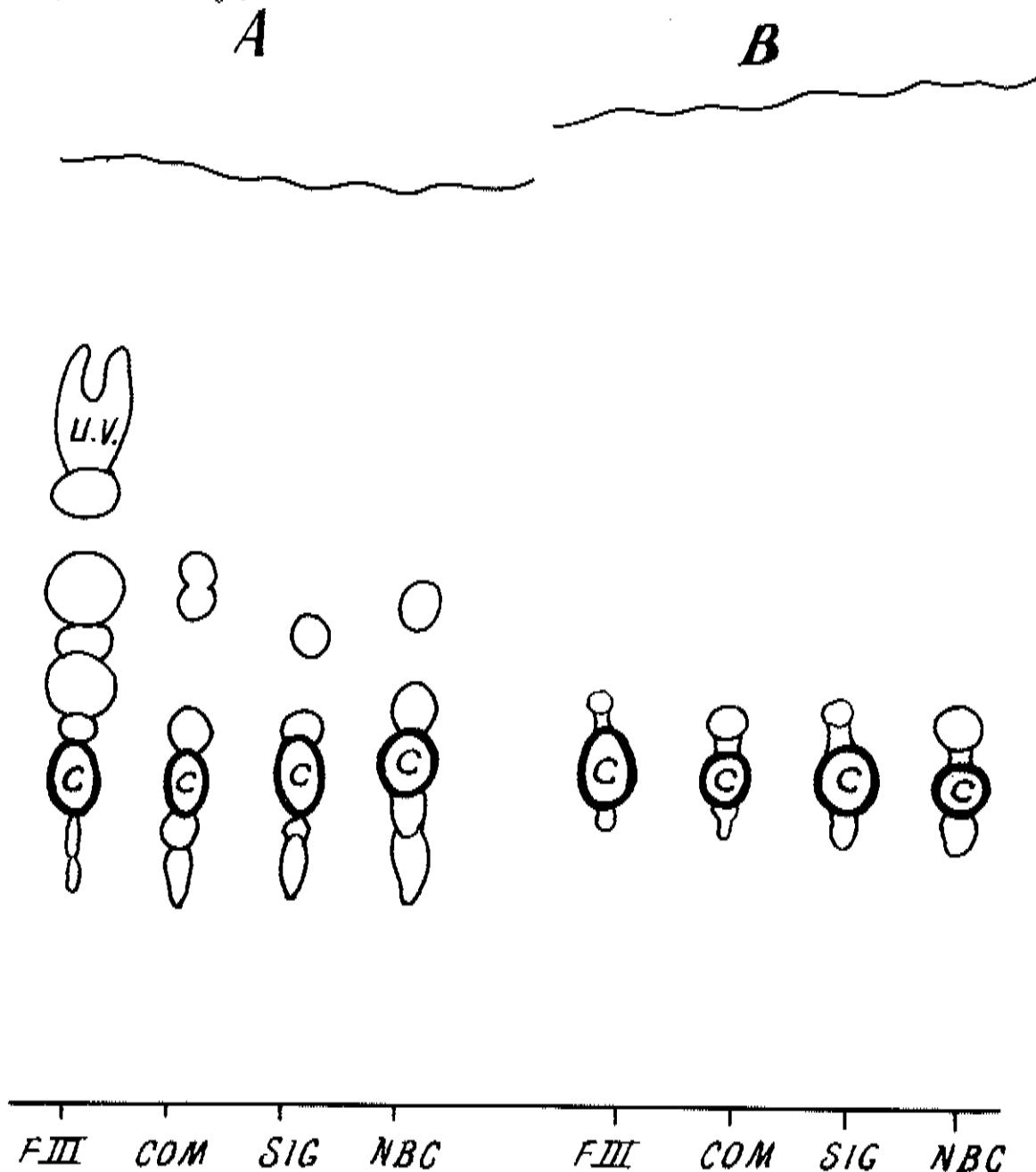


$V_0$  = volume "vazio" (Blue dextran);  $V_i$  = volume interno;  $V_0 + V_i$  foi calculado com auxílio de  $CoCl_2$  em água.

Finalmente, para confirmar a identidade cromatográfica entre o grupo ativo da Fração III e bacitracinas, alíquotas das soluções não filtradas e dos eluatos da filtração em gel foram analisadas em c.c.d. (Fig. 6). Em todos os perfis, foi possível identificar pelo menos três manchas, com identidades de  $R_f$  e cores com ninhidrina. Além disso, ressalta-se a purificação em bloco dos componentes do antimicrobiano, após a filtração em gel, e o tamanho da mancha amarelo-castanha, que é bem menor nas bacitracinas NBC e comercial. Desta forma, admite-se que esta mancha deve corresponder à bacitracina A.

Com base nestas evidências, os autores concluem que o antimicrobiano produzido pelo *B. licheniformis* IOC 2390 possui identidade de peso molecular (mesmo  $V_e$  na filtração em gel) e de perfil cromatográfico com o grupo das bacitracinas.

Figura 6 — Mapa cromatográfico das bacitracinas não purificadas (A), em comparação com o mapa cromatográfico dos picos característicos dos perfis de eluição destas bacitracinas em Sephadex G-25 (B), anteriormente representados na Fig. 5



A: bacitracinas SIGMA, NBC e comercial em tampão fosfato 0,15%, pH = 6,0 (250U/ml); Fração III diluída no tampão (250U/ml); 25 µl de cada foram depositados na cromatofolia; tempo de corrida 5h e 15 min. U.V. = mancha somente revelável pelo ultravioleta e não pela ninhidrina. B: 0,5ml de cada material eluído da coluna foi dessecado sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, redissolvido em 40µl de metanol e depositado na cromatofolia; tempo de corrida 5h e 20min.

## Referências Bibliográficas

1. Anker, H.S.; Johnson, B.A.; Goldberg, J. & Meleney, F.L. — Bacitracin: methods of production, concentration and purification, with a summary of the chemical properties of crude bacitracin. *J. Bacteriol.*, 55:249-255, 1948.
2. Arriagada, A.; Savage, M.C.; Abraham, E.P.; Heatley, N.G. & Sharp, A.E. — Ayfivin, an antibiotic from *Bacillus licheniformis*: production in potato-dextrose medium. *Brit. J. Exp. Pathol.*, 30:425-427, 1949.
3. Bernlohr, R.W. & Novelli, G.D. — Some characteristics of bacitracin production by *Bacillus licheniformis*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 87:232-238, 1960.
4. Bernlohr, R.W. & Novelli, G.D. — Bacitracin biosynthesis and spore formation: the physiological role of an antibiotic. *Arch. Biochem. Biophys.*, 103:94-104, 1963.
5. Bérdy, J. — Recent development of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure. *Adv. Appl. Microbiol.*, 18:309-406, 1974.
6. Bier, O. — Meios de cultura básicos. In: — *Bacteriologia e imunologia*. S. Paulo, Melhoramentos, 1975.
7. Frøyshov, Ø. — Separation of bacitracin A and bacitracin F by isoelectric focusing in gel. *Anal. Chim. Acta*, 98:137-139, 1978.
8. Hickey, R.J. — Bacitracin, its manufacture and uses. In: — Hockenhull, D.J.D., ed. — *Progress in industrial microbiology*. London, Temple Press Books, v.5, 1964.
9. Haavik, H.I. & Thomassen, S. — A bacitracin-negative mutant of *Bacillus licheniformis* which is able to sporulate. *J. Microbiol.*, 76:451-454, 1973.
10. Haavik, H.I. — Studies on the formation of bacitracin by *Bacillus licheniformis*: effect of glucose. *J. Gen. Microbiol.*, 81:383-390, 1974.
11. Haavik, H.I. — Studies on the formation of bacitracin by *Bacillus licheniformis*: effect of inorganic phosphosphate. *J. Gen. Microbiol.*, 84:226-230, 1974.
12. Haavik, H.I. — Studies on the formation of bacitracin by *Bacillus licheniformis*: role of catabolite repression and organic acids. *J. Gen. Microbiol.*, 84:321-326, 1974.
13. Haavik, H.I. — On the function of the polipeptide antibiotic bacitracin in the producer strain *Bacillus licheniformis*. *Acta path. microbiol. scand. Sect. B*, 83:519-524, 1975.
14. Haavik, H.I. — Bacitracin production by the neotype *Bacillus licheniformis* ATCC 14580. *Acta path. microbiol. scand. Sect. B*, 83:534-540, 1975.
15. Katz, E. & Demain, A.L. — The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis and possible functions. *Bacteriol. Rev.*, 41:449-474, 1977.
16. Kiser, J.S.; Gale, G.O. & Kemp, G.A. — Antibiotics as feedstuff additives: the risk-benefit equation for man. *CRC-Crit. Rev. Toxicol.*, 1:55-92, 1971.
17. Porath, J. — Purification of bacitracin polypeptides by charcoal chromatography and zone electrophoresis. *Acta Chem. Scand.*, 8:1813-1826, 1954.
18. Rabinovitch, L. — Estudo sobre a esporulação de uma amostra de *Bacillus*. II — Importância dos íons Mn<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> na indução do processo. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 69:121-130, 1971.
19. Rabinovitch, L.; Palmeira, M.L.; Machado, R.D. & Souza, W. — Mutante espontânea de *Bacillus licheniformis* bloqueada no estágio I da esporogênese, possuidora de metabolismo respiratório aumentado. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 74:73-87, 1976.
20. Rabinovitch, L.; Palmeira, M.L. & Silva, S.M. da — A spontaneous Spo mutant of *Bacillus licheniformis* with increased respiratory metabolism. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 6:47-49, 1975.
21. Siewert, G. & Strominger, J.L. — Bacitracin: an inhibitor of the dephosphorylation of lipid pyrophosphate, an intermediate in biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell wall. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 57:767-773, 1967.
22. Storm, D.R. — Mechanism of bacitracin action: a specific lipid-peptide interaction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 235:387-398, 1974.
23. Tsujii, K.; Robertson, J.H. & Bach, J.A. — Quantitative high-pressure liquid chromatographic analysis of bacitracin, a polypeptide antibiotic. *J. Chromatogr.*, 99:597-608, 1974.
24. Tsujii, K. & Robertson, J.H. — Improved high-performance liquid chromatographic method for polypeptide antibiotics and its application to study the effects of treatment to reduce microbial levels in bacitracin powder. *J. Chromatogr.*, 112:663-672, 1975.
25. Vitković, L. & Sadoff, H.L. — Purification of the extracellular protease of *Bacillus licheniformis* and its inhibition by bacitracin. *J. Bacteriol.*, 131:891-896, 1977.

## Seleção de linhagens de *Aspergillus niger* para produção de ácido cítrico

Francisca Pessôa de França  
& Angela Christina Dias de Castro

Dept.<sup>o</sup> de Engenharia Bioquímica, Escola de Química UFRJ, Centro de Tecnologia,  
Bloco E, Ilha do Fundão  
21941 Rio de Janeiro RJ, Brasil

### Resumo

Foi verificada a capacidade fermentativa de linhagens de *Aspergillus niger*, isoladas de diversas fontes, no processo de produção em superfície, usando-se bandejas pyrex de 18 x 35cm e relação área/volume de 1,26. Das 30 linhagens isoladas, 10 mostraram-se produtoras de ácido, apresentando coeficientes de rendimento máximos quando se usou 100gl<sup>-1</sup> de sacarose inicial. Os valores ótimos de pH inicial, para produção, dependeu da amostra. A cepa A1 apresentou rendimento máximo de 78%, em relação ao substrato, quando o pH inicial do meio foi 6,0 enquanto a cepa A10 apresentou melhor rendimento em pH 3,0, com rendimento de 43%.

### Summary

#### *Selection of citric acid producing strains of Aspergillus niger*

Several strains of *Aspergillus niger* were studied with regard to their fermentative capability; the experiments were carried out with surface cultivation of the mold in Pyrex Glass trays (18 x 35cm, area: volume ratio of 1.26). Ten out of the isolated strains showed to be fermentative; the maximum yield coefficients were observed when the initial sucrose concentration was 100 gl<sup>-1</sup>. The optimal initial pH values for production varied according to the strain of *A. niger*. Strain A1 showed a maximum yield for 78% (based on the substrate) when initial pH was 6.0; and the best fermentation for strain A10 was at pH 3.0 with a 43% yield.

### Introdução

Para produção de ácido cítrico, por *Aspergillus niger*, além da seleção das amostras se faz necessário o estudo de diversos parâmetros físicos, químicos e biológicos, tais como, temperatura, pH, constituintes do meio, taxas de aeração e agitação, e instabilidade genética.

As condições de fermentação variam com a linhagem do microrganismo. Além disso, as diversas linhagens de *Aspergillus niger* apresentam variação na produção, devido à ins-

---

Bolsistas do CNPq.

tabilidade genética, possivelmente devido à presença de dois núcleos, de diferentes constituição genética (9).

Várias fontes de glicídios têm sido empregadas para a produção de ácido cítrico. Prescott & Dunn (8) e Peppler (7) têm descrito glicose, sacarose, melaço de cana e de beterraba. Outras matérias primas, menos comuns, também têm sido usadas, tais como, pericarpio de *Ceratonia siliqua*, que contém 40% de açúcar (6) e resíduo de cervejaria (2).

A produção do ácido depende do suprimento adequado de oxigênio e, no processo de cultivo em superfície, da relação área/volume. Para satisfazer essas condições tem sido recomendada a relação 1,22, ou introdução de bagaço de cana no meio de fermentação (5).

Hannan & col. (3) estudaram a produção de ácido cítrico, usando quatro mutantes de *Aspergillus niger* e concluíram que o rendimento dependeu da concentração do açúcar e pH do meio; os valores ótimos para os dois parâmetros foram diferentes, para cada mutante.

Trumy & Millis (13) enfatizam que a dificuldade no estudo dos efeitos dos nutrientes, na produção de ácido cítrico, é devida ao fato de que a melhor concentração de um componente, freqüentemente, depende das concentrações de outros, no meio.

Este trabalho teve por finalidade selecionar linhagens de *Aspergillus niger*, produtoras de ácido cítrico e verificar, com as mais produtivas, a influência da concentração do substrato e do pH, pelo processo de cultivo em superfície.

## Material e Métodos

*Isolamento de Aspergillus niger* — As linhagens foram isoladas de uma variedade de fontes incluindo, babaçu, sorgo, vinhoto, batata doce, pão, feijão. Uma grama de cada fonte foi suspensa em 10ml de água destilada esterilizada e, após agitação, diluições da suspensão foram inoculadas em placas de Petri, contendo 20ml de gelose Czapeck. Após sete dias de incubação, a 25°C, as colônias foram transferidas para tubos de ensaio contendo gelose Czapeck inclinada. As linhagens, isoladas e identificadas, de acordo com Thom & Raper (11), foram estocadas em areia estéril, à temperatura ambiente.

*Condução dos experimentos* — As experiências foram desenvolvidas por processo de cultivo em superfície, usando-se 500ml do meio de fermentação em bandejas pyrex de 18cm × 35cm, incubadas a 25°C — 2.

*Inóculo* — Os esporos, estocados em 0,5g de areia esterilizada, foram suspensos em 5ml de água destilada e cultivados em tubos de ensaio de 1,5cm × 15cm, contendo 10ml de gelose Czapeck inclinada. Após incubação, a 25°C/7 dias, os esporos foram suspensos em 10ml de água destilada estéril, usando-se, para cada bandeja, 10ml de suspensão.

*Meio de fermentação* — Foi usado, como meio básico, o descrito por Prescott & Dunn (8): sacarose  $140\text{gl}^{-1}$ , nitrato de amônia  $2,30\text{gl}^{-1}$ , sulfato de magnésio  $0,23\text{gl}^{-1}$  e fosfato monoácido de potássio  $1,00\text{gl}^{-1}$ .

*Influência da concentração do substrato no coeficiente de rendimento do ácido* — Usou-se o meio básico, utilizando, como matéria-prima, açúcar cristal de cana, nas concentrações de 50 a  $200\text{gl}^{-1}$ . O coeficiente de rendimento ( $Y_s$ ) foi calculado pela relação entre ácido cítrico produzido e mol de sacarose inicial.

*Influência do pH inicial do meio de fermentação* — Das linhagens fermentativas de *Aspergillus niger*, foram escolhidas as duas que apresentaram maior capacidade de produção, para estudo do parâmetro. As experiências foram conduzidas usando-se o meio base adicionado a  $100\text{gl}^{-1}$  de açúcar e variando-se os valores do pH inicial: 3,0 — 4,0 — 5,0 —

6,0 e 7,0, ajustados com solução de ácido clorídrico 2N. Para cada condição foram realizados, no mínimo, quatro experimentos.

**Determinações quantitativas** — O ácido cítrico foi determinado por titulação, com solução de hidróxido 0,1N; 1ml dessa solução é equivalente a 6,4mg de ácido cítrico. A comprovação da presença de ácido cítrico e ausência de ácido oxálico foi feita pela reação de Furtth-Herrmann (1). O açúcar foi dosado pelo método de Somogyi (10), após hidrólise com solução de ácido clorídrico 2N a 70°C/10 min. As taxas de formação do produto, representadas por  $dP/dt$  (sendo P a concentração do produto e t o tempo), foram determinadas nos experimentos desenvolvidos em pH de 7,0.

## Resultados e Discussão

Das 30 linhagens isoladas, 10 apresentaram capacidade fermentativa e os resultados mostram que o coeficiente de rendimento  $Y_s$  dependeu da linhagem e concentração inicial de açúcar no meio (Fig. 1). Para todas linhagens testadas a melhor quantidade de substrato inicial, no meio de fermentação, foi de  $100\text{g l}^{-1}$ . Khan & Ghose (4), em processo submerso, encontraram também, como concentração ótima,  $100\text{g l}^{-1}$  de sacarose.

**Figura 1** — Coeficientes de rendimento da fermentação cítrica desenvolvida por linhagens de *Aspergillus niger* em diferentes concentrações iniciais de substrato

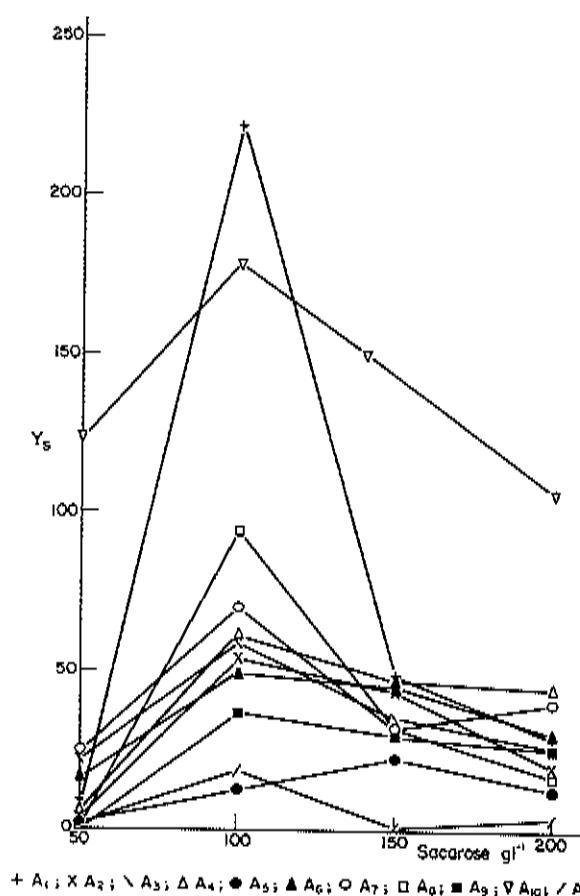
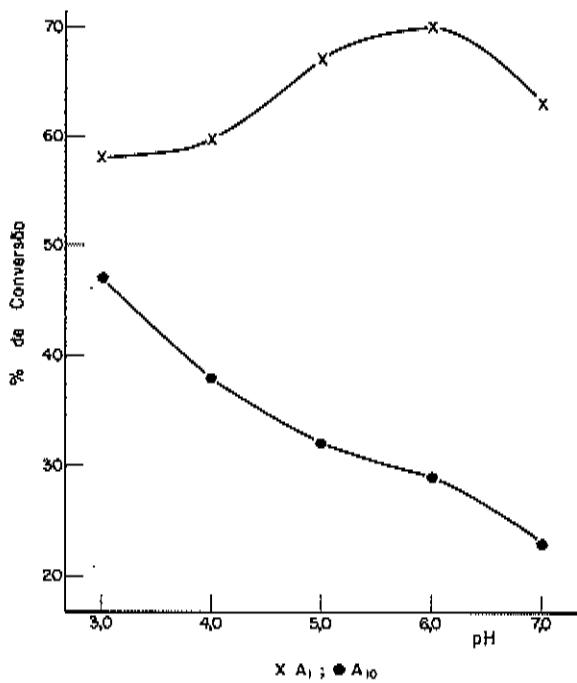


Tabela 1 — Consumo de substrato por *Aspergillus niger* A1

Linhagens	Substrato $\text{gl}^{-1}$			
	50	100	150	200
A <sub>1</sub>	48,8	97,5	146,5	193,4
A <sub>2</sub>	48,8	97,5	146,5	193,4
A <sub>3</sub>	49,9	94,8	149,0	199,3
A <sub>4</sub>	49,8	97,3	144,8	196,7
A <sub>5</sub>	45,7	94,3	147,4	193,4
A <sub>6</sub>	49,6	94,4	146,7	196,3
A <sub>7</sub>	49,9	99,2	148,6	199,2
A <sub>8</sub>	49,2	99,5	146,7	195,9
A <sub>9</sub>	49,8	99,5	148,6	195,6
A <sub>10</sub>	49,6	94,4	146,7	196,3
ATCC 1015	49,9	99,1	148,4	197,5

Considerando-se que o consumo de substrato foi proporcional à concentração inicial no meio (Tabela 1), as eficiências de fermentação, para as linhagens estudadas, foram maiores quando o teor inicial de sacarose foi de  $100\text{gl}^{-1}$ , mostrando que concentrações acima não inibiram o crescimento do microrganismo, mas diminuiram, significativamente, o metabolismo da fermentação.

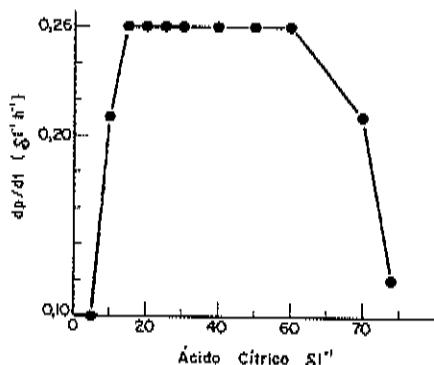
Baseando-se nos maiores valores do Ys foram escolhidas duas linhagens, A1 e A10, para estudo da influência do pH inicial do meio de fermentação. A percentagem de conversão da sacarose em ácido cítrico dependeu da linhagem e dos valores iniciais de pH. Para a linhagem A1 a percentagem de conversão máxima 70% ocorreu quando o valor de pH foi 6,0 (Fig. 2). A linhagem A10, apresentou o máximo de conversão, 43%, em pH 3,0.

Figura 2 — Conversão da sacarose em ácido cítrico por linhagens de *Aspergillus niger* em diferentes valores de pH do meio de fermentação

Tomlinson, Campbell & Trussel (12), trabalhando com *Aspergillus niger*, amostra 72-4 e processo de cultivo em superfície, conseguiram 55,8% de conversão em pH 2,0. Lakshminarayana & col. (5), trabalhando com meio de sacarose e pH = 3,0, usando também processo de cultivo em superfície obtiveram rendimento de 5,2% em relação ao açúcar inicial. Analisando os resultados dos dois trabalhos citados, embora as condições não tenham sido as mesmas, torna-se possível, comparar com nossos resultados. A linhagem A1 de *Aspergillus niger*, em meio contendo 100g l<sup>-1</sup> de sacarose e pH inicial de 6,0 apresentou rendimento de 78% em relação ao substrato inicial, correspondendo a 70% de conversão, mostrando capacidade fermentativa de aplicação industrial. Convém salientar que a linhagem em questão não requereu prévio tratamento da matéria prima para produção significativa de ácido cítrico.

A taxa máxima de formação de produto foi de 0,26 g l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (Fig. 3), bem abaixo dos valores encontrados para o processo submerso (4). Entretanto, este fato era o esperado, pois no processo de cultivo em superfície a conversão é mais longa.

Figura 3 — Velocidade de produção relacionada com a concentração de produto na fermentação cítrica



## Referências Bibliográficas

1. Furth, O. & Herrmann, H. — Biochem. Z., 280:448, 1935.
2. Hang, Y.D.; Splittstoesser, D.F.; Woodams, E.E. & Sherman, R.M. — Citric acid fermentation of Brewery waste. J. Food Science, 42:383-384, 1977.
3. Hannan, M.A.; Rabbi, F.; Rahman, A.T.M.F. & Choudhury, N. — Analysis of some mutants of *Aspergillus niger* for citric acid production. J. Ferment. Technol., 51:606-608, 1973.
4. Khan, A.H. & Ghose, T.K. — Kinetics of citric acid fermentation by *Aspergillus niger*. J. Ferment. Technol., 51:734-741, 1973.
5. Lakshminarayana, K., Chaudhary, K.; Ethiraj, S. & Tauro, P. — A solid state fermentation method for citric acid production using sugar cana bagasse. Biotechn. and Bioeng., 18:291-293, 1975.
6. Macris, B.J. — Citric acid from purified carob sugars. Biotechn. and Bioeng., 17:1373-1379, 1975.
7. Peppler, H.J. — Microbial Technology. New York, Reinhold Publ., 1967.
8. Prescott, S.C. & Dunn, C.G. — Industrial microbiology. 3. ed. McGraw-Hill, 1959.
9. Silva, J.C. & Azevedo, J.L. — Radiação gama e instabilidade em *Aspergillus niger*. Rev. Microbiol., 9:156-158, 1978.
10. Somogyi, M. — Notes on sugar determination. J. Biol. Chem., 195:19, 1952.
11. Thom, C. & Raper, K.B. — A manual of the Aspergilli. Waverly Press, 1945.
12. Tomlinson, N.; Campbell, J.J.R. & Trussel, P.C. — The influence of zinc, iron, copper and manganese on the production of citric acid by *Aspergillus niger*. J. Bacteriol., 59:218-227, 1950.
13. Trumy, B.H. & Millis, N.F. — Nutritional requirements of an *Aspergillus niger* mutant for citric acid production. J. Gen. Microbiol., 30:381-393, 1963.

## MILI - UM MEIO PARA A REALIZAÇÃO DOS TESTES DE MOTILIDADE, INDOL E LISINA DESCARBOXILASE

Maria Regina F. de Toledo

Disciplina de Microbiologia, Escola Paulista de Medicina  
Rua Botucatu, 862/39  
04023 São Paulo SP, Brasil

Cleuber F. Fontes

Deptº de Microbiologia e Imunologia UNICAMP  
Cidade Universitária  
13100 Campinas SP, Brasil

& Luiz R. Trabulsi

Disciplina de Microbiologia, Escola Paulista de Medicina

### Resumo

Foi proposto um meio para a identificação de enterobactérias, denominado MILi, que informa quanto aos testes de motilidade, produção de indol e lisina descarboxilase. Utilizando 316 amostras de enterobactérias, os testes do MILi, após 20-24h de incubação, foram avaliados através de uma comparação com os testes dos meios convencionais, incubados por períodos de tempo indicados para cada caso. Os testes de motilidade e indol do MILi mostraram 100% de concordância com os testes dos meios convencionais. Para os testes de lisina observou-se 99,8% de concordância entre os meios MILi e agar lisina com ferro (LIA). Considerando as 3 reações, os testes do meio MILi apresentaram 99,9% de concordância com os testes dos meios convencionais.

### Summary

*MILI - a medium for detection of motility, indole, and lysine decarboxylase*

A medium for identification of *Enterobacteriaceae* (MILI medium) informing about motility, production of indole, and lysine decarboxylase tests was proposed and evaluated. Using 316 *Enterobacteriaceae* strains, the tests in the MILi medium were compared to the same tests in the conventional media. The tests in the MILi were read after 20-24h of incubation whereas the tests in the convencional media were read according to the usual recommendation. Tests for motility and indole production yielded a correlation of 100%. Tests for lysine decarboxylase showed a correlation of 99.8% between MILi and lysine-iron agar (LIA) media. Considering the 3 tests, there was 99.9% of agreement for the tests in the MILi and in the convencional media.

### Introdução

Os testes de motilidade, produção de indol e lisina descarboxilase são amplamente reconhecidos como de fundamental importância na dife-

renção dos vários gêneros da família *Enterobacteriaceae* (6,11,13,14,17). Objetivando simplificar e reduzir o custo da identificação deste importante grupo de bactérias, propomos a incorporação destes três testes em um único meio.

Tendo em vista o excelente resultado alcançado pelo meio motilidade-indol-ornitina(5), propomos um meio similar no qual 0,5% de l-ornitina foram substituídos por 1% de l-lisina, o que permite a detecção de lisina descarboxilase, além de motilidade e indol, sendo o meio modificado denominado MILi. Realizamos, também, uma avaliação dos testes do MILi através de um estudo comparativo com os testes dos meios convencionais.

## Material e Métodos

1) *Meio MILi* - a) *Composição e preparo do meio* - O meio MILi consiste de: extrato de levedura, 3g; peptona, 10g; triptona, 10g; l-lisina, 10g; glicose, 1g; ágar, 2g; bromo cresol púrpura, 0,02g; água destilada, 1000ml. Adicionar todos os elementos à água e aquecer até dissolução completa dos componentes. Ajustar o pH do meio a 6,5, se necessário, e distribuir em volumes de 5ml, em tubos 12x120mm. Esterilizar durante 15 minutos a 121°C e deixar solidificar em posição vertical. A lisina foi utilizada na concentração de 1%, após uma avaliação do meio com concentrações de 0,5%, 1% e 2% deste aminoácido. Com concentrações de 1% e 2% as reações eram mais nítidas e de fácil interpretação, não havendo diferenças quando se utilizava uma ou outra concentração. b) *Inoculação e interpretação dos resultados* - Com agulha de platina inocular o meio por uma picada central, até a base do tubo. Após 20-24h de incubação a 35°C, a motilidade é detectada pela turvação total do meio ou pela observação de crescimento além da linha de inoculação. Se a amostra é imóvel, o crescimento se restringe à linha de inoculação, enquanto o restante do meio permanece límpido. Devido a fermentação da glicose as enterobactérias viram a base do MILi para amarelo; as enterobactérias que descarboxilam a lisina revertem a cor do meio para roxo ou roxo-acinzentado. Cor amarela nítida na base com uma banda roxa no topo indica reação negativa para lisina descarboxilase. Após a leitura dos testes de motilidade e lisina, verifica-se a produção de indol adicionando-se três a quatro gotas do reagente de Kovacs(6) ao meio, agitando-se suavemente o tubo. Formação de um anel vermelho, ou róseo, na superfície do meio indica presença de indol; anel de cor amarela indica reação negativa.

2) *Meios convencionais* - Para os testes de motilidade(6), indol(6) e lisina descarboxilase - método de Falkow(8), os meios foram preparados em nosso laboratório conforme as recomendações de Edwards & Ewing (6). Para os testes de lisina foram empregados também o ágar lisina com ferro - LIA(7) (Difco) e a base desidratada de Moeller(14,15) (Difco), acrescida de 1% de l-lisina. A inoculação e o período de incubação dos meios convencionais foram os recomendados para cada teste (6).

3) *Amostras bacterianas* - Foram utilizadas 316 amostras dos diferentes gêneros e espécies da família *Enterobacteriaceae*. Entre estas, 256 foram selecionadas para a avaliação dos meios de Falkow(8), Moeller(14,15) e LIA(7) para a realização do teste de lisina.

## Resultados

1) Descarboxilação da lisina nos meios de Falkow, Moeller e LIA - Este estudo foi realizado com o objetivo de selecionar o meio mais apropriado, para a realização do teste de lisina descarboxilase, que seria, posteriormente, utilizado como meio de referência na avaliação do teste de lisina do meio MILi. No meio LIA os resultados foram os esperados, enquanto que nos meios de Falkow e Moeller ocorreram reações falso-positivas para *Citrobacter* e *Enterobacter cloacae* (Tabela 1), tendo sido, portanto, o LIA utilizado como meio de referência.

Tabela 1 - Descarboxilação da lisina em meios de Falkow, Moeller e ágar lisina com ferro (LIA)

Amostras	Nº de amostras	Nº de amostras positivas		
		LIA	Falkow	Moeller
<i>E. coli</i>	20	17	15(2) <sup>a</sup>	17
<i>E. coli</i> (A-D) <sup>b</sup>	10	8	6(2)	8
<i>Shigella</i> sp.	30	0	0	0
<i>E. tarda</i>	4	4	4	4
<i>Salmonella</i> sp.	30	30	30	30
<i>A. hinshawii</i>	17	17	17	17
<i>C. freundii</i>	25	0	0(3)	0(22)
<i>C. diversus</i>	4	0	0	0(4)
<i>K. pneumoniae</i>	4	4	4	4
<i>E. cloacae</i>	16	0	3(10)	9(7)
<i>E. aerogenes</i>	9	9	7	7(2)
<i>E. hafniae</i>	1	1	1	1
<i>Proteus</i> sp.	30	0	0	0
<i>Providencia</i> sp.	30	0	0	0
<i>Y. enterocolitica</i>	20	0	0	0
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	6	0	0	0
Total	256	90	87(17)	97(35)

a. nº entre parênteses, reação positiva com três ou mais dias de incubação.

b. Alkalescens-Dispar (A-D).

2) Correlação entre os testes do MILi e os testes dos meios convencionais - Os resultados, apresentados na Tabela 2, mostraram para os testes de motilidade e indol 100% de concordância entre o meio MILi e os meios convencionais. Para os testes de lisina houve 99,8% de concordância entre os meios MILi e LIA, havendo discordância apenas para uma amostra de *Klebsiella* em que o teste foi positivo somente neste último meio. Considerando os 3 testes, observou-se 99,9% de concor-

Tabela 2 - Correlação entre os testes do meio MILi e os testes dos meios convencionais

Amostras	Nº de amostras	Motilidade		Indol		Lisina	
		Nº <sup>a</sup>	% <sup>b</sup>	Nº	%	Nº	%
<i>E. coli</i>	20	11/11	100	18/18	100	17/17	100
<i>E. coli</i> (A-D) <sup>c</sup>	10	0/0	100	10/10	100	8/8	100
<i>Shigella</i> sp.	30	0/0	100	18/18	100	0/0	100
<i>E. tarda</i>	4	4/4	100	4/4	100	4/4	100
<i>S. typhi</i>	5	5/5	100	0/0	100	5/5	100
<i>S. enteritidis</i>	25	25/25	100	0/0	100	25/25	100
<i>A. hinshawii</i>	17	17/17	100	0/0	100	17/17	100
<i>Citrobacter freundii</i>	25	23/23	100	2/2	100	0/0	100
<i>Citrobacter diversus</i>	4	4/4	100	4/4	100	0/0	100
<i>Klebsiella</i> sp.	30	0/0	100	2/2	100	27/28	96,6
<i>Enterobacter</i> sp.	30	25/25	100	1/1	100	10/10	100
<i>Serratia</i> sp.	30	30/30	100	0/0	100	30/30	100
<i>Proteus</i> sp.	30	28/28	100	19/19	100	0/0	100
<i>Providencia</i> sp.	30	25/25	100	30/30	100	0/0	100
<i>Yersinia</i> sp.	26	0/0	100	10/10	100	0/0	100
Total	316		100		100		99,8

a. nº de amostras positivas no MILi/nº de amostras positivas nos meios convencionais.

b. Porcentagem de concordância entre os testes.

c. Alkalescens-Dispar (A-D).

Temperatura de incubação, 35°C.

dância entre os testes do MILi e os testes dos meios convencionais. No cálculo da porcentagem de correlação entre os testes foi aplicada a fórmula de classificação numérica da porcentagem de similaridade (9).

#### Discussão

Os dados do presente estudo permitem assegurar que o meio MILi é totalmente digno de confiança para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase, uma vez que para os 2 primeiros testes houve 100% de concordância entre o meio MILi e os meios de referência e para os testes de lisina, 99,8% de correlação entre os meios MILi e LIA (Tabela 2).

A grande sensibilidade do MILi, para o teste de motilidade, se explica pela baixa concentração de ágar no meio (0,2%), o que faz com que mesmo uma discreta motilidade se torne óbvia com apenas 20h de incubação.

O teste de indol do MILi se mostrou equivalente em sensibilidade ao

meio mais ortodoxo para verificar este teste, o meio líquido contendo triptofano(6). Observamos que reações positivas fracas para indol podem ocorrer no MILi, o que também foi constatado por Ederer & Clark (5) no meio motilidade-indol-ornitina.

Para o teste de lisina o MILi equivale em sensibilidade ao meio LIA (7) (Tabela 2). Entretanto, acreditamos que o primeiro substitue com vantagens o LIA pois, além de informar quanto ao teste de lisina des-carboxilase, informa ainda quanto aos testes de motilidade e indol. Apesar do meio LIA detectar também produção de  $H_2S$ , para este teste o meio apresenta baixa sensibilidade(6,12).

Embora o meio de Moeller(15) seja aceito universalmente como meio de referência para o teste de lisina em enterobactérias(6), nossos dados mostraram reações falso-positivas para *Citrobacter* e *E. cloacae*, principalmente após três dias de incubação (Tabela 1). Com relação ao meio de Falkow(8), observamos resultados falso-positivos, também, com amostras de *C. freundii* e *E. cloacae* (Tabela 1), dados estes semelhantes aos obtidos por outros autores(1,3). O método de Falkow também tem sido considerado insatisfatório na identificação de *Klebsiella*(3) e de outros organismos Voges-Proskauer positivos(4). No presente estudo, os resultados dos testes de lisina no meio LIA foram os esperados, confirmando os excelentes resultados relatados na literatura com este meio(2,4,10,16), o que nos levou a adotá-lo como meio de referência para os testes de lisina.

A reunião de três testes fundamentais na identificação de enterobactérias em um único meio, como ocorre no MILi, simplifica consideravelmente a identificação destes microrganismos, além de representar notável economia de tempo e de material aos laboratórios de bacteriologia. O meio além de extremamente confiável, para a realização dos testes mencionados, apresenta a vantagem de permitir a leitura dos testes em apenas 20h, abreviando, portanto, o período para se concluir o diagnóstico laboratorial.

Ao encerrarmos a fase experimental do presente estudo, tomamos conhecimento do trabalho de Reller & Mirrett(16), informando quanto aos mesmos testes presentes no MILi, em que os autores obtiveram resultados idênticos aos relatados neste trabalho, com exceção de que 18,8% das amostras de *Y. enterocolitica* apresentaram reações falso-negativas para indol(16).

#### Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro concedido pela Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

#### Referências Bibliográficas

1. Bonev, S.I.; Zakhariev, Z. & Gentchev, P. - Comparative study of media for determination of lysine decarboxylase activity. *Appl. Microbiol.*, 27:464-468, 1974.
2. Brooker, D.C.; Lund, M.E. & Blazevic, D.J. - Rapid test for lysine decarboxylase activity in *Enterobacteriaceae*. *Appl. Microbiol.*, 26:622-623, 1973.
3. Cowan, S.T. & Steel, K.J. - Manual for the identification of me-

- dical bacteria. New York, Cambridge University Press, 1965.
- 4. Douglas, G.W. & Washington II, J.A. - Identification of *Enterobacteriaceae* in the clinical laboratory. Atlanta, CDC Publ., Center for Disease Control, 1969.
  - 5. Ederer, G.M. & Clark, M. - Motility-indole-ornithine medium. *Appl. Microbiol.*, 20:849-850, 1970.
  - 6. Edwards, P.R. & Ewing, W.H. - Identification of *Enterobacteriaceae*. 3.ed. Minneapolis, Burgess Publ., 1972.
  - 7. Edwards, P.R. & Fife, M.A. - Lysine-iron agar in the detection of *Arizona* cultures. *Appl. Microbiol.*, 9:478-480, 1961.
  - 8. Falkow, S. - Activity of lysine decarboxylase as an aid in the identification of *Salmonellae* and *Shigellae*. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 29:598-600, 1958.
  - 9. Frobisher, M. - Fundamentals of microbiology. 8.ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 1968.
  - 10. Johnson, J.G.; Kunz, L.J.; Barron, W. & Ewing, W.H. - Biochemical differentiation of the *Enterobacteriaceae* with the aid of lysine-iron-agar. *Appl. Microbiol.*, 14:212-217, 1966.
  - 11. Kauffmann, F. - *Enterobacteriaceae*. 2.ed. Copenhagen, Ejnar Munksgaard, 1951.
  - 12. Lennette, E.H.; Spaulding, E.H. & Truant, J.P. - Manual of clinical microbiology. 2.ed. Washington, American Society for Microbiology, 1974.
  - 13. Marymont III, J.H.; Marymont Jr., J.H. & Gavan, T.L. - Performance of *Enterobacteriaceae* identification systems. *Amer. Soc. Clin. Pathol. (Suppl.)*, 70:539-547, 1978.
  - 14. Moeller, V. - Activity determination of amino acid decarboxylases in *Enterobacteriaceae*. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.*, 34:102-114, 1954.
  - 15. Moeller, V. - Simplified tests for some amino acid decarboxylases and for the arginine dihydrolases system. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.*, 36:158-172, 1955.
  - 16. Reller, L.B. & Mirrett, S. - Motility-indole-lysine medium for presumptive identification of enteric pathogens of *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.*, 2:247-252, 1975.
  - 17. Vracko, R. & Sherris, J.C. - Indole-spot test in bacteriology. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 39:429-432, 1973.

## ESCHERICHIA COLI STRAINS PRODUCING LT TOXIN ISOLATED FROM PROCESSED FOOD

Isabel C. Affonso Scaletsky  
Maria de Lourdes Monteiro da Silva  
Maria Henriqueta L. dos Reis  
& Luiz R. Trabulsi

Escola Paulista de Medicina  
Dept<sup>o</sup> de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia  
Caixa Postal 20342  
01000 São Paulo SP, Brasil

### Summary

Nine *E. coli* strains isolated from raw hamburgers, keebes or sausages and producing LT toxin, were studied for drug resistance and production of colicin, hemolysin and H<sub>2</sub>S. Five strains were sensitive to the drugs used and negative to the other characteristics. Three strains had the phenotype SmTcHlyCol LT and one the phenotype SmTcHly LT. These four strains were mated with *E. coli* K12 MA335. The drug resistance genes were transferred in all mating experiments. Two strains transferred the Col plasmid, one strain the Hly plasmid and the remaining one the Ent plasmid. The evidence was that the characteristics studied are located in different plasmids.

### Resumo

*Escherichia coli* produtoras da toxina LT, isoladas de alimentos processados

Nove linhagens de *E. coli* isoladas de hamburgers, quibes ou linguiças cruas e produtoras da toxina LT foram estudadas quanto à resistência a drogas e produção de colicina, hemolisina e H<sub>2</sub>S. Cinco linhagens mostraram-se sensíveis às drogas utilizadas e negativas às demais características. Três linhagens apresentaram o fenótipo SmTcHlyCol LT e uma o fenótipo SmTcHly LT. Essas quatro linhagens foram conjugadas com a *E. coli* K12 MA335. Os genes de resistência a drogas foram transferidos em todos os experimentos de conjugação. Duas linhagens transferiram o plasmídio Col, uma linhagem o plasmídio Hly e a terceira o plasmídio Ent. As evidências são de que as características estudadas estão localizadas em plasmídios independentes.

### Introduction

Enterotoxigenic *Escherichia coli* strains have been associated with diarrhea both in humans and animals(5,6,8,11). These strains produce the heat-labile (LT) or the heat-stable (ST) enterotoxin or both. The

\*A part of the M.S. Thesis of the first author presented to Escola Paulista de Medicina, 1981.

production of LT and ST is coded by plasmids named Ent(13). Enterotoxigenic *E. coli* have also been isolated from other sources, such as food and river water(9,10).

The objective of this work was to study the LT strains isolated from raw processed food isolated in our laboratory regard to the kind of plasmids they contain, such as R, Col, Hly plasmids and those responsible for the production of  $H_2S$ . The relationship among these plasmids including Ent plasmids was studied by mating experiments.

#### Material and Methods

**Strains** - Nine LT strains isolated in our laboratory(9) from raw processed food of animal origin were studied (Table 1). The hamburgers, keebes and sausages were processed by the same producer and purchased in the same supermarket in São Paulo, from July to October, 1977. *E. coli* K12 MA335 was used as the recipient strain in mating experiments and as an indicator strain for colicin.

Table 1 - Enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* used

Strains	Source	Serogroup
TR100	hamburger (swine)	O149:H10
TR101	hamburger (swine)	O151:H8
TR102	hamburger (swine)	nt:H6
TR103	hamburger (swine)	nt:H4
TR104	keebé (bovine)	nt:H4
TR105	keebé (bovine)	nt:H4
TR106	sausage (swine)	O149:H10
TR107	sausage (swine)	O149:H10
TR108	sausage (swine)	O149:H10

nt - not typed.

**Microbiological tests** - The technique employed for detection of colicin was described by Azevedo & Costa(1). The strains were cultivated on LB medium and tested on L plates containing 2% agar with a 0,2% top layer. For the test of production of hemolysin the strains were grown on Columbia Agar Base (Oxoid) plates containing 5% sheep erythrocytes previously washed with PBS. Hemolysis was detected after incubation at 37°C for 24 hr. The production of  $H_2S$  was tested by growing the strains in EPM medium.\*

The positive strains develop a black color in the medium. For the detection of LT enterotoxin the system used was the Y-1 mouse adrenal

\*Toledo, M.R.F.; Fontes, C.F. & Trabulsi, L.R. - EPM - uma modificação do meio de Rugai e Araujo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose,  $H_2S$ , urease e triptofano desaminase. Rev. Microbiol. (S. Paulo), 13(4), 1982. (in press.)

tumor cell(3), as modified for microtiter plates by Sack & Sack(12). The strains were characterized for drug resistance by the plate-dilution method(16). The following drugs were employed: sulfadiazine (Su), streptomycin (Sm), tetracycline (Tc), chloramphenicol (Cm), kanamycin (Km), ampicillin (Ap), nalidixic acid (Nal) and mercuric chloride (Hg). The concentrations were 1, 5, 10, 20, 50, and 100 $\mu$ g/ml for Sm, Tc, Cm, Km, Ap and Hg, 100 and 500 $\mu$ g/ml for Su, and 1, 5, 10, and 20 $\mu$ g/ml for Nal. The media used were Müller-Hinton Agar (Difco) for the plates containing Su and Nutrient Agar (Difco) for the other drugs. The strains were considered resistant when they grew in the presence of 100 $\mu$ g/ml of Su, 10 $\mu$ g/ml of Sm, Cm, Km and Ap and 5 $\mu$ g/ml of Tc, Nal and Hg. This criterion was based upon the distribution curves previously made in our laboratory, regarding the resistance of *E. coli* strains to these drugs (unpublished data).

*Mating experiments* - The strains were mated with *E. coli* K12 MA335 to verify if the characteristics detected were associated with plasmids. The strains were grown in Brain Heart Infusion Broth (BHI, Difco), and mating was performed at the ratio of 1ml of the donor and 1ml of the recipient at 37°C for 2hr in the absence of aeration. Transconjugants harboring R plasmids were selected on different Nutrient Agar plates containing each drug to which the donor strains were resistant. The concentrations of the drugs were: 10 $\mu$ g/ml for Sm, 5 $\mu$ g/ml for Tc, and 20 $\mu$ g/ml for Nal. Transfer of colicin production was tested in 50 colonies picked from the selective plates containing Nutrient Agar plus Nalidixic acid. Blood-agar selective plates containing the same drug were used for the study of the transfer of hemolysin production.

*Co-transfer studies* - About 40 transconjugants from each selective plates containing streptomycin or tetracycline were purified in the same medium and then tested for the other characteristics of the donor, i.e., Sm or Tc, hemolysin, colicin and LT production. The transfer of Ent plasmid was studied only by co-transfer procedure since it was not possible to select toxigenic transconjugants.

## Results

Five strains (TR101, TR102, TR103, TR104 and TR105) were sensitive to all the drugs used and negative to the other characteristics. Three strains (TR100, TR107 and TR108) are resistant to streptomycin and tetracycline and produce hemolysin, colicin and LT. One strain (TR106) is resistant to streptomycin and tetracycline and produces hemolysin and LT. These four strains belong to serotype O149:H10. H<sub>2</sub>S was not detected in any of the nine strains.

As these last four strains showed characteristics that could be associated with plasmids they were mated with *E. coli* K12 MA335 and transconjugants were selected according to the pattern of the donor strain as described in Material and Methods. The results obtained with this procedure showed that all four strains transferred the drug resistance genes at similar frequencies. Colicin and hemolysin transfer could not be detected on blood agar and nutrient agar plates (Table 2).

The association between drug resistance, colicin, hemolysin and LT production was studied by co-transfer tests. Six out of 160 drug-resistant transconjugants of strains TR107 and TR108 produced colicin and 2 of 76 transconjugants derived from strain TR100 produced hemolysin. None of these transconjugants produced the LT toxin. Production of LT occurred in 21 of 77 drug-resistant transconjugants

Table 2 - Transfer of the characteristics of the *E. coli* LT strains

strain	Pattern	Selective plate	Transfer frequency	No of colonies tested	No/pattern of the transconjugants
TR100	SmTcHlyCol LT	Sm	$2.40 \times 10^{-8}$	40	25 SmTc (1 Hly) 15 Sm (1 Hly)
		Tc	$1.66 \times 10^{-9}$	36	36 SmTc
		blood agar	nd	nt	nt
		nutrient agar	nd	50	nt
TR106	SmTcHly LT	Sm	$4.43 \times 10^{-7}$	50	35 SmTc 5 Sm
		Tc	$8.33 \times 10^{-6}$	37	37 SmTc (21 LT)
		blood agar	nd	nt	nt
		Sm	$1.06 \times 10^{-6}$	40	37 SmTc 3 SmTcCol
TR107	SmTcHlyCol LT	Tc	$9.91 \times 10^{-7}$	40	39 SmTc 1 SmTcCol
		blood agar	nd	nt	nt
		nutrient agar	nd	50	nt
		Sm	$5.63 \times 10^{-7}$	40	36 SmTc 4 Sm
TR108	SmTcHlyCol LT	Tc	$5.29 \times 10^{-7}$	40	38 SmTc 2 SmTcCol
		blood agar	nd	nt	nt
		nutrient agar	nd	50	nt

Sm - streptomycin; Tc - tetracycline; Hly - hemolysin; Col - colicin; LT - heat-labile toxin; nd - not determined; nt - no transconjugants.

derived from strain TR106 (Table 2).

#### Discussion

Enterotoxigenic *E. coli* strains have long been known to be responsible for diarrhea in young animals, such as piglets and calves, and are, therefore, of economic importance. Furthermore some plasmids have been associated with certain characteristics that confer virulence to bacteria, such as, for example, those related to the colonization factor (K and CFA antigens), Ent, Col V, Vir and other plasmids(4).

Some of these plasmids have been detected with high frequency among strains isolated from animals. For example, the Col and Hly plasmids have been reported to occur in porcine *E. coli* strains both from toxigenic and normal flora. They were also found in bovine *E. coli* strains from normal flora(5,7).

The strains we used in the present investigation were isolated from raw processed food of swine and bovine origin. The phenotypes of these strains are similar to those described by Gyles & col.(7) and Falkow(5), since the bovine strains produce only the LT toxin and the porcine strains produce also colicin and hemolysin in addition to drug resistance.

Mating experiments revealed that all four strains transferred their drug resistant genes. All of them showed uniform behavior: the transconjugants were resistant either to SmTc or to Sm (Table 2), sugges-

ting the presence of two R plasmids in the donors, one containing the genes for resistance to Sm and Tc and the other responsible for Sm resistance.

Considering the transfer of LT, colicin and hemolysin, in each strain only one of these characteristics was transferred. Our results are different from those obtained by Smith & Linggood(14) when they studied the transfer of Ent, Hly, R, Col and K88 plasmids from an *E. coli* donor. The transconjugants obtained by these authors showed one to four of these characteristics simultaneously, such as Col, R, Ent and Hly.

The role of Ent, K88 and Hly plasmids in the pathogenesis of diarrhea has been studied by Smith & Linggood(15). These authors found that the Ent plasmid alone did not permit the strain to elicit a diarrheal response but the combination of Ent plasmid plus the K88 plasmid was associated with a high incidence of severe diarrhea. Hly plasmid had no apparent effect on the pathogenicity of the strain.

On the other hand, Falkow(5) suggests that the combination of the additive survival value of Ent and K88 (and, although not apparent as yet, probably Hly as well) in some cases can result in the development of a strain that is not only very well adapted to its animal host but can now cause overt disease.

Furthermore, considering the recent description of Col V plasmids harboring genes for a specialized system for iron uptake(17) and probably to adhesion phenomenon(2) we believe that investigation of plasmids in pathogenic strains can contribute to clarify or to enrich the understanding of the mechanisms of pathogenicity in bacteria.

#### Acknowledgments

This investigation was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), II Plano Integrado de Genética, grant nº 2222.1595/77 and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

#### References

1. Azevedo, J.R. & Costa, S.O.P. - Exercícios práticos de genética. São Paulo, Nacional e Edusp, 1973.
2. Clancy, J. & Savage, D.C. - Another colicin V phenotype: "in vitro" adhesion of *E. coli* to mouse intestinal epithelium. *Infect. Immun.*, 32:343-352, 1981.
3. Donta, S.T.; Moon, H.W. & Whipp, S.C. - Detection of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin with the use of adrenal cells in tissue culture. *Science*, 183:334-336, 1974.
4. Elwell, L.P. & Shipley, P.L. - Plasmid-mediated factors associated with virulence of bacteria to animals. *Ann. Rev. Microbiol.*, 34:465-496, 1980.
5. Falkow, S. - Plasmids which contribute to the pathogenicity of enteric organisms. In: - *Infectious multiple drug resistance*. London, Pion, p. 253-273, 1975.
6. Gyles, C.L. & Barnum, D.A. - A heat-labile enterotoxin from strains of *Escherichia coli* enteropathogenic for pigs. *J. Infect. Dis.*, 120:419-426, 1969.

7. Gyles, C.L.; So, M. & Falkow, S. - The enterotoxin plasmids of *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*, 130:40-49, 1974.
8. Kohler, E.M. - Observations on enterotoxins produced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 176:212-219, 1971.
9. Reis, M.H.L.; Matos, D.P.; Castro, A.F.P.; Toledo, M.R.F. & Trabulsi, L.R. - Relationship among enterotoxigenic phenotypes, serotypes and sources of strains in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 28:24-27, 1980.
10. Reis, M.H.L.; Vasconcelos, J.C. & Trabulsi, L.R. - Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* in some processed raw food from animal origin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39:270-271, 1980.
11. Sack, R.B. - Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Microbiol.*, 29:333-353, 1975.
12. Sack, D.A. & Sack, B.R. - Test for enterotoxigenic *Escherichia coli* using Y-1 adrenal cells in miniculture. *Infect. Immun.*, 11:334-336, 1975.
13. Smith, H.W. & Halls, S. - The transmissible nature of the genetic factor in *Escherichia coli* that controls enterotoxin production. *J. Gen. Microbiol.*, 52:319-334, 1968.
14. Smith, H.W. & Linggood, M.A. - Transfer factors in *Escherichia coli* with particular regard to their incidence in enteropathogenic strains. *J. Gen. Microbiol.*, 62:287-299, 1970.
15. Smith, H.W. & Linggood, M.A. - Observations on the pathogenic properties of the K88, Hly and Ent plasmids of *Escherichia coli* with particular reference to porcine diarrhoea. *J. Med. Microbiol.*, 4:467-485, 1971.
16. Trabulsi, L.R.; Zuliani, M.E. & Toledo, M.R.F. - Resistance to nine drugs of *Shigella* strains isolated in São Paulo between 1963 and 1968. *Rev. Microbiol.*, 1:71-77, 1970.
17. Williams, P.H. - Novel iron uptake system specified by Col V plasmids: an important component in the virulence of invasive strains of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 26:925-932, 1979.

## SEROLOGICAL RESPONSE TO MEASLES VACCINE (SCHWARZ STRAIN) IN A LOW-INCOME POPULATION AT RIO DE JANEIRO

Hermann G. Schatzmayr  
Rita Maria R. Nogueira  
Jorge Antonio Z. Bermudez  
Angela T. Pinhão  
Brivaldo Queiroz  
Leila R. Venâncio  
Cinira Eugenia R. de Assis  
& Tizuko Shiraiwa

Fundaçāo Oswaldo Cruz, Caixa Postal 926  
20000 Rio de Janeiro RJ, Brasil

403 children with ages between 7 to 25 months living in a low income area nearby the Campus of the Oswaldo Cruz Foundation have received vaccine (Schwarz strain). This vaccine has been processed and lyophilized by the Measles Production Unit from Bio-Manguinhos, institution belonging to the Oswaldo Cruz Foundation and responsible for production and technical development; the original bulks have been imported from the Merieux Institut, Lyon, France. Different batches have been used for the vaccination, all of them according to international standards including potency (at least 1000 TCD<sub>50</sub>/dose). The studied population is under control of a Health Unit, located at the campus of the Foundation (National School of Public Health), were the children have basic medical care and obligatory vaccinations required by national authorities are carried out. Blood specimens have been collected before and 4 to 8 weeks after vaccination. The sera have been tested for hemagglutination inhibition antibodies starting from 1/10 using antigen purchased from Behringwerke, A.G. and red blood cells at 1%, of rhesus monkeys from the Oswaldo Cruz Foundation primate colony.

The antigen-serum mixtures were incubated by one hour, at room temperature, before the red blood cells were added and thereafter they were incubated a 37°C for 90 minutes, before reading. The sera have been previously inactivated and adsorbed with rhesus blood cells. The results are presented at Table 1.

The conversion rate clearly increases with the age of infants and reach more than 80% by the nine age month. A poorer response to the vaccination occurs at the lower ages.

The response to measles vaccine and the role of inhibitors for the vaccinal virus, of maternal origin, are now under careful evaluation. The need of vaccination at low ages (less than 1 year old) in developing countries and the long-lasting inhibitors, make necessary studies on the sero conversions at these ages.

Our results agree with the ones obtained in Tanzania (World Health Organization, Wkly Epidem. Rec., 56:234-237, 1981) and Tunisia (Roumantzeff M. & col., Second International Conference on the impact of viral diseases on the development of African and Middle East countries. Nairobi, Kenya, December 1980), the last obtained with the

Table 1

Age/ months	Total number of infants	Infants without HI antibodies (<10)	Sero conversion	% of conversion
7	57	55	32	58.18
8	89	85	60	70.59
9	68	64	53	82.81
10	30	27	24	88.89
11	25	22	20	90.91
12-13-14	31	27	25	92.59
15-16-17-18	24	21	21	100
19-24	38	25	21	84
25	41	23	18	78.21
Total	403	349	274	78.51
Total ≥ 9	257	209	182	87.08

same virus strain. In these studies a low conversion (about 50%) occurred in the 6-7 months age group.

At Tanzania sero conversions higher than 80% were obtained only in the children older than 1 year; in this point, our results and the ones in Tunisia are more closely related.

A study at São Paulo by Stewien & col. (Stewien K.E. & col., Infection, 6:207-210, 1978) using only 38 children show a very low conversion at 7<sup>th</sup> age month (only 16.7%); 87.5% however has been reached by the 11<sup>th</sup> age month.

Simulation studies, using the Tanzania data shows that for a single immunization, the optimal age range is 8-11 months for preventing morbidity and 9-12 months for preventing mortality.

Our results confirm that from the 9<sup>th</sup> age month, considering the population as a whole, fairly good conversion rates may be obtained by using one shot.

## A IMUNOHEMADSORÇÃO, ATRAVÉS DE RECEPTORES Fc, COMO PROVA DIFERENCIAL NO ISOLAMENTO DE HERPETOVÍRUS\*

Ricardo Ishak

Centro de Ciências Biológicas UFPA  
 Deptº de Patologia, Laboratório de Virologia  
 Campus Universitário do Guamá  
 66000 Belém PA, Brasil

Warren A. Andiman

Yale University, School of Medicine  
 Department of Epidemiology and Public Health  
 New Haven, Connecticut, USA

Maria de Lourdes C. Gomes

& Célia M. Nakauth

Instituto Evandro Chagas, Seção de Virologia  
 Av. Almirante Barroso, 492  
 66000 Belém PA, Brasil

### Resumo

O aparecimento de receptores, para a porção Fc da imunoglobulina G, na membrana de células infectadas por herpetovírus, é aproveitado como teste diferencial, para identificação de isolamentos destes agentes. A imunohemadsorção, prova que se realiza na detecção daqueles receptores, é uma técnica rápida, econômica, simples, sensível, específica, reproduzível, confiável e segura que pode ser usada com sucesso para esta finalidade.

### Summary

*Immune hemadsorption through Fc receptors as a differential routine test in the isolation of herpetovirus*

Receptors for the Fc portion of the immunoglobulin G appear onto the surface membrane of herpesvirus-infected cells. This is useful as a differential test to identify isolations of those viral agents. Immunehemadsorption, one of the ways one can detect those receptors, is a rapid, economic, simple, sensitive, specific, reliable and safe technique to be used with success to this aim.

### Introdução

Desde a primeira metade dos anos 60, vários trabalhos descreveram a distribuição de receptores Fc (RFc), em grande variedade de células, como neutrófilos, monócitos, macrófagos, mastócitos, plaquetas, linfócitos e populações de células malignizadas. Em 1964, foi mostrado que células infectadas pelo vírus herpes simples (VHS), podiam hemad-

\* Trabalho realizado no Laboratory of Clinical Investigation, Yale University, USA, e na Seção de Virologia do Instituto de Patologia Tropical UFGO.

sorver eritrócitos de carneiro(2,8,9,13,18).

A hemadsorção descrita apresentava uma etapa, além da então recentemente descrita, aderência de eritrócitos a monocamadas, pelo vírus da *influenza*(12). Com o VHS, os eritrócitos eram recobertos por um soro de coelho, com atividade anti-eritrócito de carneiro. A hemadsorção era mediada por estas moléculas de imunoglobulina, que revestiam o eritrócito e, mais especificamente, através da porção Fc da imunoglobulina G (IgG). Foi presumido, e mais tarde comprovado, que as células infectadas pelo VHS desenvolviam, em sua superfície, afinidade para a região Fc da IgG(18).

A detecção de RFC varia com o estágio da infecção, porém, em geral, seu aparecimento dá-se no início do ciclo replicativo do vírus(6,14, 15). Entre os herpetovírus, a expressão de RFC já foi mostrada, em células infectadas pelo VHS-1(4,13,16), VHS-2(3), citomegalovírus humano(5,7,10,15), citomegalovírus do macaco (Hsiung, G.D., comunicação pessoal), vírus herpes-like do cobaio(6), citomegalovírus de cobaio (6), vírus de Epstein-Barr(1,11) e células de hamster transformadas pelo VHS-1 e VHS-2(17).

Este trabalho visa mostrar a utilidade de RFC, no laboratório de diagnóstico de vírus, pelo uso de uma técnica simples e altamente lucrativa em termos de resultados, a imunohemadsorção.

#### Material e Métodos

*Culturas celulares* - Foram utilizadas duas linhagens de células Vero (LCI e IEC) e uma linhagem diplóide, de fibroblastos de placenta humana (FPH), com empregos dos meios MEME, 199 e BME, respectivamente, suplementados com soro bovino fetal a 10%, para crescimento e, a 5%, para manutenção, com exceção da linhagem VERO-IEC, a qual era suplementada com soro bovino fetal, na proporção de 5% e 2%, respectivamente.

As linhagens estoque eram dispersadas, após tratamento com tripsina, a 0,25% e mantidas, após sementura, a 37°C. Ao meio de manutenção e crescimento eram adicionados penicilina (100 unidades/ml), estreptomicina (100 $\mu$ g/ml) e fungizone (1-3 $\mu$ g/ml).

*Cepas virais* - A cepa VHS-LCI foi proveniente de isolamento, a partir de lesões vaginais de paciente que se apresentou ao laboratório de vírus do Laboratory of Clinical Investigations (LCI), Yale University, New Haven, Connecticut, USA. Como a maioria do trabalho foi desenvolvida com esta cepa, preparou-se um estoque de vírus em FPH por métodos padrões(6).

A cepa VHS-IPT originou-se de isolamento a partir de lesões do prepúcio de paciente que se apresentou ao laboratório de diagnóstico de vírus do Instituto de Patologia Tropical da UFGO, Goiânia, Goiás (Ishak,R., dados não publicados).

As cepas de poliovírus 2 e coxsackie B4 foram amostras de teste de controle de qualidade do Center for Disease Control, Atlanta, Georgia, USA; o adenovírus foi originado de isolamento a partir de swab de nasofaringe feito no LCI.

*Eritróцитos* - Sangue total de carneiro, em solução de Alsever, era obtido semanalmente, da Baltimore Biological Laboratory (BBL) ou coletado de animais, mantidos no biotério do IPT-UFGO.

*Soros* - Soro de coelho normal foi obtido de animais do biotério do

LCI e soro de coelho, com atividade anti-eritrócito de carneiro (SCAC), adveio de fonte comercial (BBL).

*Sensibilização de eritrócitos* - Este termo é usado para denotar o revestimento dos eritrócitos, com seu respectivo antisoro. Consiste em misturar partes iguais de suspensão a 2% (em PBS, pH 7,2), de eritrócitos de carneiro, com SCAC, em diluição não-aglutinante. A mistura é incubada por 30 minutos, a 37°C e, após três lavagens com PBS, uma suspensão a 0,5% (em PBS) é preparada para uso. Eritrócitos "sensibilizados" com soro não-homólogo eram usados como controle.

*Imunohemadsorção (IHd)* - Esta técnica foi realizada segundo procedimento previamente descrito(13,16), em tubos contendo monocamadas celulares infectadas. Como controle, eram utilizados tubos não-infectados. A IHd consiste em remover o meio de manutenção, lavar a monocamada por duas vezes com PBS e adicionar 0,5ml/tubo de eritrócitos sensibilizados (a 0,5%). Incuba-se por uma hora, a temperatura ambiente, faz-se uma lavagem com PBS, para remover o excesso de eritrócitos e procede-se a leitura, à microscopia óptica comum. A positividade do teste é determinada pelo aparecimento de rosetas, isto é, quando existam pelo menos cinco ou mais eritrócitos, em volta de cada célula da monocamada.

*Deteção de Mycoplasma em linhagens celulares* - Células da linhagem Vero-IEC, com 4-7 dias de semeadura, eram tripsinizadas e semeadas (0,2ml) em placas, contendo mistura de Bacto PPLO Agar (Difco) e Mycoplasma Enrichment (Eaton Agent Enrichment), na proporção de sete para três. As placas eram incubadas em aerobiose e após dois dias, eram observadas em microscópio invertido. As placas positivas mostravam colônias arredondadas, com a porção central mais densa que a periférica, com o aspecto de um ovo frito. As colônias possuíam desenvolvimento para o interior do agar e, quando coradas pelo corante de Dienes (diluído 1:100 em solução salina), após uma hora a temperatura ambiente, mostravam-se com azul escuro, na porção central e azul claro, na periferia. Ambas características são propriedades de *Mycoplasma*.

## Resultados

*A IHd como um teste diagnóstico* - O primeiro objetivo foi tentar utilizar a característica de células infectadas por herpetovírus, a expressão de RFc, em um teste rápido, para o diagnóstico, pois já existiam evidências de que estes receptores apareciam tão cedo quanto seis horas, após a infecção(14,16). Assim, para determinar a sensibilidade da IHd, em detectar a replicação viral, a nível de início de infecção ("early infection"), foram testados tubos com monocamadas Vero-LCI com VHS-LCI em duas diluições (Tabela 1). O vírus foi inoculado com baixo MOI (Multiplicity of Infection) de  $< 3 \times 10^{-2}$  partículas infecciosas/célula, para evitar a lise da monocamada, em tempo muito curto e para tentar aproximar a quantidade do inóculo, que é encontrado em muitos espécimes que chegam ao laboratório.

O teste não foi suficientemente sensível, para servir de diagnóstico. Primeiro, as rosetas não precederam o aparecimento de efeito citopático (ECP). Além disso, a formação de rosetas, em geral, ocorria apenas ao redor de focos de ECP. Tubos controle foram todos negativos.

*Especificidade dos RFc* - Com a finalidade de investigar a possibilidade de que os RFc pudessem aparecer como modificação física inespe-

Tabela 1 - Sensibilidade da imunohemadsorção, como um teste para a detecção rápida de células Vero (linhagem LCI) infectadas pelo vírus do herpes simples (cepa LCI) (1)

Técnicas	Horas após a infecção									
	5	6	7	8	9	10	11	12	24	48
ECP (diluição 10 <sup>-1</sup> )	0	0	?	+	1+	1+	1+	1+	2+	3+
Imunohemadsorção	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+
ECP (diluição 10 <sup>-2</sup> ) (2)	0							+	1+	2+
Imunohemadsorção	0							+	+	+

(1) Veja o texto para detalhes técnicos.

(2) Espaços em branco significam "não realizado".

cífica, da membrana plasmática, durante um ciclo lítico, infectaram-se linhagens celulares com cepas de poliovírus tipo 1, coxsackie B4 e um adenovírus. Especulou-se a possibilidade de que o ECP, causado pelos herpetovírus, levando ao arredondamento da célula e alterações do plasmalema, pudesse, por si só, levar à ligação da IgG à célula infectada. Estes três vírus, os quais em seu ECP também levam ao arredondamento de células, não causaram a formação de rosetas durante a reação de IHd.

Para tentar comprovar, ainda, a especificidade dos RFC com os herpetovírus e se o fato de uma contaminação da linhagem celular por *Mycoplasma*, muito comum dentro do laboratório de vírus, poderiam interferir na expressão desses receptores, inoculou-se a cepa VHS-IPT na linhagem celular Vero-IEC. A reação de IHd não foi diferente daquela observada em linhagens não contaminadas.

## Discussão

A evidência de que RFC aparecem em células infectadas por herpetovírus, até seis horas após a infecção(14,16), foi encorajadora para a adaptação do teste de IHd, para fins de diagnóstico rápido de víroses.

Outros investigadores, usando inóculos com um alto MOI, já reportaram a formação de rosetas, após seis horas de infecção(3,14), mas o nosso sistema de IHd, para detecção de RFC não foi sensível, o suficiente, para detectar os receptores, nesta fase do ciclo lítico, quando se usou inóculos de baixo MOI. Além disso, os trabalhos citados não comentam o aparecimento de ECP; em nosso sistema, ECP e IHd ocorreram simultaneamente. Este fato, a nosso ver, é de pouco valor, no diagnóstico rápido, pois o ECP dos herpetovírus, na maioria das vezes, é bastante característico. Em um dos trabalhos citados, Westmoreland & Watkins(16) utilizaram-se de autoradiografia, para detecção de receptores. Apesar do método ser altamente sensível para este fim, é uma metodologia cara e tediosa, para o laboratório de diagnóstico, o qual lucra mais a simples visualização do ECP.

É frequente que o diagnóstico de uma virose seja efetuado, prima-

riamente, baseando-se, unicamente, no ECP do agente em culturas celulares. Este parâmetro, entretanto, nem sempre é tão característico, variando até mesmo entre cepas do mesmo vírus. Sugerimos, então, a adição de uma prova diferencial, a IHd, para o diagnóstico de agentes da família *Herpetoviridae*, em particular para o VHS e o citomegalovírus humano. Esta técnica pode ser de grande valor, na diferenciação de certos isolamentos atípicos destes dois vírus, além de separá-los do vírus da varicela-zoster, o qual, aparentemente, não mostrou, até o momento, a propriedade de induzir RFC, em células que infecta(6).

O procedimento da IHd dá resultado, facilmente evidenciado, através de microscopia óptica comum e tem mostrado ser uma técnica rápida (leva no máximo 2:30 horas), econômica (os reagentes são encontrados facilmente e a preços acessíveis), simples (qualquer indivíduo é capaz de realizá-la), sensível (desde que tenha ECP, o teste será positivo), específica (somente os herpetovírus têm mostrado reação positiva), reproduzível (dois indivíduos diferentes são capazes de chegar ao mesmo resultado), confiável (duas cepas diferentes levam à formação de rosetas) e segura (com uma chama, uma cuba para descarte do material e o trabalho sendo realizado em câmara asséptica, o perigo de contaminação, para o manipulador, reduz-se a zero).

Até mesmo o fato da linhagem celular estar contaminada, por um agente comum dentro do laboratório, como são *Mycoplasma*, não interfere na expressão de RFC, o que lhe dá ainda maior valia, como uma prova diferencial, rápida, no laboratório de diagnóstico de viroses.

#### Referências Bibliográficas

1. Andiman, W.A. & Miller, G. - Properties of Epstein-Barr virus transformed wooly monkey lymphoblastoid cell lines (40083). Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 157:488-492, 1978.
2. Costa, J.C. & Rabson, A.S. - Role of Fc receptors in herpes simplex virus infection. Lancet, 1:77-78, 1975.
3. Costa, J.; Rabson, A.S.; Yee, C. & Tralka, T.S. - Immunoglobulin binding to herpes-virus induced Fc receptors inhibits virus growth. Nature, 269:251-252, 1977.
4. Feorino, P.M.; Shore, S.L. & Reimer, C.B. - Detection by immunofluorescence of Fc receptors in cells acutely infected with herpes simplex virus. International Archives of Allergy and Applied Immunology, 53:222-233, 1977.
5. Furukawa, T.; Hornberger, E.; Sakuma, S. & Plotkin, S.A. - Demonstration of immunoglobulin G receptors induced by human cytomegalovirus. Journal of Clinical Microbiology, 2:333-336, 1975.
6. Ishak, R. - Induction of receptors for the Fc portion of immunoglobulin G by herpes-virus infected cells. Yale University, New Haven, Connecticut, USA, 1978. (Thesis).
7. Keller, R.; Peitchel, R.; Goldman, J.N. & Goldman, N. - An IgG-Fc receptor induced in cytomegalovirus-infected human fibroblasts. Journal of Immunology, 116:772-777, 1976.
8. Kerbel, R.S. - Herpes virus induction of Fc receptors. Nature, 263:192, 1976.
9. Kerbel, R.S. & Davies, A.J.S. - The possible biological signifi-

- cance of Fc receptors on mammalian lymphocytes and tumor cells. *Cell*, 3:105-112, 1974.
10. Rahman, A.A.; Teaschner, M.; Sethi, K.K. & Brandis, H. - Appearance of IgG (Fc) receptor(s) on cultured human fibroblasts infected with human cytomegalovirus. *Journal of Immunology*, 117:252-258, 1976.
  11. Robinson, J.E.; Andiman, W.A.; Henderson, E. & Miller, G. - Host-determined differences in expression of surface marker characteristics on human and simian lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 74:749-753, 1977.
  12. Vogel, J. & Shelokov, A. - Absorption-hemagglutination test for influenza virus in monkey kidney tissue culture. *Science*, 126:358-359, 1957.
  13. Watkins, J.F. - Adsorption of sensitized sheep erythrocytes to HeLa cells infected with herpes simplex virus. *Nature*, 202:1364-1365, 1964.
  14. Watkins, J.F. - The relationship of the herpes simplex hemadsorption phenomenon to the virus growth cicle. *Virology*, 26:746-753, 1965.
  15. Westmoreland, D.; Jear, S.St. & Rapp, F. - The development of cytomegalovirus-infected cells of binding affinity for normal human immunoglobulin. *Journal of Immunology*, 116:1566-1570, 1976.
  16. Westmoreland, D. & Watkins, J.F. - The IgG receptor induced by herpes simplex virus: studies using radioiodinated IgG. *Journal of General Virology*, 24:167-178, 1974.
  17. Westmoreland, D.; Watkins, J.F. & Rapp, F. - Demonstration of a receptor for IgG in syrian hamster cells transformed with herpes simplex virus. *Journal of General Virology*, 25:167-170, 1974.
  18. Yasuda, J. & Milgrom, F. - Hemadsorption by herpes simplex infected cell cultures. *International Archives of Allergy*, 33:151-170, 1978.

# EFEITO DA CALAGEM NO NÚMERO DE ACTINOMICETOS E NA PORCENTAGEM DE BACTÉRIAS RESISTENTES À ESTREPTOMICINA NA RIZOSFERA DE MILHO, TRIGO E FEIJÃO

José Ivo Baldani  
Vera Lúcia Divan Baldani  
Deise Ferreira Xavier  
Robert Michael Boddey  
& Johanna Döbereiner

EMBRAPA (PNPBS) UFRRJ/CNPq, Km 47  
23460 Seropédica RJ, Brasil

## Resumo

Foi estudado, em experimentos de campo e de casa de vegetação, o efeito da calagem e da planta, no equilíbrio microbiano no solo, no solo do rizoplano e nas raízes. A calagem de LVE, LVA e PVA aumentou o número de actinomicetos no solo e no solo do rizoplano e a porcentagem de bactérias resistentes à estreptomicina (20 a 100 $\mu$ g/ml) no solo, no rizoplano e em raízes maceradas. Independentemente da calagem, houve, ainda, aumentos do número de actinomicetos no solo do rizoplano das três espécies e da porcentagem de bactérias resistentes à estreptomicina, em raízes maceradas de feijão e milho. Este aumento não foi observado no trigo. Os resultados representam evidência indireta da produção de estreptomicina no rizoplano de três culturas importantes e da acumulação de níveis acima de 20 $\mu$ g/ml deste antibiótico na superfície das raízes ou no seu interior.

## Summary

*Effect of liming on the number of actinomycetes and on the percentage of streptomycin resistant bacteria in the rhizosphere of maize, wheat and dry beans*

Changes in the microbial equilibrium due to rhizosphere effects and to liming acid soils were studied in greenhouse and field experiments. Liming of two oxisols and one red yellow podzolic soil increased numbers of actinomycetes in the soil and in rhizoplane soil of maize, wheat and beans (*Phaseolus vulgaris*). Simultaneous increases of the percentage of streptomycin resistant bacteria (20 to 100 $\mu$ g/ml) were observed not only in soil and rhizoplane soil but also in macerated roots. Independent of liming there were positive rhizosphere effects on the number of actinomycetes (rhizoplane soil only) and on the percentage of streptomycin resistant bacteria, which were highest in macerated roots in maize and bean but not in wheat. The results are indirect evidence for the production of streptomycin in the rhizosphere of three important agricultural crops and for the accumulation of concentrations above 20 $\mu$ g/ml of this antibiotic in niches on the root surface or within roots of these plants.

## Introdução

Actinomicetos têm sido encontrados, em grande proporção, na microflora de diversos solos(1,6) e, recentemente(7), foi mostrado que 77 a 98% do total de microrganismos, num solo ácido (pH 4.9) de cerrado, eram actinomicetos. Há consideráveis evidências de que actinomicetos podem ser antagônicos ao crescimento de *Rhizobium* em condições de laboratório(9,12,13,18,24,26). Parece provável que esta inibição seja devida à exudação de antibióticos, pelos actinomicetos, evidenciada, principalmente, pela presença de zonas de inibição, ao redor das colônias de actinomicetos(17). Problemas de nodulação de trevo, em solos virgens, têm sido atribuídos à predominância de actinomicetos no solo(9,13,18). Em áreas novas de cerrado, cultivadas com soja, surgiram dificuldades com inoculantes de *Rhizobium*, pois, os comerciais não produziram nodulação satisfatória, nos primeiros anos. As duas únicas estirpes (29W e 587) que obtiveram sucesso nestes solos apresentam resistência a 80 e 150 $\mu$ g/ml de estreptomicina, respectivamente, sugerindo que, nos cerrados, há níveis deste antibiótico acima dos habitualmente encontrados em outros solos(22). Isto vem sendo confirmado pela observação de que 85% das estirpes de *Rhizobium japonicum*, isoladas de nódulos de soja, crescida em solo de cerrado, após a calagem, apresentaram resistência a 80 $\mu$ g/ml de estreptomicina ou mais(22). Os mesmos autores observaram que o nível de resistência à estreptomicina, de estirpes de *Rhizobium*, isoladas de nódulos de *Stylosanthes* spp., crescidos em solos de cerrado nativo, foi um tanto mais baixo que o de *Rhizobium*, isolado de plantas crescidas em áreas com calagem. Isto sugere que a calagem tem um efeito, na produção de estreptomicina, pela microflora destes solos.

Döbereiner & Baldani(10) verificaram que estirpes de *Azospirillum*, isoladas de raízes esterilizadas de trigo e milho, apresentaram maior resistência à estreptomicina que a população geral de *Azospirillum* do solo. Brown(5) observou aumentos de bactérias resistentes à estreptomicina, na rizosfera de várias plantas, entre elas leguminosas e cereais. Se níveis significantes de estreptomicina são liberados por actinomicetos na rizosfera, há possibilidade de que este antibiótico seja absorvido pelas raízes e mesmo translocado para a parte aérea de diversas espécies(8,19). Com a presença deste antibiótico, na rizosfera e/ou nas raízes de leguminosas ou cereais, sob certas circunstâncias, a infecção dessas plantas por *Rhizobium* e *Azospirillum* spp., respectivamente, poderá ficar restrita a estirpes resistentes à estreptomicina. Este trabalho traz evidência adicional para as hipóteses acima formuladas.

## Material e Métodos

**Experimento I - Efeito da calagem na microflora da rizosfera de milho** - O experimento foi conduzido em casa de vegetação em vasos com 8kg de solo Latossol vermelho-amarelo (LVA) de cerrado ou Podzólico vermelho-amarelo (PVA) série Itaguai, com e sem calcário, com três épocas de colheita e com duas repetições. A adubação básica foi a seguinte: LVA - 40kg N/ha (nitrato de amônia), 160kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/ha (superfosfato simples), 100kg K<sub>2</sub>O/ha (cloreto de potássio); PVA - 40kg N/ha (nitrato de amônia), 80kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/ha (superfosfato simples). Ambos os solos receberam 1ml de solução de oligoelementos + Mg/kg solo(3). A quantidade de CaCO<sub>3</sub> aplicada (12 ton/ha para LVA e 1,2 ton/ha para PVA) foi calculada de acordo com a curva de saturação dos solos. No solo LVA o pH elevou-se de 3,5 para 6,6 e, no solo PVA, de 4,7 para

5,8, 30 dias após a calagem. Trinta dias após a aplicação do adubo e do calcário, foi plantado milho (cv. Piranão) que, no entanto, não se desenvolveu, satisfatoriamente, no solo LVA. Por isto, não estão aqui apresentados os dados referentes à rizosfera.

As determinações do número de actinomicetos, bactérias em geral e bactérias resistentes a 20 e 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomicina foram feitas antes e 30 dias após a calagem do solo e em três épocas (75 dias, 100 e 102 dias após o plantio), durante o crescimento do milho, quando, além do solo, ainda foram retiradas amostras do rizoplano e de raízes lavadas e maceradas.

*Experimento II - Efeito da planta (milho e trigo) na microflora da rizosfera* - O experimento foi conduzido no campo experimental da EMBRAPA, com milho (cv. Piranão) e trigo (cv. BH 1146), com duas parcelas para cada cultura, em solo de transição, entre Planossolo (série Ecologia) e Podzólico vermelho-amarelo (série Itaguaí). A adubação básica consistiu de: 20kg N/ha (sulfato de amônia), 160kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/ha (superfosfato simples), 160kg K<sub>2</sub>O/ha (cloreto de potássio) e 40 kg/ha de FTE (fórmula Br 12). O pH do solo foi 5,6 e não foi feita calagem.

As determinações do número de actinomicetos, bactérias em geral e bactérias resistentes a 10, 20 e 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomicina foram feitas em amostras do solo entre fileiras, rizoplano e de raízes lavadas e maceradas, nas seguintes épocas: a) milho - 50 dias (fase cartucho), 64 dias (inflorescência masculina), 78 dias (inflorescência feminina) e 94 dias (enchimento dos grãos); b) trigo - 42 dias (floração), 54 dias (enchimento dos grãos) e 66 dias (maturação).

*Experimento III - Efeito da calagem e da planta na microflora da rizosfera de feijão* - O experimento foi conduzido em casa de vegetação, com feijão (var. Rico 23) inoculado com *Rhizobium phaseoli* (estirpe 196) resistente a 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomicina em dois solos de cerrado: Latossol vermelho escuro (LVE) e Latossol vermelho amarelo (LVA). Foram utilizados vasos com 2,5kg de solo, com uma planta por vaso, distribuídos em blocos ao acaso, com cinco repetições para cada tipo de solo. A adubação básica consistiu na aplicação de 160kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/ha e 200kg K<sub>2</sub>O/ha. Ambos os solos receberam a aplicação de 1ml/kg solo da solução de oligoelementos + Mg(3). A quantidade de calcário (dolomítico) aplicada foi de 12 ton/ha para o solo LVE e 7 ton/ha para o solo LVA, elevando o pH de 3,7 e 3,8 para 6,5 nos dois solos, respectivamente. Foram mantidos, durante o experimento, nas mesmas condições, dois vasos sem planta, para cada tipo de solo, para serem avaliados nas mesmas épocas das coletas dos vasos com plantas.

As determinações do número de actinomicetos, bactérias em geral e bactérias resistentes a 20 e 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomicina foram realizados no solo dos vasos sem planta com 1, 26, 51, 63, 77 e 86 dias após a calagem. Nos vasos com plantas as determinações acima foram feitas no rizoplano e nas raízes lavadas e maceradas (após a retirada dos nódulos) com 21, 33, 47 e 56 dias após o plantio.

*Contagens de microrganismos* - Foram realizadas contagens de actinomicetos, bactérias em geral e bactérias resistentes a diferentes níveis de estreptomicina no solo, no rizoplano e em raízes maceradas. Considerou-se rizoplano o solo aderido às raízes e não liberado pela agitação manual das mesmas. Pesou-se 5g dessas raízes e, em seguida, foram feitas lavagens sucessivas com 100ml de água esterilizada, até completar 500ml, retirando-se todo o solo aderente. Após homogeneização foram feitas diluições até 10<sup>-7</sup>, em solução salina(2).

Após a retirada do solo do rizoplano, as raízes foram secas em papel absorvente, para a retirada do excesso de água da superfície. Uma grama das raízes foi pesada e triturada, com 100ml de água esterilizada. Utilizou-se o mesmo sistema de diluição como para o rizoplano.

Para a contagem de actinomicetos acrescentou-se 0,7% de fenol, às suspensões de solo, rizoplano e raízes maceradas, agitando-se 10 minutos. Em seguida, foram feitas as diluições. A inoculação das placas de Petri, contendo os meios específicos, foi feita com alça de Digraski, na superfície do meio (duas placas por diluição).

*Meios de cultura* - Para actinomicetos, utilizou-se o meio descrito por Roussos & col.(21), modificado pela adição de somente 30 $\mu$ g/ml de actidione (cycloheximide). Para bactérias em geral e bactérias resistentes à estreptomicina, utilizou-se o meio batata sólido (BMS) (3). As concentrações de estreptomicina foram calculadas a partir de sulfato de estreptomicina em pó (Fontoura-Wyeth). As soluções foram esterilizadas, através da filtração em "millipore" (tipo GS, 0.22 $\mu$ m) e acrescentadas aos meios de cultura, com temperatura de, aproximadamente, 45 a 47°C.

*Contagens* - As contagens foram realizadas sete dias após as diluições e plaqueamento. As colônias de actinomicetos foram reconhecidas através de sua estrutura típica. A porcentagem de bactérias resistentes aos diversos níveis de estreptomicina foi calculada pela relação entre o número de bactérias, contado nas placas com e sem estreptomicina.

## Resultados

Os dados na Tabela 1 confirmam a hipótese de que adubação e calagem causam transtorno pronunciado no equilíbrio microbiano do solo, que se manifesta aos 30 dias. Enquanto no solo PVA o número de bactérias sofreu um drástico aumento, no solo de cerrado (LVA) este efeito se manifestou com maior intensidade no número de actinomicetos, que chegaram a representar 89% da microflora total (Tabela 1), confirmando observações de Coelho & Drozdowicz(7). Cento e cinco dias após o início do experimento a microflora tendeu a voltar ao equilíbrio, embora o efeito da calagem continuasse pronunciado, principalmente quanto ao número de actinomicetos e de bactérias resistentes à estreptomicina. Nesta época, o número de bactérias resistentes a 20 $\mu$ g/ml de estreptomicina, foi semelhante ao das resistentes a 40 $\mu$ g/ml, indicando acúmulo deste antibiótico em níveis próximos de 40 $\mu$ g/ml, em alguns sítios no solo.

O efeito da calagem no equilíbrio microbiano e, com isto, na possível acumulação de estreptomicina, é melhor observado na Figura 1, onde se verificou aumento drástico da porcentagem de bactérias resistentes a 40 $\mu$ g/ml de estreptomicina, 105 dias após a calagem e a 20 $\mu$ g/ml, já aos 30 dias.

O efeito da planta (milho) no equilíbrio microbiano da rizosfera pode ser observado na Tabela 2. O efeito mais pronunciado ocorreu no solo do rizoplano, onde o número de bactérias e o de actinomicetos foi o mais elevado. Entretanto, a porcentagem de actinomicetos e, principalmente, a de bactérias resistentes à estreptomicina, foi maior em raízes maceradas. Novamente, se observou o efeito da calagem, mais pronunciado no rizoplano.

O efeito do milho e trigo, no equilíbrio microbiano, em sua rizos-

Tabela 1 - Efeito da calagem no número de actinomicetos e bactérias resistentes à estreptomicina em dois solos ácidos<sup>a</sup> (Exp. I)

Tratamentos	Nº bactérias ( $\times 10^5$ )/g solo (peso fresco)			Nº actinomicetos ( $\times 10^5$ )/g solo (peso fresco)	% actinomicetos na microflora total
	0	20 <sup>b</sup>	40 <sup>b</sup>		
<b>Inicial</b>					
LVA	6	0.11	0.10	5	43
PVA	13	0.17	0.19	16	55
<b>30 dias</b>					
LVA	34	0.40	0.10	160	82
LVA + Ca <sup>c</sup>	62	5.10	2.60	500	89
PVA	300	22.5	15.0	110	27
PVA + Ca	1550	250	80.0	130	8
<b>105 dias</b>					
LVA	46	0.95	1.3	0.5	1
LVA + Ca	81	34.0	41.0	10	11
PVA	45	2.7	0.28	6.5	12
PVA + Ca	92	17.0	20.5	15	14

<sup>a</sup>. Dados médios de 4 amostras (2 amostras/vaso)

<sup>b</sup>. Concentração de sulfato de estreptomicina no meio ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

<sup>c</sup>. A calagem elevou o pH de 3.5 a 6.6 no solo LVA e de 4.7 a 5.8 no solo PVA.

fera, foi estudado, mais detalhadamente, sob condições de campo. Os dados da Tabela 3 mostram, novamente, maior número de bactérias resistentes à estreptomicina no solo do rizoplano e raízes maceradas, em ambas as culturas. Contudo, o número de microrganismos, em raízes maceradas, foi maior que no solo. A porcentagem de bactérias resistentes à estreptomicina foi mais elevada nas raízes maceradas, como no experimento anterior. No trigo, verificamos maior número de bactérias resistentes à estreptomicina no solo do rizoplano, porém o número de bactérias em geral foi o dobro, nas raízes maceradas (Tabela 3). Assim, ao contrário do milho, a porcentagem de bactérias resistentes à estreptomicina foi maior no solo do rizoplano que em raízes maceradas. No solo, entre fileiras, cultivado com milho, houve maior porcentagem de bactérias resistentes à estreptomicina, na concentração mais baixa ( $10\mu\text{g}/\text{mL}$ ), enquanto que, no cultivado com trigo, proporções altas (33%) de bactérias foram resistentes a  $20\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Comparando-se o número de actinomicetos e a porcentagem de bactérias resistentes a  $20\mu\text{g}/\text{mL}$  de estreptomicina, durante todo o ciclo do milho (Figura 2), observamos que a ocorrência do maior número de actinomicetos, no solo do rizoplano, parece proporcionar maior porcentagem de bactérias resistentes a  $20\mu\text{g}/\text{mL}$  de estreptomicina, nas raízes maceradas, indicando o possível acúmulo deste antibiótico. No

Figura 1 - Efeito da calagem na porcentagem de bactérias resistentes a 20 e 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomicina em dois solos (PVA e LVA). Os dados são médias de 4 amostras (2 amostras/vaso) (Exp. I)

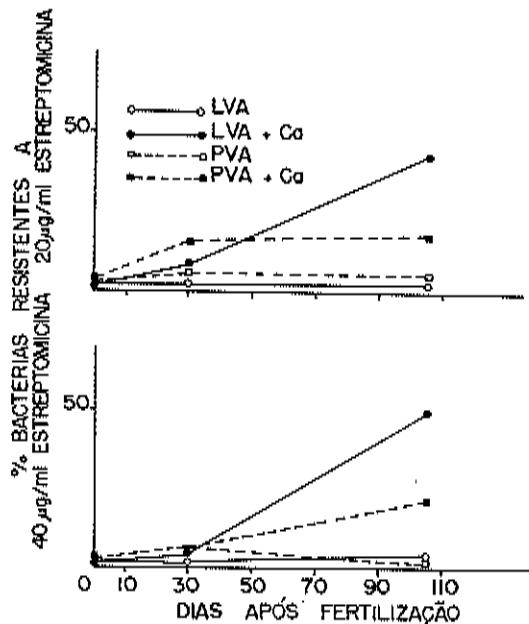


Tabela 2 - Efeito da calagem na microflora da rizosfera do milho<sup>a</sup> (Exp. I)

Tratamentos	Nº bactérias ( $\times 10^5$ )/g solo ou raiz (peso fresco)				nº actinomicetos ( $\times 10^5$ )/g solo ou na microflora raiz(peso fresco)	% actinomicetos total
	Testemunha	20 <sup>b</sup>	% <sup>c</sup>	40 <sup>b</sup>		
Solo da rizosfera <sup>d</sup> - Ca	31,3	3,3	10,5	2,43	7,7	8,9
+ Ca <sup>f</sup>	58,8	9,60	16,5	9,60	16,3	16,0
Solo do rizoplano <sup>e</sup> - Ca	1704	55,5	3,2	48,3	2,8	31,7
+ Ca	2675	483,7	18,1	324,0	12,1	553,8
Raízes maceradas <sup>e</sup> - Ca	70,4	18,5	26,3	18,7	26,5	41,9
+ Ca	47,7	18,0	37,7	15,3	32,0	50,0

<sup>a</sup>Dados médios de três coletas durante o ciclo da cultura, quatro amostras (2 amostras/vaso)

<sup>b</sup>Concentração de sulfato de estreptomicina no meio ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

<sup>c</sup>Porcentagem de bactérias resistentes à estreptomicina calculadas em relação à testemunha

<sup>d</sup>Bactérias ( $\times 10^5$ )/g solo (peso fresco)

<sup>e</sup>Bactérias ( $\times 10^5$ )/g raiz (peso fresco)

<sup>f</sup>A calagem elevou o pH do solo de 4,7 para 5,8.

trigo (Figura 3), ao contrário do milho, a maior ocorrência de actinomicetos, no solo do rizoplano, foi acompanhada de maior porcentagem

Tabela 3 - Efeito da planta no número de bactérias e na porcentagem de formas resistentes à estreptomicina na rizosfera do milho e trigo cultivados sob condições de campo<sup>a</sup> (Exp. II)

Tratamentos	Níveis de estreptomicina µg/ml	nº bactérias x 10 <sup>5</sup> /g solo ou raiz (peso fresco)			
		Milho		Trigo	
		nº	% <sup>b</sup>	nº	% <sup>b</sup>
Solo	Testemunha	65,0	-	28,7	-
entre fileiras <sup>c</sup>	10	20,5	31,5	12,9	44,9
	20	11,4	17,5	9,4	32,8
	40	8,0	12,3	2,1	7,3
Solo do rizoplanod	Testemunha	1656,9	-	2275,8	-
	10	395,6	23,9	1009,0	44,3
	20	243,1	14,7	880,3	38,7
	40	202,6	12,2	749,2	32,9
Raízes maceradas <sup>d</sup>	Testemunha	235,0	-	4662,0	-
	10	116,9	49,7	845,0	18,1
	20	102,5	43,6	561,5	12,6
	40	65,0	27,6	410,7	9,2

<sup>a</sup> Dados médios de 4 coletas e 4 amostras (2 amostras/parcela) para milho; e 3 coletas e 4 amostras (2 amostras/parcela) para trigo. O pH do solo foi 5,6 e não foi feita calagem.

<sup>b</sup> Porcentagem de bactérias resistentes à estreptomicina calculadas em relação à testemunha.

<sup>c</sup> Bactérias (x 10<sup>5</sup>)/g solo (peso fresco)

<sup>d</sup> Bactérias (x 10<sup>5</sup>)/g raízes (peso fresco).

de bactérias resistentes à estreptomicina, também no solo do rizopano, indicando mecanismo diferente, nas duas plantas.

No terceiro experimento foram estudados os efeitos da calagem e da planta no feijão. Novamente, verificamos, no tratamento sem planta (Figura 4), o aumento que ocorreu no número de actinomicetos, principalmente no solo LVE, 25 dias após a adição do calcário e adubação do solo, quando o pH elevou-se para a faixa de 6,5. Em paralelo observou-se um aumento na porcentagem das bactérias resistentes a 20µg/ml de estreptomicina no solo LVE. A porcentagem de bactérias resistentes a 100µg/ml de estreptomicina, determinada 50 dias após adição do calcário, foi bem mais baixa que a porcentagem de bactérias resistentes a 20µg/ml, nos dois solos. A porcentagem de bactérias resistentes a 20µg/ml de estreptomicina acompanhou a curva de actinomicetos, atingindo mais que 90% de bactérias resistentes, com 14 x 10<sup>6</sup> actinomicetos.

Figura 2 - Efeito do milho no número de actinomicetos e na porcentagem de bactérias resistentes a 20 $\mu\text{g/ml}$  de estreptomicina na rizosfera. Os dados são médias de 4 amostras (2 amostras por parcela) (Exp. II)

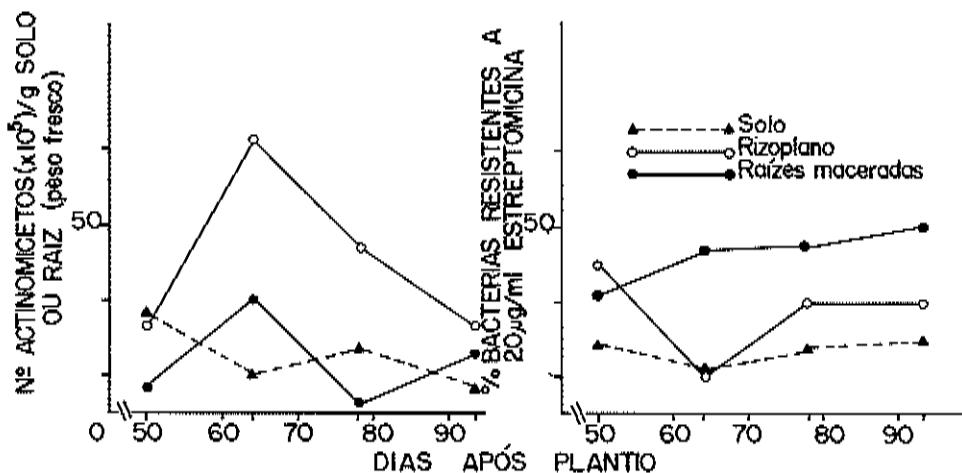
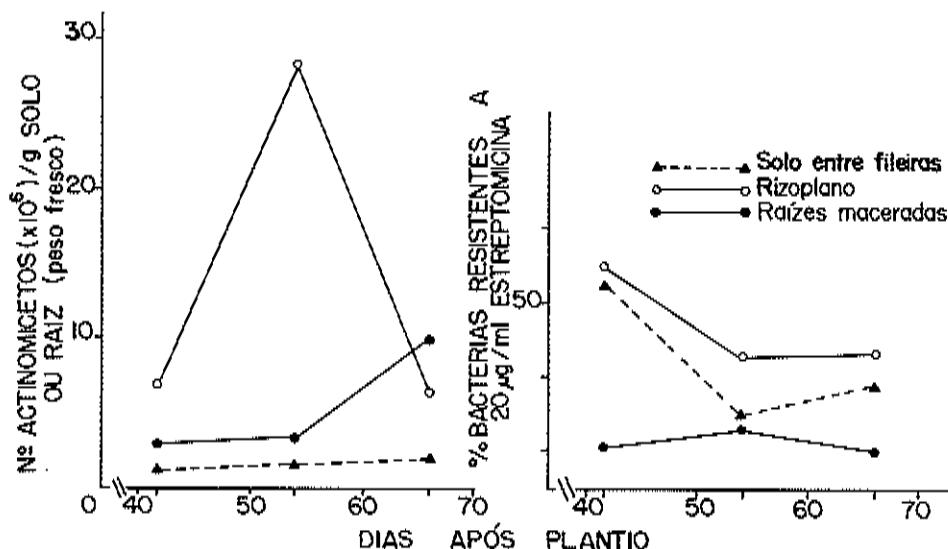
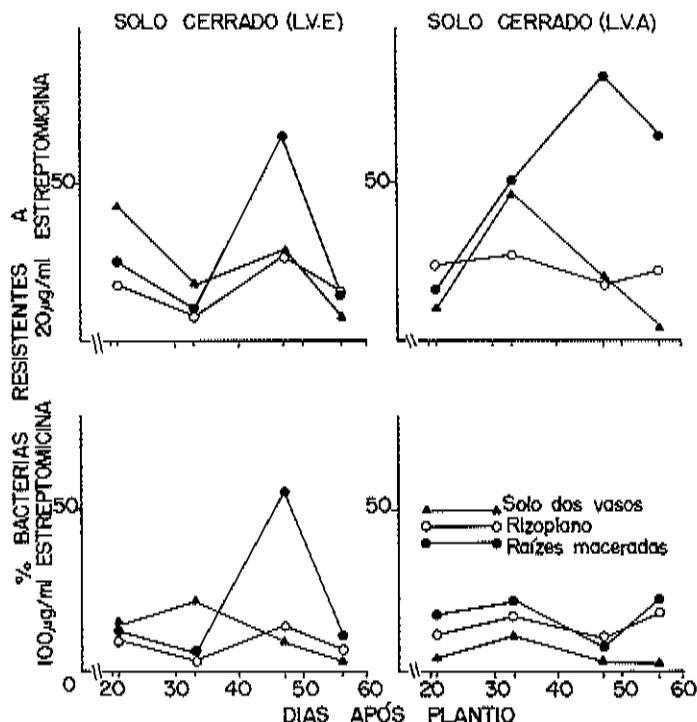


Figura 3 - Efeito do trigo no numero de actinomicetos e na porcentagem de bactérias resistentes a 20 $\mu\text{g/ml}$  de estreptomicina na rizosfera. Os dados são médias de 4 amostras (2 amostras/parcela) (Exp. II)



Nos vasos com planta, houve aumento de bactérias resistentes a 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomicina, no início da fase reprodutiva do feijão, em raízes maceradas (Figura 5), sendo que o solo LVA apresentou maior

Figura 4 - Efeito da fertilização e da calagem no número de actinomicetos e na porcentagem de bactérias resistentes a 20 e 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomicina em dois solos de cerrado. Os dados são médias de 3 amostras (Exp. III)



porcentagem dessas bactérias que o LVE. Contudo, quando observamos a porcentagem de bactérias resistentes a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomicina, verificamos que o solo LVE apresentou porcentagem de bactérias resistentes equivalente à das resistentes a 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , nas raízes maceradas, enquanto que no solo LVA a porcentagem de bactérias resistentes a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomicina foi bem menor, não se diferenciando da do solo do rizoplano e do solo sem planta.

Observamos que, no feijão, como no milho, houve estreita relação entre o número de actinomicetos no solo do rizoplano e a porcentagem de bactérias resistentes a 20 e 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomicina, nas raízes maceradas (Figura 6). Verificamos que o número de actinomicetos foi mais expressivo, no solo do rizoplano das plantas cultivadas no solo LVE, que o do LVA, confirmando assim os dados obtidos com vasos sem plantas. A maior porcentagem de bactérias resistentes a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomicina, observada nas raízes maceradas de feijão, cultivado no solo LVE (Figura 5), provavelmente está relacionada à população de actinomicetos no rizoplano nesse solo. Isto pode ser melhor observado no solo LVA (Figura 6), onde a população, relativamente pequena de actinomicetos no rizoplano, conferiu resistência somente a 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomicina, às bactérias nas raízes maceradas.

Figura 5 - Efeito do feijão na porcentagem de bactérias resistentes a 20 e 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomicina na rizosfera durante o ciclo da cultura. Os dados são médias de 3 amostras (Exp. III)

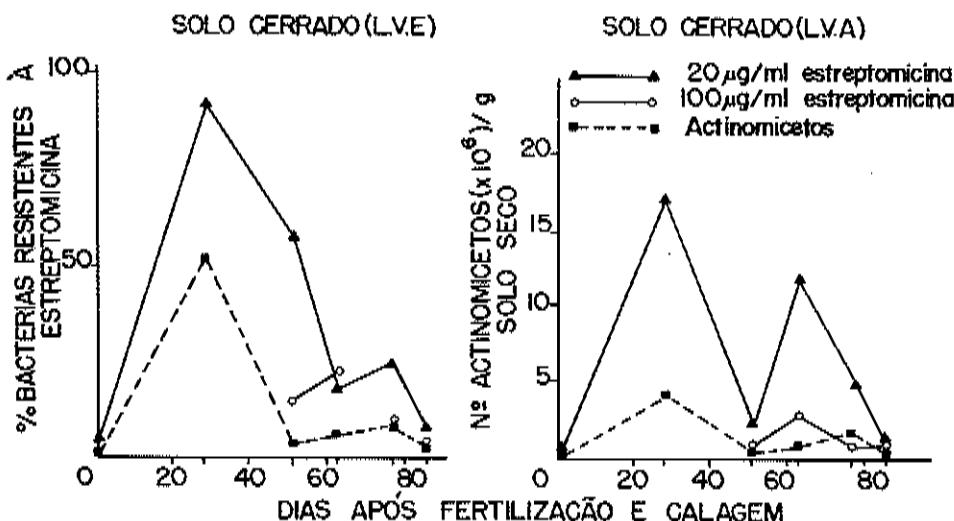
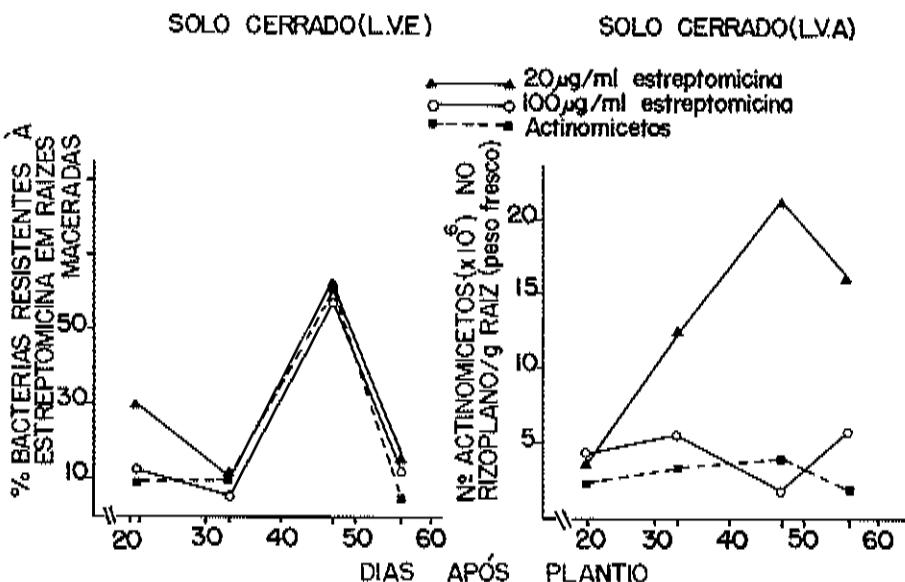


Figura 6 - Comparação do número de actinomicetos com a porcentagem de bactérias resistentes a 20 e 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomicina no rizoplano. Os dados são médias de 3 amostras (Exp. III)



## Discussão

Os resultados apresentados ampliam os dados anteriores(10), em relação à infecção de raízes de plantas, por bactérias resistentes à estreptomicina. A alta porcentagem de bactérias resistentes a 20 $\mu$ g/ml de estreptomicina, observada em raízes de milho(10), foi confirmada neste trabalho e estendeu-se também para o feijão. A única exceção observada foi o trigo, onde o maior enriquecimento de bactérias resistentes à estreptomicina localizou-se no rizopano. Crowd & Pramer (8) demonstraram o acúmulo de estreptomicina nas raízes, caules e folhas de trigo, mas diferenças entre espécies deveriam ser esperadas. Apesar da grande importância dada aos actinomicetos, por serem considerados um dos fatores que regulam a microflora do solo(29), pela capacidade de produzir antibióticos e da possibilidade de que esses antibióticos sejam absorvidos pelas raízes(8), poucos trabalhos têm procurado estudar a relação entre a flora de actinomicetos e a população de bactérias resistentes aos antibióticos por eles produzidos. O elevado número de actinomicetos, observado na região do rizopano de raízes de milho, trigo e feijão, indica a possibilidade da produção desses antibióticos. Rangaswami & Vidyasekaran(20) evidenciaram a produção de antibióticos no rizosfera de milho, quando fizeram a inoculação com actinomicetos do gênero *Streptomyces*. Venkatesan & Rangaswami(25) também encontraram maior número de actinomicetos na rizosfera de raízes de arroz, que no solo e que foram mais antagonistas às bactérias que aos fungos. A maior disponibilidade de nutrientes que estimulam a população de organismos antagonicos na rizosfera (25), explicaria o maior ou menor número de actinomicetos encontrados no rizopano de milho, trigo e feijão uma vez que a disponibilidade de nutrientes é dependente de cada tipo de planta. O maior ou menor aumento de número de actinomicetos no rizopano, parece influenciar o nível de resistência à estreptomicina das bactérias que ocorrem nas raízes.

A rizosfera é considerada particularmente importante, no controle biológico de agentes patógenos de raízes(14). Vários estudos têm sido feitos a fim de tornar esse antagonismo microbiano mais eficiente. Um dos sistemas utilizados é a alteração da microflora da rizosfera, principalmente de actinomicetos, através da adição de elementos minerais, como demonstrado em milho(14), ervilha(15) e trigo(27,28). Esse efeito benéfico, demonstrado pela modificação da flora de actinomicetos, em relação ao controle de doenças, pode apresentar, por outro lado, um efeito prejudicial, nas bactérias não patogênicas, principalmente às fixadoras de nitrogênio atmosférico. Isso parece ocorrer em solos de cerrado, no primeiro ano de cultivo, pela dificuldade encontrada em se estabelecer o *Rhizobium* nas culturas. Scotti & col. (22) sugeriram que o problema encontrado, em relação ao estabelecimento da bactéria, estava ligado ao desequilíbrio biológico, provocado pela elevação do pH do solo e ao tratamento a que estes solos são submetidos, no primeiro cultivo. Resultados evidenciando isto foram agora obtidos, quando solos de cerrados foram submetidos à calagem. O desequilíbrio, verificado pelo aumento brusco no número de actinomicetos e na porcentagem de bactérias resistentes à estreptomicina, após a calagem, dá uma indicação do que pode ocorrer em condições de campo. Resultados semelhantes foram observados(16) após o ajustamento do pH do solo de 3,8 para 7,6 pela calagem, assim como incremento no número de actinomicetos pela adição de carbonato de cálcio(11,23).

Como mais de 60% dos antibióticos conhecidos são produzidos por actinomicetos do gênero *Streptomyces*(4) e, com a possível predominância

cia dos actinomicetos do gênero *Streptomyces* na rizosfera após a clagem, há a possibilidade de que os actinomicetos criem um elevado antagonismo a diversas bactérias pela liberação de antibióticos. Esse antagonismo limitaria a colonização da rizosfera e do rizopano por bactérias, influenciando a infecção de raízes, principalmente no estágio inicial de desenvolvimento da planta, visto que os actinomicetos apresentam maior antagonismo na rizosfera, nas primeiras fases de crescimento(25). Assim, a introdução de microrganismos de interesse agronômico, como as bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico, em diversas culturas, ficaria restrita somente às bactérias que adquiriram, naturalmente, certo nível de resistência a antibióticos ou às bactérias manipuladas geneticamente.

#### Agradecimento

Os autores gostariam de agradecer a valiosa assistência técnica de José Antonio Ramos Pereira.

#### Referências Bibliográficas

1. Alexander, A. - *Introduction to soil microbiology*. New York, John Wiley & Sons, 1961.
2. Baldani, V.L.D. - Especificidade na infecção de raízes de milho, trigo e arroz por *Azospirillum* spp. Rio de Janeiro, UFRRJ, 1980. (Tese MSc).
3. Baldani, V.L.D. & Döbereiner, J. - Host plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. *Soil Biol. Biochem.*, 12:433-439, 1980.
4. Bibb, M.J.; Ward, J.M. & Hopwood, D.A. - Transformation of plasmid DNA into *Streptomyces* at high frequency. *Nature*, 274:398-400, 1978.
5. Brown, M.E. - Stimulation of streptomycin-resistant bacteria in the rhizosphere of leguminous plant. *J. Gen. Microbiol.*, 24:369-377, 1961.
6. Clark, F.E. - Actinomycetes. In: - Black, C.A., ed. - *Methods of soil analyses*, monograph nº 9. Wisconsin, USA, Amer. Soc. Agron., 1965.
7. Coelho, R.R.R. & Drozdowicz, A. - The occurrence of actinomycetes in a cerrado soil in Brasil. *Rev. Ecol. Biol. Sol.*, 15:459-473, 1978.
8. Crowd, S.H. & Pramer, D. - Movement of antibiotics in higher plants. *Chem. and Industry*, p. 160-162, 1955.
9. Damirgi, S.H. & Johnson, H.W. - Effect of soil actinomycetes on strains of *Rhizobium japonicum*. *Agron. J.*, 58:223-224, 1966.
10. Döbereiner, J. & Baldani, V.L.D. - Selective infection of maize roots by streptomycin-resistant *Azospirillum lipoferum* and other bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 25:1264-1269, 1979.
11. El-Nakeeb, M.A. & Lechevalier, H.A. - Selective isolation of aerobic actinomycetes. *Appl. Microbiol.*, 11:75, 1963.
12. Foo, E.L. & Varma, A.K. - Inhibitory effect of *Streptomyces antibioticus* and other microorganisms on *Rhizobium*. *Folia Microbiol.*,

21:315-319, 1976.

13. Hattingh, M.J. & Louw, H.A. - The antagonistic effects of soil microorganisms isolated from the root region of clovers on *Rhizobium trifolii*. S. Afr. J. Agric. Sci., 9:239-252, 1966.
14. Horst, R.K. & Herr, L.J. - Effects of foliar urea treatment on numbers of actinomycetes antagonistic to *Fusarium roseum* F. cerealis in the rhizosphere of corn seedlings. Phytopathology, 52:423-427, 1962.
15. Khalifa, O. - Effect of urea on pea with. Rothamsted Exp. Stn. Rep., p. 116-117, 1964.
16. MacDonald, R.M. - Liming and the growth of mixed population of soil bacteria. Soil Biol. Biochem., 11:633-636, 1979.
17. Panthier, J.J.; Diem, H.G. & Dommergues, Y. - Rapid method to enumerate and isolate soil actinomycetes antagonistic towards rhizobia. Soil Biol. Biochem., 11:443-445, 1979.
18. Patel, J.J. - Antagonism of actinomycetes against rhizobia. Plant Soil, 41:395-402, 1974.
19. Pramer, D. - Observations on the uptake and translocation of five actinomycetes antibiotics by Cucumber seedlings. Am. Appl. Biol., 40:617-622, 1953.
20. Rangaswami, G. & Vidyasekaran, P. - Antibiotic production by *Streptomyces* sp. in corn rhizosphere. Phytopathology, 53:995-997, 1963.
21. Roussos, S.; Garcia, J.L.; Rinaudo, G. & Gauthier, D. - Distribution de la microflore hétérotrophe aérobie et en particulier des bactéries dénitritifiantes et fixatrices d'azote libres dans la rhizosphère du riz. Annales de Microbiologie (Inst. Pasteur), 131A:197-207, 1980.
22. Scotti, M.R.M.M.L.; Sá, N.M.H.; Vargas, M.A.T. & Döbereiner, J. - Spontaneous streptomycin resistance of *Rhizobium* strains isolated from Brazilian cerrados and its possible role in legume nodulation. Intern. Workshop on Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture, Cali, Colombia, 1981.
23. Tsao, P.H.; Leben, C. & Keitt, G.W. - An enrichment method for isolating actinomycetes that produce diffusible antifungal antibiotics. Phytopatology, 50:88, 1960.
24. Van Schreven, D.A. - The effect of some actinomycetes on rhizobia and *Agrobacterium radiobacter*. Plant Soil, 21:283-302.
25. Venkatesan, R. & Rangaswami, G. - Quantitative and quality studies of actinomycetes population from non-rhizosphere soil, rhizosphere of rice and stubble root surface. Ind. J. Microbiol., 4:110-120, 1964.
26. Visona, L. & Tardieu, P. - Antagonistics des *Rhizobium* dans la rhizosphère du trèfle et de la Luzerne. Ann. Inst. Pasteur, 107:297-302, 1964.
27. Vrany, J. - The effect of foliar application of urea on the root fungi of wheat growing in soil artificially contaminated with *Fusarium* spp. Folia Microbiol. (Prague), 17:500-504, 1972.
28. Vuurde, J.W.L. van - The rhizosphere microflora of wheat grown under controlled conditions. I-The effect of soil fertility and

- urea leaf treatment on the rhizoplane microflora. Plant and Soil, 50:447-460, 1978.
29. Waksman, S.A. - The role of antibiotics in nature: prospectives in biology and medicine. Vol. II. USA, Univ. Chicago Press, 1961.

INFLUENCE OF CARBON SOURCE, LIGHT, WATER POTENTIAL  
AND TEMPERATURE ON GROWTH AND SPORULATION OF FUSA-  
RIUM MONILIFORME VAR. SUBGLUTINANS

Hassan A. Bolkan

José C. Dianese

Cláudio B. da Silva

& José Cristino A. de Araújo

Deptº de Biologia Vegetal, Universidade de Brasília

Campus Universitário

70910 Brasília DF, Brasil

#### **Summary**

The ability of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* isolates from pineapple, to grow and sporulate was tested on several carbon sources, different light exposures and temperatures, and on various salt concentrations. The greatest radial growth occurred on soluble starch, lactose, and maltose; least radial growth occurred on xylose. The largest number of micronidia was produced on sucrose, starch and fructose. No macroconidia developed on starch, glucose or fructose. The fungus grew well over a wide range of temperatures with an optimum for both processes at 25°C. Light was not required for growth or sporulation. Microconidia were produced most numerously at 0.1 - 0.2M KCl, but a relatively small number of macroconidia were produced at 0.1M and no macroconidia were produced at concentrations above 0.1M.

#### **Resumo**

*Influência da fonte de carbono, luz, potencial hídrico e temperatura sobre crescimento e esporulação de Fusarium moniliforme var. subglutinans*

Estudou-se o efeito de várias fontes de carbono, ausência ou presença de luz, temperatura e concentração de KCl, sobre o crescimento e esporulação de três isolados de *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. Amido, lactose e maltose provocaram o mais alto crescimento radial e o menor ocorreu quando xilose foi usada como fonte de carbono. O maior número de microconídios ocorreu em meio com sacarose, amido ou frutose. Macroconídios não foram produzidos em amido, glucose ou frutose. O fungo cresceu e esporulou em temperaturas entre 15 e 33°C, com um ótimo em 25°C, para ambos parâmetros. O fungo não requer luz para esporular. Os microconídios foram produzidos em número mais elevados em KCl 0,1 e 0,2M, porém constatou-se pequeno número de macroconídios em KCl 0,1M e ausência desses esporos em concentrações superiores a 0,1M.

#### **Introduction**

Fruit rot of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) is caused by *Fu-*

*sarium moniliforme* Shield. var. *subglutinans* Wr. & Rg. It is the most prevalent and widely distributed disease of pineapple in Brazil. Since the out-break of the disease in 1964(16) studies were made on symptomatology(19), control(1,2,4), epidemiology(5,10,11,12,13), virulence(8), and relationship between cultural characteristics and pathogenicity(7). In all these studies, however, survival, growth and reproduction requirements of the fungus have not had much attention. In a previous publication we reported on the factors which influence the survival and colonization potential of this fungus(6). The purpose of this study was to determine the influence of carbon source, light, water potential and temperature on growth and sporulation of *F. moniliforme* var. *subglutinans*.

#### Material and Methods

**Isolates** - Three pathogenic single spore isolates (UnB 302=ATCC 38067, UnB 324=ATCC 42089, UnB 325) of *F. moniliforme* var. *subglutinans*, isolated from pineapple fruits showing rot symptoms or from pineapple leaf surface(10), were used in all experiments. The isolates were maintained on potato-dextrose agar (PDA) at 10-12°C and pathogenicity was tested as described previously(7). To determine the influence of light and temperature on the growth and sporulation, petri plates containing 20ml of PDA were inoculated with 4-mm-diameter plugs (agar + mycelium) taken from the edge of 3-day-old cultures. The relative number of microconidia and macroconidia produced was determined using the method described by Misagh & col.(18) for *Alternaria alternata* (Fr.) Kiesler. All experiments were repeated twice, with four replications. A factorial analyses of variance was made to determine if there were significant differences in the growth and sporulation of the three isolates at the specific conditions studied.

**Mycelial dry weight determination** - Mycelial dry weight produced by the fungus on PDA at different temperatures, different light exposures, and various carbon sources was determined as described by Hindal & col.(14) for *Ceratocystis ulmi* (Bruis) C. Moreau.

**Effect of carbon source** - The carbon sources tested are given in Table 1. The autoclaved media (121°C for 15 minutes) were made with 2% water agar plus 2% of each carbon source to be tested; four replicate plates were used. Discs (2-mm-diameter) taken from the edge of 7-day-old cultures grown on PDA were transferred to each test plate and incubated for 7 days at 25°C, then examined as described previously for culture growth and conidia number.

**Effect of light** - Cultures grown on PDA for 48 hours were exposed to fluorescent light (920 lux) for 24, 48, 72, 144 hours. Cultures grown in continuous darkness served as control.

**Effect of Potassium-chloride** - To determine the production of macroconidia and microconidia and make linear growth measurements, KCl from 0.1-0.8M was used in 2% water agar in 0.1 increments. The plates were incubated for 7 days at 25°C before the measurements were made.

**Effect of temperature** - Cultures on PDA were incubated in laboratory incubators (Freas 815 Low Temperature, Precision Scientific Co., Chicago, IL 60647) at 10, 15, 20, 25, and 35°C in continuous darkness. Diameter growth measurements and conidia production determination were made 7 days after incubation.

## Results

No statistically significant differences were observed in the growth and sporulation of the three *F. moniliforme* var. *subglutinans* isolates under the specific conditions studied. The data, therefore, were pooled for analyses and means were grouped by Duncan's multiple range test ( $P=0.05$ ).

*Effect of carbon source* - All carbon sources tested supported growth, but best growth was obtained with maltose, lactose and soluble starch (Table 1). Sucrose supported moderate growth, whereas xylose followed by fructose and glucose produced relatively poor growth. Soluble starch, fructose, and sucrose produced a moderately large number of microconidia. The lowest number of microconidia was produced by xylo-

Table 1 - Influence of carbon source on growth and sporulation of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*

Carbon source	Colony diameter (mm)	Mycelial dry weight (mg/cm <sup>2</sup> )	Number of microconidia (per mm <sup>2</sup> )	Number of macroconidia (per mm <sup>2</sup> )
Starch	46.4 a	1.3 e	1.9x10 <sup>4</sup> ab	0.0 b
Fructose	34.8 d	2.3 b	1.8x10 <sup>4</sup> abc	0.3x10 <sup>4</sup> a
Glucose	35.4 d	2.8 a	1.4x10 <sup>4</sup> ed	0.0 b
Lactose	45.6 a	0.7 f	1.7x10 <sup>4</sup> bcd	0.0 b
Maltose	46.5 a	1.9 cd	1.3x10 <sup>4</sup> cde	0.1x10 <sup>4</sup> a
Mannose	37.1 c	2.2 b	1.5x10 <sup>4</sup> bcde	0.1x10 <sup>4</sup> a
Sucrose	38.8 b	1.8 d	2.3x10 <sup>4</sup> a	0.1x10 <sup>4</sup> a
Xylose	31.0 e	2.1 bc	1.2x10 <sup>4</sup> de	0.1x10 <sup>4</sup> a
Water agar	38.8 b	0.6 f	1.1x10 <sup>4</sup> e	0.0 b

Each value is the mean of 12 replications (three isolates with four replicates each). Mean values in each column followed by the same letter do not differ significantly ( $P=0.05$ ) from each other by Duncan's multiple range test.

se. This number, however, was not statistically different ( $P=0.05$ ) than that produced by glucose, maltose or mannose (Table 1). Macroconidia production was relatively poor on fructose, maltose, sucrose and xylose, and no macroconidia were produced with the use of soluble starch, glucose or lactose (Table 1). Glucose produced the most dense mycelium than any of the other carbon sources tested (Table 1).

*Effect of light* - Light was not required for growth or sporulation nor was the number of conidia formed by any isolate altered significantly ( $P=0.05$ ) by the various light regimes that were tested (Table 2). The mycelial dry weight production at different light regimes was not statistically different (Table 2).

Table 2 - Effect of light on growth and sporulation of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*

Light exposure (hr)	Colony diameter (mm)	Mycelial dry weight (mg/cm <sup>2</sup> )	Number of microconidia (per mm <sup>2</sup> )	Number of macroconidia (per mm <sup>2</sup> )
0	69.2 a	6.6 a	12.1x10 <sup>4</sup> a	0.6x10 <sup>4</sup> a
12	69.3 a	7.2 a	10.6x10 <sup>4</sup> a	0.2x10 <sup>4</sup> a
24	70.3 a	7.0 a	10.8x10 <sup>4</sup> a	0.3x10 <sup>4</sup> a
48	73.1 a	7.0 a	11.0x10 <sup>4</sup> a	0.4x10 <sup>4</sup> a
72	73.0 a	7.2 a	11.0x10 <sup>4</sup> a	0.3x10 <sup>4</sup> a
144	70.6 a	6.5 a	12.1x10 <sup>4</sup> a	0.3x10 <sup>4</sup> a

Each value is the mean of 12 replications (three isolates with four replicates each). Mean values in each column followed by the same letter do not differ significantly ( $P=0.05$ ) from each other by Duncan's multiple range test.

**Effect of potassium-chloride** - All concentrations tested produced relatively good growth (Table 3). However, the concentration which produced the best growth was 0.2M. Microconidia production was best at 0.1 and 0.2M, and the poorest at 0.8M. The number of microconidia produced at 0.8M, however, was not significantly different ( $P=0.05$ ) than that produced at 0.6M or 0.7M. Macroconidia were produced at 0.1M, but not at the rest of the concentrations tested.

**Effect of temperatures** - All isolates tested grew and sporulated on PDA at temperatures in 15 - 33°C range, but none grew at that medium at 10 or 35°C (Fig. 1). Good growth and sporulation occurred between 20 and 30°C. The optimum temperature for growth and sporulation of *F. moniliforme* var. *subglutinans*, however, was 25°C (Fig. 1).

#### Discussion

These studies demonstrated that growth and sporulations of *F. moniliforme* var. *subglutinans* is influence by carbon source, temperature and water potential, but not by light. Furthermore, the results indicate that different carbon sources and water potentials favor different phases of the fungus. Comparable results were recently reported by Chattopadhyay & Nandi(9) who studied the nutrition of *F. moniliforme* var. *subglutinans* causing mango malformation in India. The minor differences could be attributed to the different basal media used and/or to different isolates of *F. moniliforme* var. *subglutinans* employed for the study.

Continuous illumination with visible light is inhibitory to spore formation of many fungi(21,22). In our study, the number of conidia formed by *F. moniliforme* var. *subglutinans* was not altered significantly by various light regimes that were tested. One should, however, bear in mind the effect of temperature interaction with that of light which may result in the production of different numbers of conidia(20). In the present study, the interaction between temperature

Table 3 - Effect of different KCl concentrations on growth and sporulation of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*

Treatment	Colony diameter (mm)	Mycelial dry weight (mg/cm <sup>2</sup> )	Number of microconidia (per mm <sup>2</sup> )	Number of macroconidia (per mm <sup>2</sup> )
0.1 M	57.8 b	0.31 ab	$1.3 \times 10^4$ ab	$0.6 \times 10^4$ a
0.2 M	66.3 a	0.22 c	$1.1 \times 10^4$ bc	0.0 b
0.3 M	57.5 b	0.23 c	$0.0 \times 10^4$ cd	0.0 b
0.4	50.5 c	0.30 b	$0.9 \times 10^4$ cd	0.0 b
0.5 M	45.0 d	0.33 ab	$0.7 \times 10^4$ d	0.0 b
0.6 M	42.8 e	0.33 ab	$0.6 \times 10^4$ de	0.0 b
0.7 M	41.8 f	0.36 b	$0.6 \times 10^4$ de	0.0 b
0.8 M	39.7 g	0.33 bc	$0.3 \times 10^4$ e	0.0 b

Each value is the average of 12 replications (three isolates with four replicates each). Mean values in each column followed by the same letter do not differ statistically ( $P=0.05$ ) from each other by Duncan's multiple range test.

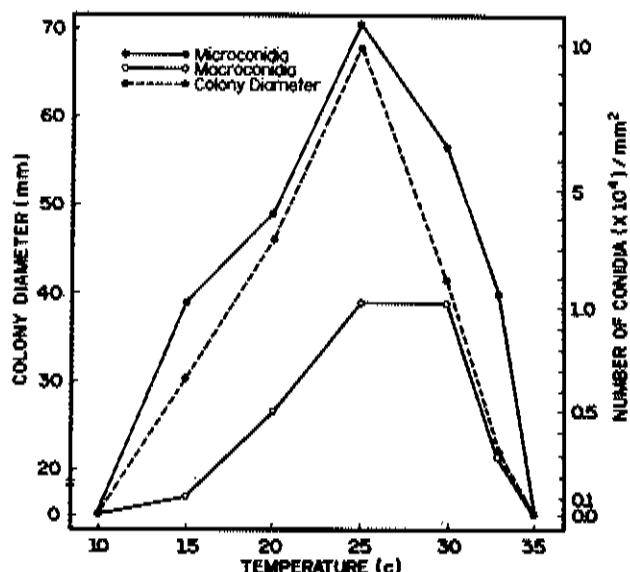
and light was not investigated.

The optimum temperature for radial growth and sporulation of *F. moniliforme* var. *subglutinans* on PDA appears to be near 25°C. These results are in agreement with those of Niremberg (cited by Kuhlman & col. (17) who reported 25°C as the optimum temperature for *F. moniliforme* var. *subglutinans* (as *F. sacchari* (Butl.) Gams var. *subglutinans*). Kuhlman & col. (17), however, employing isolates from several pine species (*Pinus spp.*) reported a lower temperature for the optimal radial growth of *F. moniliforme* var. *subglutinans*.

Like *F. moniliforme* (15), *F. moniliforme* var. *subglutinans* utilized lactose, maltose and soluble starch well for mycelial growth, but unlike *F. moniliforme* several carbohydrates including starch, did not support macroconidia production. The best carbon source for total growth, when measured by mycelial dry weight, was not necessarily the best for radial growth. For example, glucose promoted the best growth of all the carbon sources tested, but was one of the poorest for radial growth.

In agar plates that contained various concentrations of KCl, microconidia and colony diameter of *F. moniliforme* var. *subglutinans* were largest at the lower concentrations, decreasing at 0.4M and higher concentrations. Macroconidia production was totally suppressed at concentrations above 0.1M, suggesting that macroconidia production of *F. moniliforme* var. *subglutinans* is greatly influenced by water potential. These findings would be of interest to researchers studying the epidemiology of *F. moniliforme* var. *subglutinans*.

Figure 1 - Effect of incubation temperature on growth and sporulation of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* grown on potato-dextrose agar in the dark



Each point represents the mean of 12 replications (three isolates with four replicates each).

#### Acknowledgment

This research was supported by a grant from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We thank Dr. Linda Caldas for reviewing the manuscript before submission and Dr. L.H.R. Castro of CPAC/EMBRAPA, for the statistical analyses.

#### References

1. Aguilar, J.A.E.; Bezerra, J.E.F. & Coelho, R.S.B. - Efeito de fungicidas sistêmico no controle da fusariose (*Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*) em mudas de abacaxizeiro após plantio. *Fitopatologia Brasileira*, 3:71(Abstr.), 1978.
2. Aguilar, J.A.E.; Bezerra, J.E.F. & Lederman, I.E. - Controle da fusariose em mudas de abacaxi através do tratamento térmico. *Fitopatologia Brasileira*, 3:71(Abstr.), 1978.
3. Bolkan, H.A.; Dianese, J.C.; Cupertino, F.P. & Vargas, V.H. - Sensibilidade "in vitro" do micélio de *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* a nove fungicidas e absorção de três deles por mudas de abacaxi. *Fitopatologia Brasileira*, 2:159-166, 1977.
4. Bolkan, H.A.; Dianese, J.C. & Cupertino, F.P. - Chemical control of pineapple fruit rot caused by *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. *Plant Dis. Repr.*, 62:822-824, 1978.
5. Bolkan, H.A.; Dianese, J.C. & Cupertino, F.P. - Pineapple flowers

- as principal infection sites for *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. Plant Dis. Repr., 63:655-657, 1979.
6. Bolkan, H.A.; Dianese, J.C. & Cupertino, F.P. - Survival and colonizations potential of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. Phytopathology, 69:1298-1301, 1979.
  7. Bolkan, H.A.; Dianese, J.C.; Ribeiro, W.R.C. & Silva, C.B. - Relationship between cultural characteristics and pathogenicity of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. Fitopatologia Brasileira, 5:265-271, 1980.
  8. Camargo, L.M.C.A. & Baracho, I.R. - Virulência de linhagens de *F. moniliforme* Shield. var. *subglutinans* Wr. & Rg. Suma Phytopatol., 3:215-220, 1977.
  9. Chattopadhyay, N.C. & Nandi, B. - Nutrition in *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* causing mango malformation. Mycologia, 73:407-414, 1981.
  10. Dianese, J.C.; Bolkan, H.A. & Couto, F.A.A. - Epiphytic population of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* pathogenic on pineapple in Brazil. Phytopathology, 71:214 (Abstr.), 1981.
  11. Dianese, J.C.; Bolkan, H.A.; Silva, C.B. & Couto, F.A.A. - Pathogenicity of epiphytic *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* to pineapple. Phytopathology, 71, 1981.
  12. Dianese, J.C.; Ribeiro, W.R.C.; Bolkan, H.A. & Couto, F.A.A. - Espécies de fungos do gênero *Fusarium* associadas com a rizosfera do abacaxizeiro em Monte Alegre, Minas Gerais. Fitopat. Bras., 6: 217-221, 1981.
  13. Giacomelli, E.J.; Pinto, H.S. & Roessing, C. - Correlação entre a incidência da gomose do abacaxi e precipitação pluvial, temperatura e umidade relativa na região de Limeira, SP. Bragantia, 28: 13-17, 1969.
  14. Hindal, D.F.; Harner, E.J. & MacDonald, W.L. - Further studies on the relationship between cultural characteristics and pathogenicity in *Ceratocystis ulmi*. Phytopathology, 69:108-111, 1979.
  15. Hsieh, W.H.; Snyder, W.S. & Smith, S.N. - Influence of carbon source, amino acids, and water potential on growth and sporulation of *Fusarium moniliforme*. Phytopathology, 69:602-604, 1979.
  16. Kimati, H. & Tokeshi, H. - Nota sobre a ocorrência de *Fusarium* sp. causa da resinose em abacaxi. Rev. Agric. (Piracicaba): 121-139, 1964.
  17. Kuhlman, E.G.; Dwinell, C.D.; Nelson, P.E. & Booth, C. - Characterization of the *Fusarium* causing pitch canker of southern pines. Mycologia, 70:1131-1143, 1978.
  18. Misaghi, I.J.; Grogan, R.C.; Duniway, J.M. & Kimble, K.A. - Influence of environment and culture media on spore morphology of *Alternaria alternata*. Phytopathology, 68:29-34, 1978.
  19. Pissarra, T.B.; Chaves, G.M. & Ventura, J.A. - Sintomatologia de fusariose (*Fusarium moniliforme* Shield. var. *subglutinans* Wr. & Rg.) do abacaxizeiro. Fitopatol. Bras. 4:255-263, 1979.
  20. Rotem, J. - Host and environmental influences on sporulation *in vivo*. Ann. Rev. Phytopathol., 16:83-101, 1978.
  21. Suzuki, Y.; Kumagai, T. & Oda, Y. - Locus of blue and near ultra-

- violet reversible photoreaction in the stages of conidial development in *Botrytis cinerea*. J. Gen. Microbiol., 98:199-204, 1977.
22. Turian, G. - Sporogenesis in fungi. Ann. Rev. Phytopathol., 12: 129-137, 1974.

## RESISTÊNCIA DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *METHARIZIUM ANISOPLIAE* EM RELAÇÃO A TRÊS FUNGICIDAS

Alda Luiza Loureiro dos Santos  
 Instituto de Tecnologia de Alimentos, ITAL  
 Caixa Postal 139  
 13100 Campinas SP, Brasil

& João Lúcio de Azevedo  
 Laboratório de Genética  
 Deptº de Biologia Animal, Instituto de Ciências  
 Biológicas, Universidade de Brasília  
 70910 Brasília DF, Brasil

### Resumo

Foi estudada a resistência natural de quatro linhagens de *Metharizium anisopliae* a três fungicidas. Benlate foi o fungicida mais eficaz, causando inibição do crescimento do fungo na concentração de 4 $\mu$ g/ml, enquanto que Vitavax apresentou efeito fungistático e Cloroneb não teve efeito inibitório. A frequência de mutação espontânea de *M. anisopliae* ao Benlate foi de 2,35 mutantes/10<sup>6</sup> conídios. Dois tipos de mutantes puderam ser distinguidos, o primeiro conferindo altos níveis de resistência (1024 $\mu$ g/ml) e o segundo, níveis menos elevados (128 $\mu$ g/ml).

### Summary

*Resistance of the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae to three fungicides*

Four strains of *M. anisopliae* were studied in relation to their resistance to three fungicides. Benlate was the most effective fungicide used, inhibiting the fungus growth at the concentration of 4 $\mu$ g/ml whereas Vitavax had a fungistatic effect and Chloroneb had no inhibitory effect. Spontaneous mutation frequency of *M. anisopliae* to Benlate was 2.35 mutants/10<sup>6</sup> conidia. Two types of mutants could be distinguished: the first one showed resistance to high levels (1024 $\mu$ g/ml), and the second type to low levels of Benlate (128 $\mu$ g/ml).

### Introdução

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* é eficaz no controle das cigarrinhas das pastagens e da cana-de-açúcar(2,3,4,8,10,13), sendo este um método de controle importante, por não deixar resíduos, ser mais específico, mais permanente e não provocar desequilíbrios no ecossistema(6,7).

Alguns pesquisadores(1,9) observaram que os fungicidas têm efeitos diversos sobre este fungo, podendo tanto inibir como estimular o seu crescimento. Estudos semelhantes foram feitos com inseticidas(1,11), onde ficou evidenciado que alguns deles podem ser usados em controle

integrado com *M. anisopliae*, pois não há perda de viabilidade ou patogenicidade do fungo.

O estudo da resistência de *M. anisopliae* a fungicidas é importante quando, em experimentos de campo, visa-se o isolamento de lotes adjacentes, assim como a obtenção de marcas genéticas, para estudos de disseminação do fungo no campo. Além disso, um fungo entomopatogênico deve ser resistente a fungicidas que serão usados, juntamente com ele, para a proteção da cultura contra doenças.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de estudar o efeito de três fungicidas sobre *M. anisopliae*; também foram obtidos e estudados mutantes resistentes desse fungo a um dos fungicidas empregados.

#### Material e Métodos

*Determinação dos níveis de resistência* - Foram usados os fungicidas Cloroneb (Demosan 65W: 1-4-dicloro-2,5-dimetoxibenzeno), Carboxin (Vitavax 75PM: 5,6-dihidro-2-metil-1,4-oxatiin-3-carboxanilido) e Benomyl (Benlate: metil-1-(butilcarbamoil)-2-benzimidazol carbamato), para verificar seus efeitos na sobrevivência das linhagens A, C, K e E<sub>6</sub> de *M. anisopliae* cedidas, respectivamente, pelo Instituto Biológico da Bahia, Dr. Cláudio Luiz Messias (UNICAMP), Dr. Kamal Elkadi (CEPLAC) e Dr. José Ayres Ventura (EMCAPA, E.S.).

Os fungicidas Vitavax (Uniroyal do Brasil S/A), Cloroneb (75% P.A.) e Benlate (50% P.A.), ambos da Dupont do Brasil S/A, foram diluídos em metanol e o volume completado com água destilada esterilizada, de tal modo que a concentração de metanol não excedesse a 2% do total que, como demonstrado(5), não inibe o desenvolvimento de fungos.

Foram feitas diluições apropriadas dos fungicidas Cloroneb e Vitavax obtendo-se concentrações finais, nos meios de cultura, de 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 e 1024 $\mu$ g/ml. Para o fungicida Benlate foram usadas as concentrações de 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,5, 2 e 4 $\mu$ g/ml pois, em teste preliminar, verificou-se que, nas concentrações acima de 4 $\mu$ g/ml, o fungo não apresentava crescimento.

Foram utilizadas duas placas de Petri para cada concentração, no total de 58 placas de cada linhagem; como testemunhas, foram usadas placas sem fungicida. O meio de cultura foi o meio completo, descrito por Pontecorvo & col.(12).

Suspensões de conídios de colônias, incubadas oito dias em placas de Petri, contendo meio completo, foram preparadas em solução de Tween (0,1% v/v), sendo o número dos mesmos, estimado em hematímetro, em cerca de  $10^6$ - $10^7$ /ml. A inoculação, das suspensões das quatro linhagens, foi feita com o auxílio de um fio de platina, o qual era molhado na suspensão. As medidas dos diâmetros de crescimento foram feitas no quarto dia de incubação.

*Isolamento de mutantes resistentes a Benlate* - Em placas de Petri, contendo 8 $\mu$ g/ml de Benlate, foram semeados conídios da linhagem A de *M. anisopliae*, preparadas como descrito acima, semeando-se  $2 \times 10^6$  conídios/placa. Após oito dias de incubação, efetuou-se a contagem das colônias, nas placas contendo o fungicida, sendo calculada, assim, a frequência de mutação, dessa linhagem, para resistência a Benlate.

*Concentração mínima inibitória dos mutantes resistentes a Benlate* - Cinco mutantes, resistentes a pelo menos 8 $\mu$ g/ml de Benlate, obtidos como descrito no item anterior e que apresentavam bom crescimento

nessa concentração, foram ensaiados para se determinar qual a concentração mínima inibitória. Para tal, eles foram inoculados em placas com meio completo, mais concentrações crescentes de Benlate, de acordo com o procedimento descrito anteriormente.

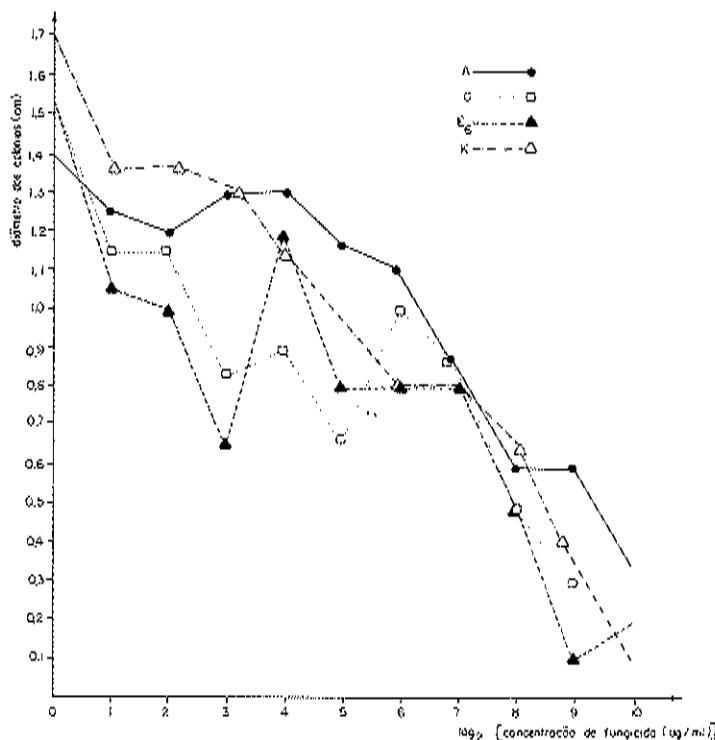
Após oito dias de incubação efetuou-se a medição dos diâmetros das colônias, nas diversas concentrações, assim como das testemunhas.

*Atuação dos fungicidas Benlate e Vitavax sobre *M. anisopliae** - Foram preparadas placas contendo meio completo, adicionado de Vitavax (256 e 512 $\mu$ g/ml) ou Benlate (4 $\mu$ g/ml). Nessas placas, foram semeados cerca de 150 conídios de cada linhagem usada. Após oito e quinze dias de incubação, foi feita a contagem de conídios germinados.

### Resultados e Discussão

*Determinação dos níveis de resistência* - As Figuras 1, 2 e 3 resumem os resultados obtidos com relação ao crescimento das linhagens usadas, em diversas concentrações dos fungicidas Cloroneb, Vitavax e Benlate.

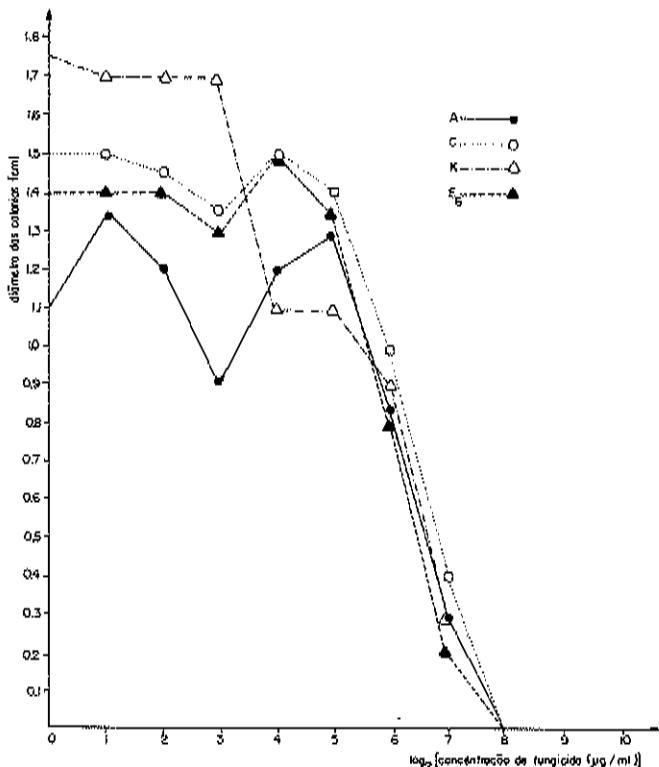
**Figura 1 - Curva de sobrevivência das linhagens A, C, K e E<sub>6</sub> de *M. anisopliae* ao fungicida Cloroneb**



Para o Cloroneb, houve crescimento das quatro linhagens do fungo,

até na maior concentração utilizada, significando alta resistência natural já existente. Em relação ao Vitavax, verificou-se que a concentração inibitória foi de 256 $\mu$ g/ml. Para o Benlate, verificou-se que, com 4 $\mu$ g/ml, não houve mais crescimento de qualquer das linhagens ensaiadas, indicando ser, este, o fungicida mais efetivo, entre os três empregados.

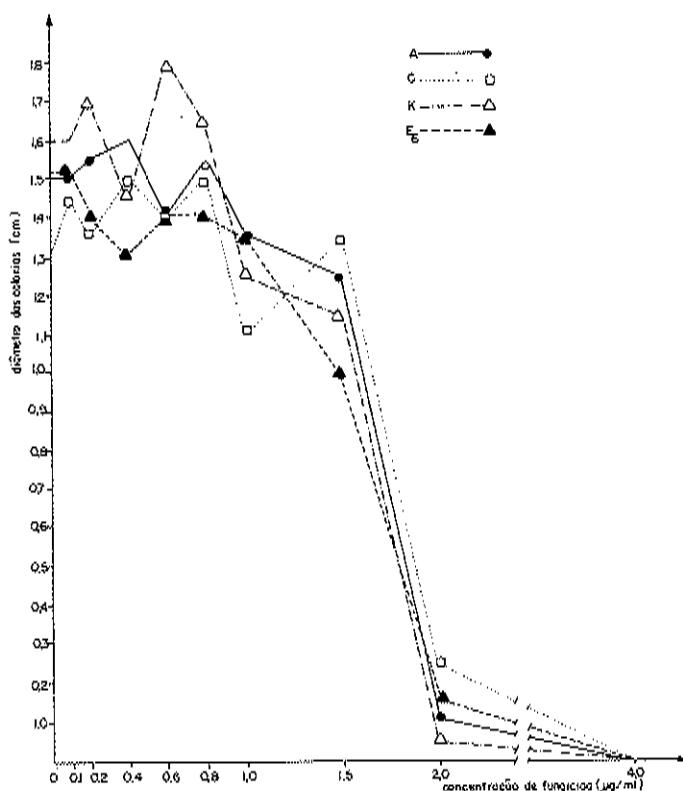
Figura 2 - Curva de sobrevivência das linhagens A, C, K e E<sub>6</sub> de *M. anisopliae* ao fungicida Vitavax



*Isolamento de mutantes resistentes a Benlate* - Através de semeadura de  $2 \times 10^7$  conídios, em placas com Benlate, 37 mutantes foram obtidos, o que dá uma frequência de 2,35 mutantes por  $10^6$  conídios. A Tabela 1 resume os resultados, observados com relação ao crescimento de alguns mutantes da linhagem A, em diversas concentrações do fungicida Benlate. Cinco desses mutantes, designados de Ben<sub>1</sub> até Ben<sub>5</sub> foram estudados com mais detalhes. Os mutantes Ben<sub>1</sub>, Ben<sub>2</sub> e Ben<sub>3</sub> apresentaram crescimento até 1024 $\mu$ g/ml; Ben<sub>4</sub> e Ben<sub>5</sub> cresceram até 128 $\mu$ g/ml. Verifica-se, assim, que em diferentes sítios, de um mesmo gene, podem ser modificados, dando diferentes níveis de resistência, ou, então, dois genes poderiam estar envolvidos, na determinação de resistência alta e baixa.

As linhagens com genes para resistência têm a mesma taxa de crescimento que a linhagem sensível original. Portanto, como o desenvolvimento do fungo não é alterado, a resistência a Benlate torna-se marca genética valiosa para uma linhagem que venha a ser aplicada, no campo

Figura 3 - Curva de sobrevivência das linhagens A, C, K e E<sub>6</sub> de *M. anisopliae* ao fungicida Benlate



e cuja disseminação se deseja medir; dessa forma, nos re-isolamentos que fossem feitos, poder-se-ia identificá-la, através da marca para resistência, sem o perigo de confundi-la com outra linhagem de *M. anisopliae*, previamente existente no campo. As marcas genéticas, para resistência a Benlate, poderiam ser utilizadas, também, em estudos básicos de genética deste fungo.

*Atuação dos fungicidas Benlate e Vitavax sobre M. anisopliae* - A Tabela 2 resume os números de colônias obtidas das quatro linhagens, após oito a 15 dias de incubação, em concentrações inibitórias dos fungicidas Benlate e Vitavax. Verifica-se que, após oito dias de incubação, não houve qualquer crescimento, nas concentrações usadas. Somente após 15 dias de incubação é que houve crescimento das colônias, para o caso de Vitavax.

Comparando-se o crescimento das quatro linhagens de *M. anisopliae* verifica-se que a linhagem E<sub>6</sub> apresentou, após 15 dias, número menor de colônias do que todas as outras, nas concentrações de 256 µg/ml e 512 µg/ml de Vitavax, parecendo ser a menos resistente a esse fungicida. Observa-se, ainda, que, mesmo após 15 dias de incubação, não houve qualquer crescimento em Benlate. Conclui-se, portanto, que Vitavax atua como fungistático, enquanto que o Benlate possivelmente causa a morte de todas as linhagens ensaiadas, embora não possa ser afastada a hipótese de que uma ação residual, prolongada, de Benlate impedis-se, mesmo após esse tempo, o desenvolvimento de colônias.

Tabela 1 - Média dos diâmetros em centímetros de colônias de 5 mutantes da linhagem A de *M. anisopliae* resistentes a 8 $\mu$ g/ml de Benlate em várias concentrações desses fungicidas

Concen- trações	Mutantes					Linhagem original
	<i>Ben</i> <sub>1</sub>	<i>Ben</i> <sub>2</sub>	<i>Ben</i> <sub>3</sub>	<i>Ben</i> <sub>4</sub>	<i>Ben</i> <sub>5</sub>	
0	1,85	1,40	1,55	1,85	2,10	1,85
2	1,70	1,70	1,55	1,85	1,65	1,30
4	1,75	1,75	1,45	1,60	1,80	0,00
8	1,75	1,35	1,35	1,75	1,90	0,00
16	1,55	1,75	1,65	1,60	1,65	0,00
32	1,15	1,10	1,15	0,55	0,40	0,00
64	1,50	1,20	1,20	0,40	0,75	0,00
128	1,50	1,00	1,50	0,50	0,60	0,00
256	0,60	0,85	0,90	0,00	0,00	0,00
512	0,50	0,55	0,70	0,00	0,00	0,00
1024	0,45	0,50	0,90	0,00	0,00	0,00

Tabela 2 - Média dos números de colônias das linhagens A, C, K e E<sub>6</sub> de *M. anisopliae* obtidas após inoculação em meio de cultura contendo concentrações de 256 $\mu$ g/ml e 512 $\mu$ g/ml de Vitavax e 4 $\mu$ g/ml de Benlate, após 8 e 15 dias de incubação

Concen- trações ( $\mu$ g/ml)	Linhagens							
	K		A		C		E <sub>6</sub>	
	8	15	8	15	8	15	8	15
0	130,0	130,0	130,0	130,0	115,0	115,0	95,5	92,5
Benlate 4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Vitavax 256	0,0	137,0	0,0	100,0	0,0	132,0	0,0	3,0
Vitavax 512	0,0	21,0	0,0	0,0	0,0	61,5	0,0	3,5

#### Referências Bibliográficas

1. Alves, S.B. - Efeito fungitóxico "in vitro" de defensivos sobre patógenos de insetos. ESALQ/USP, Piracicaba, 1978. (Tese de Doutoramento).
2. Aquino, M.L.N. - O fungo entomógeno *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, no estado de Pernambuco. B. Tec. Inst. Pesq.

- Agr. (Recife), 72:1-26, 1974.
3. Aquino, M.L.N.; Cavalcanti, V.A.L.B.; Sena, R.C. & Queiroz, G.F. - Nova tecnologia de multiplicação do fungo *Metarrhizium anisopliae*. B. tec. CODECAP, 4:1-31, 1975.
  4. Azevedo, J.L. - O controle biológico de insetos por microrganismos. In: - Anais do Simpósio sobre Ciências Básicas e Aplicadas. Publicação ACIESP, Acad. Ciências Estado de São Paulo, 19:171-175, 1979.
  5. Azevedo, J.L.; Santana, E.P. & Bonatelli Jr., R. - Resistance and mitotic instability to chloroneb and 1,4-oxathiin in *Aspergillus nidulans*. Mut. Research, 48:163-172, 1977.
  6. De Bach, P. - Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas. 2.ed. México, Campania Editorial Continental, 1968.
  7. Franz, J.M. - Biological control of pest insects in Europe. Ann. Rev. Ent., 6:183-200, 1961.
  8. Guaglioni, P. - As cigarrinhas dos canaviais no Brasil. 1<sup>a</sup>. Contribuição: Perspectivas de uma luta biológica nos Estados de Pernambuco e Alagoas. Brasil Açucareiro, 72:34-43, 1968.
  9. Machrowicz, I. - Effect of some plant protection chemicals on the development of some fungi in pure culture. Zeszyty naukowe wyzszej Szkoly rolniczej Szczecinie, Sér. 3, 24:179-184, 1967.
  10. Marques, E.S. & Vilas Boas, A.M. - Contribuição ao estudo da cultura e aplicação de *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) no controle da cigarrinha-da-folha (Mahanarva posticata Stal) no nordeste do Brasil. Anais da 1<sup>a</sup>. Reunião Anual Sociedade Entomológica do Brasil, Viçosa, MG, 1973.
  11. Matta, E.A.F. de & Oliveira, M.Z.A. - Efeito de inseticida malatol 50E no crescimento do fungo *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., "in vitro". Resumo do III Congresso Latinoamericano de Entomologia e V Congresso Brasileiro de Entomologia, Bahia, 1978.
  12. Pontecorvo, G.; Roper, J.A.; Hemmons, L.M.; MacDonald, K.D. & Bufton, A.W.J. - The Genetics of *Aspergillus nidulans*. Adv. in Gen., 5:141-238, 1953.
  13. Veen, K.H. - Recherches sur la maladie, due à *Metarrhizium anisopliae* chez le criquet pèlerin. Mendedelingen Landbownogeschool Wageningen, Nederland, 68:1-77, 1968.

# INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO NO CRESCIMENTO DE CHLORELLA HOMOSPHAERA

Selma Gomes Ferreira Leite  
& Francisca Pessôa de França (Bolsista CNPq)

Deptº de Engenharia Bioquímica, Escola de Química UFRJ  
Centro de Tecnologia, Bloco E - Ilha do Fundão  
21941 Rio de Janeiro RJ, Brasil

## Resumo

Três diferentes fontes nitrogenadas foram utilizadas, em concentrações variáveis, para o crescimento de *Chlorella homosphaera* em cultivo mixotrófico (1% de glicose), sob iluminação constante, aeração ( $2,85\text{ l/m/l}$ ), agitação (200rpm) e temperatura de  $35^{\circ}\text{C}$ . Foram quantificadas a produção de biomassa e o consumo de nutrientes (glicose e fonte de nitrogênio). As fontes empregadas foram: uréia - 0,10 - 0,20 - 0,35 - 0,70 e  $1,00 \text{ g l}^{-1}$ ;  $\text{NaNO}_3$  - 0,60 - 1,20 - 2,40 e  $10,00 \text{ g l}^{-1}$  e  $\text{NH}_4\text{Cl}$  - 0,06 - 0,12 e  $0,24 \text{ g l}^{-1}$ . A melhor fonte para obtenção de biomassa foi uréia, na concentração de  $0,35 \text{ g l}^{-1}$ , sendo que em nenhum dos teores testados verificou-se inibição do crescimento. O nitrato também proporciona bom crescimento, que é inibido em torno de  $10,00 \text{ g l}^{-1}$  de  $\text{NaNO}_3$ . O amônio, entretanto, inibe em concentrações de cerca de  $0,24 \text{ g l}^{-1}$  e a produção de células é insignificante; em nenhuma das concentrações desse sal é verificado consumo de glicose.

## Summary

*The influence of different nitrogen sources in growth of Chlorella homosphaera*

Three nitrogen sources were used in varying concentrations in mixotrophic cultivation (1% of glucose) of *Chlorella homosphaera* with continue illumination, aeration ( $2.85\text{ l/m/l}$ ), agitation (200 rpm) and temperature of  $35^{\circ}\text{C}$ . During processing biomass production and concentration of nutrients (N and C organic) were determined. Sources used: urea - 0,10 - 0,20 - 0,35 - 0,70 -  $1,00 \text{ g l}^{-1}$ ;  $\text{NaNO}_3$  - 0,60 - 1,20 - 2,40 -  $10,00 \text{ g l}^{-1}$  and  $\text{NH}_4\text{Cl}$  - 0,06 - 0,12 -  $0,24 \text{ g l}^{-1}$ . Urea yields best biomass at concentration of  $0,35 \text{ g l}^{-1}$  causing no inhibition when this level was used. Nitrate also provides good growth, which tends to diminish at  $10,00 \text{ g l}^{-1}$  of  $\text{NaNO}_3$ . Ammonium causes inhibition at concentration of  $0,24 \text{ g l}^{-1}$  when cellular production is small; glucose consume when using ammonium chlorid was not verified.

## Introdução

São consideradas, enormemente, as diferentes influências obtidas no comportamento de células de algas, com variações de fontes de nitrogênio. Rex & col.(15), estudando a influência de concentração de nitrato, no crescimento de *Chlorella pyrenoidosa*, em condições fotosintéticas, encontraram como quantidade ideal 1,8g de nitrogênio por

litro, usando  $\text{KNO}_3$ . França & col. (7), usando 0,24% (p/v) de  $\text{NaNO}_3$ , conseguiram maior peso seco para células de *Chlorella homosphaera* (0,53%).

Shah & col. (18), pesquisando a influência da concentração de nitrogênio, no crescimento de *Chlorella pyrenoidosa*, *Scenedesmus quadricauda* e *Chlamydomonas debaryana*, encontraram máxima taxa de crescimento com  $\text{KNO}_3$ , nas concentrações de 55, 50 e 45mg de nitrogênio por litro, respectivamente.

Schuler & col. (17), empregando  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  com  $^{14}\text{N}$  amoniacal, no crescimento de *Chlorella vulgaris* verificaram que a alga utiliza  $\text{NH}_4^+$  preferencialmente, e, após esgotar essa fonte, então absorve  $\text{NO}_3^-$ . Isso já não ocorre para *Chlorella pyrenoidosa* que, numa primeira fase de cultivo, quando a alga não tem suficiente fonte endógena de energia,  $\text{NH}_4^+$  é preferencial, mas o crescimento efetivo é conseguido como  $\text{NO}_3^-$ .

Sälägeanu & col. (16) verificaram que, em 0,6g de uréia por litro, obtém-se meio mais favorável para acúmulo de substância orgânica e promoção de fotossíntese, em *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus acutiformis*. Pryzstocka Jusiak (14), pesquisando a sobrevivência de *Chlorella vulgaris*, em altas concentrações de nitrogênio, notou que amônio tornava-se tóxico a partir de 1,33g de nitrogênio por litro; nitrato em 10,0g de nitrogênio por litro com 50% de sobrevivência em ambas, e a uréia não mostrava efeito tóxico, em concentrações acima de 12,0g de nitrogênio por litro. A amostra apresentou particular sensibilidade ao amônio.

Devido à falta de dados referentes à amostra de *Chlorella homosphaera*, na literatura, em relação à utilização de diferentes fontes nitrogenadas, o presente trabalho foi realizado.

## Material e Métodos

*Microrganismo empregado* - *Chlorella homosphaera*, purificada e identificada no DEB da EQ na UFRJ (1), em cultura estoque mantida em gelose Difco a 5°C, após crescida, por 7 dias, sob iluminação constante.

*Meio empregado* - Meio de Simmer modificado (19), adicionado de 1% de glicose (6), variando-se a fonte nitrogenada em diferentes concentrações: uréia - 0,10 - 0,20 - 0,35 - 0,70 - 1,00  $\text{g l}^{-1}$ ; nitrato de sódio - 0,60 - 1,20 - 2,40 - 10,00  $\text{g l}^{-1}$  e cloreto de amônio - 0,60 - 0,12 - 0,24  $\text{g l}^{-1}$ . Todos os constituintes do meio foram esterilizados a 110°C, por 20 minutos, exceto a uréia, que foi esterilizada por filtração.

*Inóculo* - O inóculo foi preparado em frascos agitados, a 110-120 oscilações/min. B.Braun Melsungen, de 500ml, contendo 100ml de meio de cultura sob iluminação contínua de seis lâmpadas fluorescentes de 15w cada, a 35°C  $\pm$  0,1. O inóculo inicial, para a produção de biomassa, foi padronizado por curva de peso seco contra absorbância; o peso das amostras, colhidas durante o processo, foi determinado por esta curva. As células foram secas a 90°C e a absorbância foi de 430nm, lida em Spectronic 20 Bausch & Lomb; a absorbância de 0,325 correspondeu a 0,10mg de células por ml.

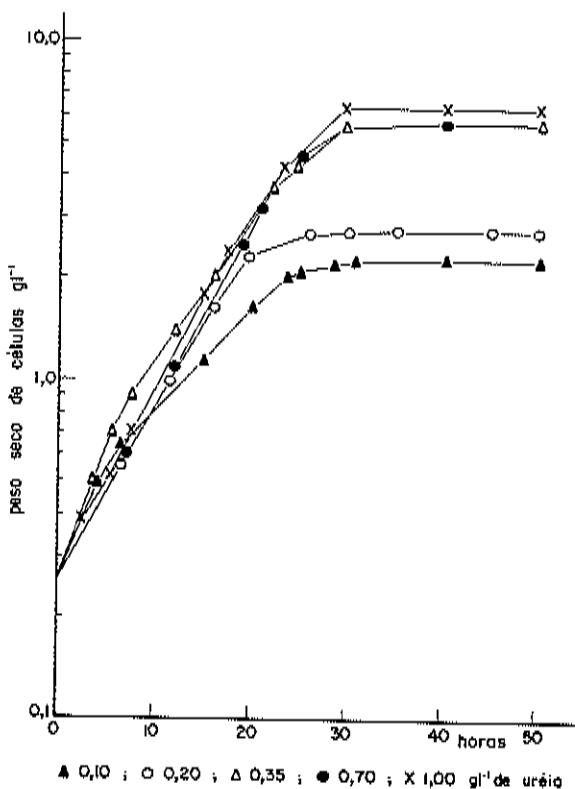
*Produção de biomassa* - O processo foi conduzido em fermentadores Virtis, com capacidade de quatro litros, contendo 2,2 litros de meio de cultura, com controle de aeriação (2,85l/m/l), agitação (200 rotacões por minuto), temperatura 35°C e iluminação contínua, através de quatro lâmpadas fluorescentes, de 40w cada. O cultivo heterotrófico foi obtido nos fermentadores, nas mesmas condições, apenas sem iluminação e com os reatores envoltos em papel manilha e laminado.

*Determinações quantitativas - 1. Análise da biomassa* - em intervalo de quatro horas, foram tomadas aliquotas de 5ml, centrifugadas, lavadas por três vezes com água destilada e lida a absorbância a 430nm para se obter o crescimento celular; 2. *Análise do sobrenadante* - obtido a partir da centrifugação das amostras colhidas; 2.1. *Dosagem do consumo de glicose* - feito pela glicose oxidase, segundo "Kit" Merck (Merkotest glucose - Methode god Pap); 2.2. *Dosagem do consumo de uréia* - feito pelo método da urease (Merckotest - Uréia); 2.3. *Dosagem do consumo de nitrato* - feito pelo reagente fenol - dissulfônico(20); 2.4. *Dosagem do consumo de amônio* - feito pelo reagente de Nessler(4); 2.5. *Dosagem da variação do pH* - determinado potenciometricamente (Metrohm - Herison).

## Resultados

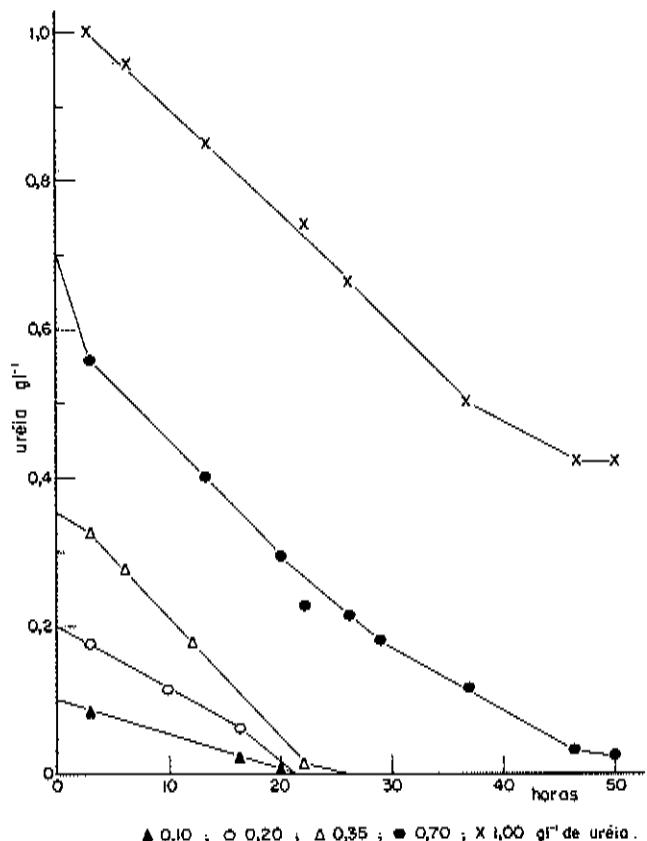
O crescimento de *Chlorella homosphaera* foi proporcional ao aumento da concentração de uréia, sem que tivesse sido verificada inibição, mesmo no teor máximo estudado. O máximo obtido foi, em média, 6,1  $\text{g l}^{-1}$  de peso seco de células, nas concentrações a partir de 0,35  $\text{g l}^{-1}$  (Fig.1). O consumo da uréia foi total ou quase total, embora com menor velocidade, à medida que se aumenta o teor do composto no meio; com 1,00  $\text{g l}^{-1}$  de uréia cerca de 42% permanece no meio, sem

Figura 1 - Produção de biomassa de *Chlorella homosphaera* em função da concentração inicial de uréia



ser consumido (Fig.2). O consumo de glicose é tanto maior quanto mais uréia é empregada no meio de cultivo, sendo praticamente esgotada nas

Figura 2 - Consumo de uréia por *Chlorella homosphaera*



maiores concentrações de fonte nitrogenada (Fig.3). O pH inicialmente se eleva até 21 horas; diminui, até início da fase estacionária; e torna a subir, durante toda a fase estacionária (Fig.4).

O crescimento foi também proporcional ao aumento da concentração de  $\text{NaNO}_3$ , atingindo  $5,2 \text{ g l}^{-1}$ , entretanto, com início de inibição, em torno de  $10,00 \text{ g l}^{-1}$  do composto (Fig.5). O consumo do nitrato foi proporcional à quantidade inicial, colocada no meio de cultura, obtendo-se consumo total nas menores concentrações e máximo (de  $6,0 \text{ g l}^{-1}$ ) no maior teor testado (Fig.6). O consumo da glicose foi dependente da concentração de  $\text{NaNO}_3$ ; nas maiores concentrações todo açúcar foi consumido (Fig.7). O pH, durante o processo, atingiu valores básicos, acima de 8,0 (Fig.8).

Quando se trabalhou com cloreto de amônio, o comportamento da microalga foi bem diferente, em relação às outras fontes. O crescimento foi, inversamente, proporcional à concentração de amônio, atingindo,

Figura 3 - Consumo de glicose por *Chlorella homosphaera* cultivada em diferentes concentrações de uréia

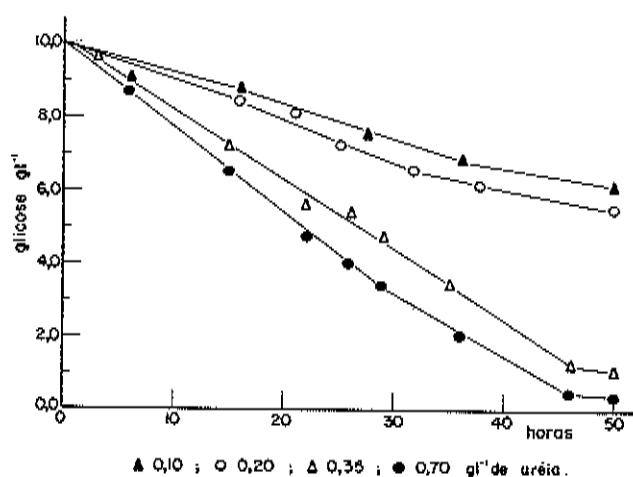


Figura 4 - Variação do pH do meio de cultura contendo diferentes concentrações de uréia, no crescimento de *Chlorella homosphaera*

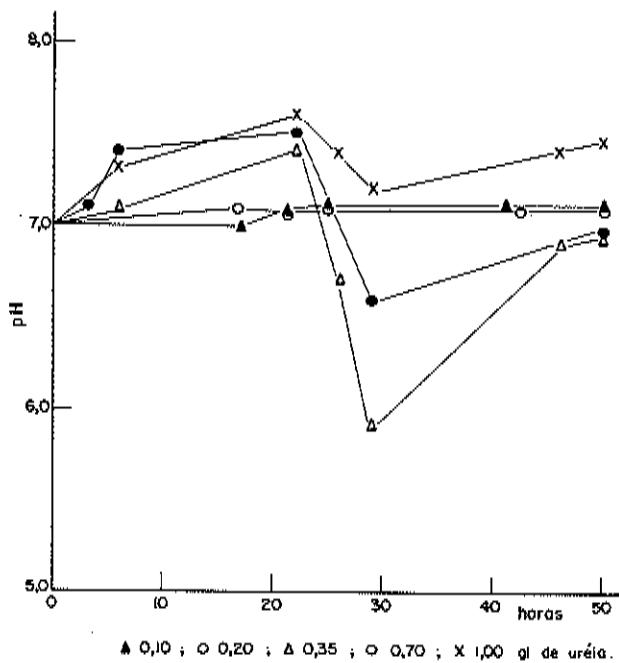
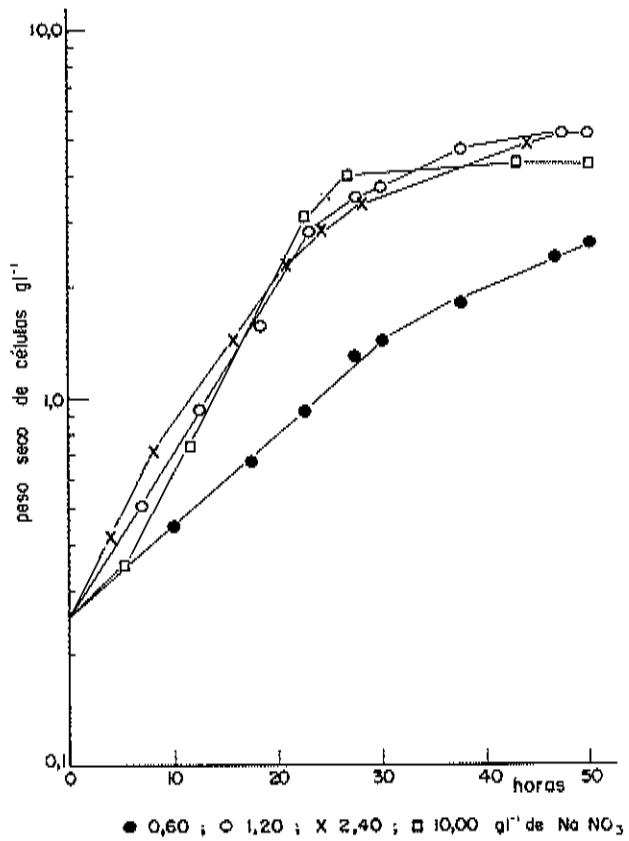


Figura 5 - Produção de biomassa de *Chlorella homosphaera* em função da concentração inicial de nitrato de sódio



no máximo,  $0,4 \text{ g l}^{-1}$  de células (Fig.9). Não foi observado consumo de glicose, em presença de amônio, em mixotrofismo, nem em heterotrofismo. Nas experiências, realizadas em ausência de glicose, o crescimento foi o mesmo que nos experimentos com glicose (Fig.10). O consumo de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  foi, praticamente, total, nas mais baixas concentrações de amônio testadas, com teor bastante significativo na mais alta concentração; o consumo máximo foi  $0,11 \text{ g l}^{-1}$ , conseguido nos experimentos com  $0,12 \text{ g l}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Fig.11). O pH, de todos os experimentos, atinge valor ácido, entre 3,3 e 4,5 (Fig.12).

#### Discussão

Little & col.(11), trabalhando com *Chlorella ellipsoidea*, em condição heterotrófica conseguiram peso de células da ordem de  $0,43 - 0,48 \text{ g l}^{-1}$ , empregando  $0,60 \text{ g l}^{-1}$  de uréia e  $0,60 \text{ g l}^{-1}$  de glicose; nosso rendimento em biomassa foi maior (Fig.1). A uréia-amidoliase é dependente de ATP e, segundo os mesmos autores, a glicose ativa o sistema enzimático em questão; talvez isso explique o maior consumo do

Figura 6 - Consumo de nitrato de sódio por *Chlorella homosphaera*

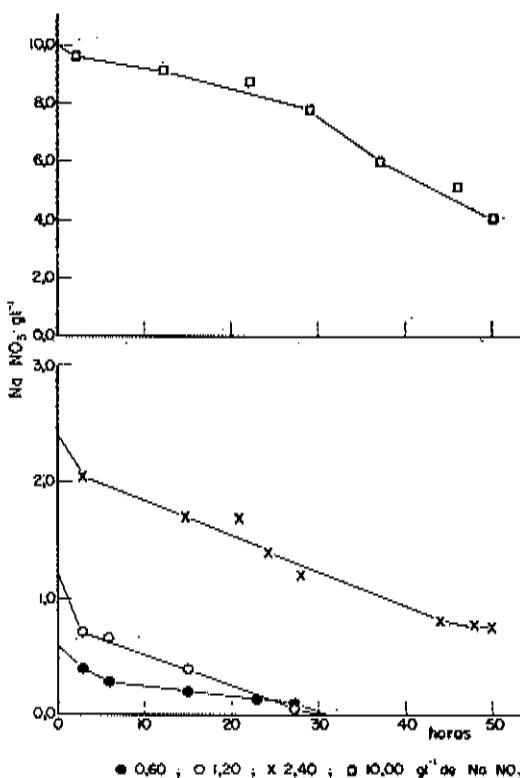


Figura 7 - Consumo de glicose por *Chlorella homosphaera* em diferentes concentrações de nitrato de sódio

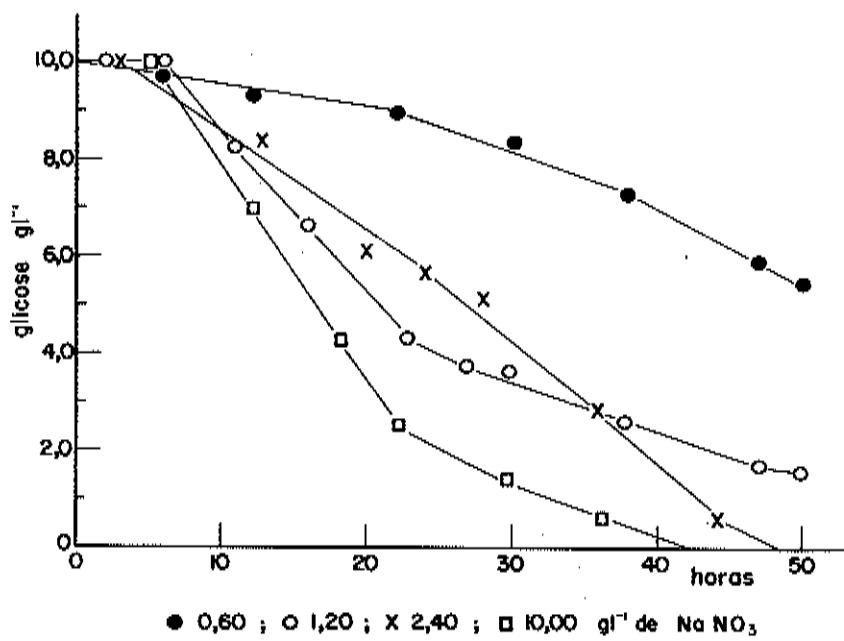
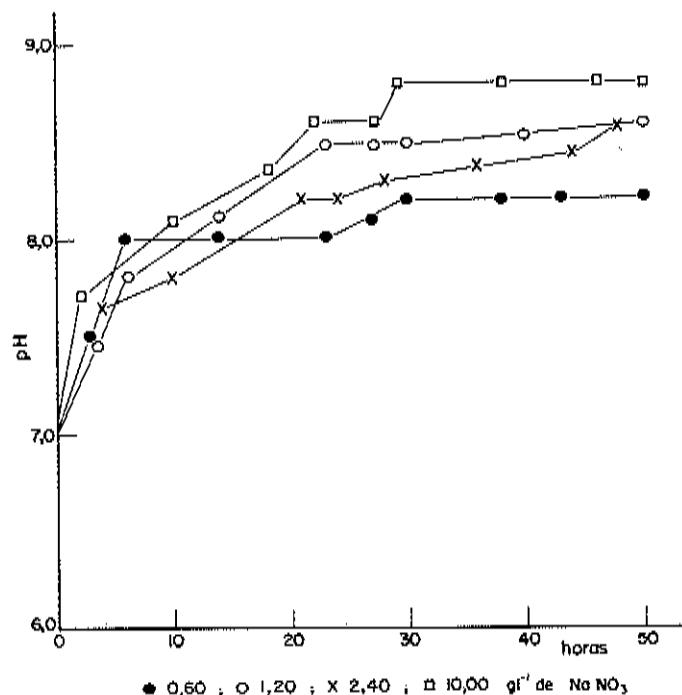


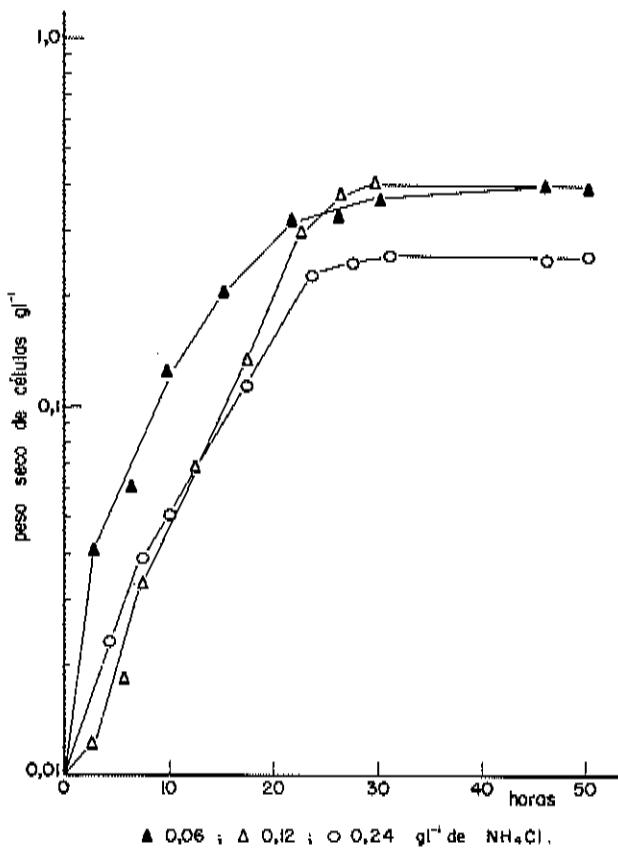
Figura 8 - Variação do pH do meio de cultura contendo diferentes concentrações de nitrato de sódio, no crescimento de *Chlorella homosphaera*



açúcar nas maiores concentrações de uréia (Fig. 2 e 3). O aumento inicial de pH, possivelmente, se dá por liberação da amônia, na hidrólise inicial da uréia(9, 10); no início da fase estacionária o pH diminui, por assimilação mais rápida dessa amônia que do CO<sub>2</sub>, também liberado. Little & col.(11) relatam que amônia é produzida em todas as fases de cultivo, mas, sua presença só é notada na fase estacionária, por aumento do pH; quando cessa o consumo desse íon o que foi constatado em nossos experimentos (Fig.4).

França & col.(7) obtiveram 5,30 g/l de células de *Chlorella homosphaera*, em cultivo mixotrófico, em frascos agitados, semelhante aos nossos resultados (Fig.5). Foi verificado, pelos autores, início de inibição em torno de 5,00 g/l de NaNO<sub>3</sub>, crescente com o aumento da concentração do composto nitrogenado. Alguns pesquisadores(12,17) verificaram assimilação inicial de amônio, em meio contendo nitrato e amônio e diminuição da atividade da nitrato-redutase, em presença da fonte amoniacal. Talvez isso explique porque, em maiores concentrações de NaNO<sub>3</sub>, o excesso do íon formado, diminua a ação da enzima, impedindo a redução e, consequentemente, a assimilação total do composto por *Chlorella homosphaera* (Fig.5). Davis(3), relata que a redução do nitrato, em condição heterotrófica, está acoplada à oxidação da glicose. Se, em condição mixotrófica, pode ser feita essa mesma análise, podemos explicar porque a glicose é totalmente consumida, nos cultivos com maiores teores de nitrato (Fig.7). Pratt & col.(13).

**Figura 9 - Produção de biomassa de *Chlorella homosphaera* em função da concentração inicial de cloreto de amônio**



também verificaram, como nós (Fig.8), aumento nos valores de pH, trabalhando com *Chlorella vulgaris*, cultivada em  $\text{KNO}_3$  e interpretaram como sendo devido ao fato que  $\text{NO}_3^-$ , derivado da hidrólise do sal, seja absorvido juntamente com um  $\text{H}^+$ .

Nas duas menores concentrações de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  estudadas, a mesma biomassa foi obtida com aumento na velocidade de crescimento para  $0,06 \text{ g l}^{-1}$  (Fig.9). Parece que amônio inibe, de alguma maneira, a utilização da hexose. Pratt & col.(13) acham que, em presença de  $\text{NH}_4^+$ , ocorrem variações coloidais, na parede celular, que alteram a capacidade de absorção, elasticidade e plasticidade e as células tendem a crescer mais. Em células de *Chlorella vulgaris*, o sistema de indução do transporte de hexose é intracelular(8). Aliando-se esses dois mecanismos de transporte e alterações sofridas, podemos talvez explicar o não consumo de glicose, por *Chlorella homosphaera* e a não modificação do crescimento, em presença ou ausência de glicose (Fig.10). A microalga mostrou-se bastante sensível ao amônio, com pouca capacidade de absorção do mesmo (Fig.11). Araújo(1) e Cain(2), salientam que a baixa biomassa, em meio amoniacal, pode ser devida à reação altamente

Figura 10 - Influência da glicose no crescimento de *Chlorella homosphaera* em função da concentração de cloreto de amônio

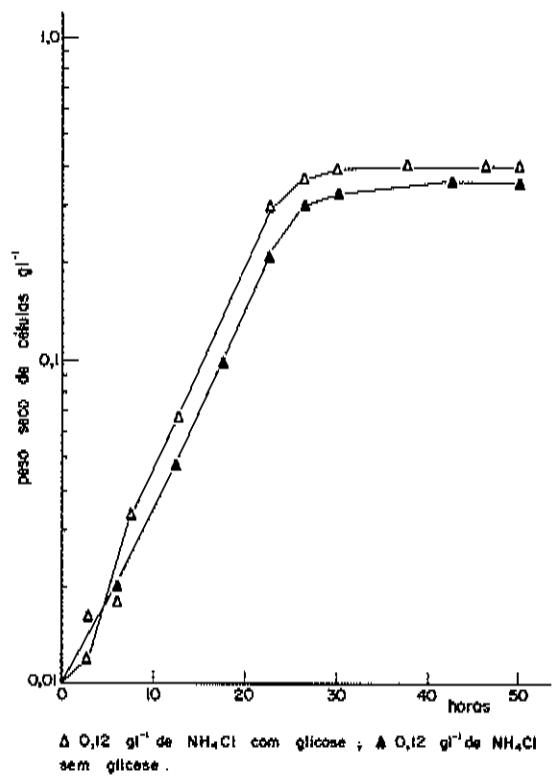


Figura 11 - Consumo de cloreto de amônio por *Chlorella homosphaera*

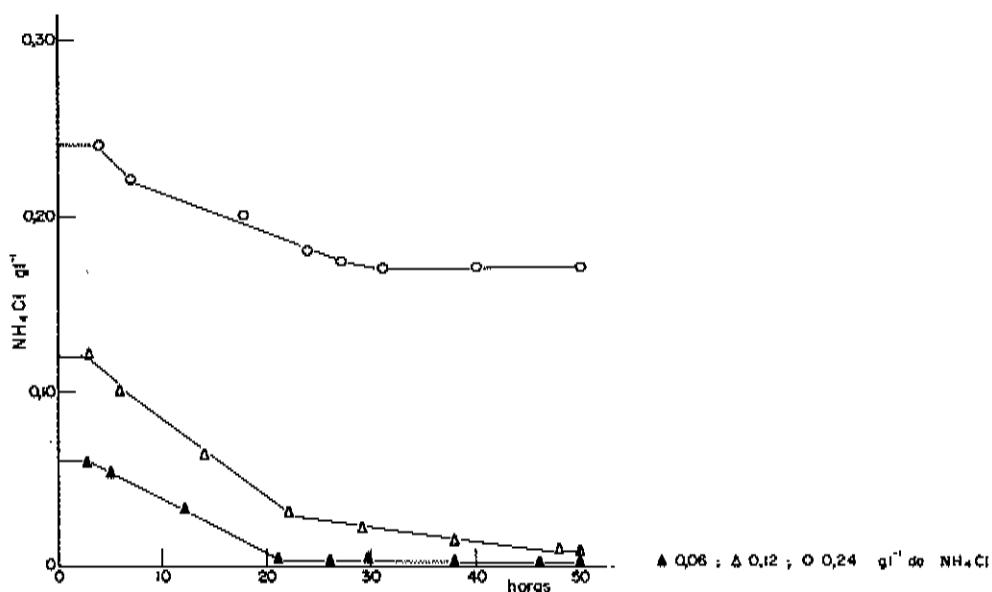
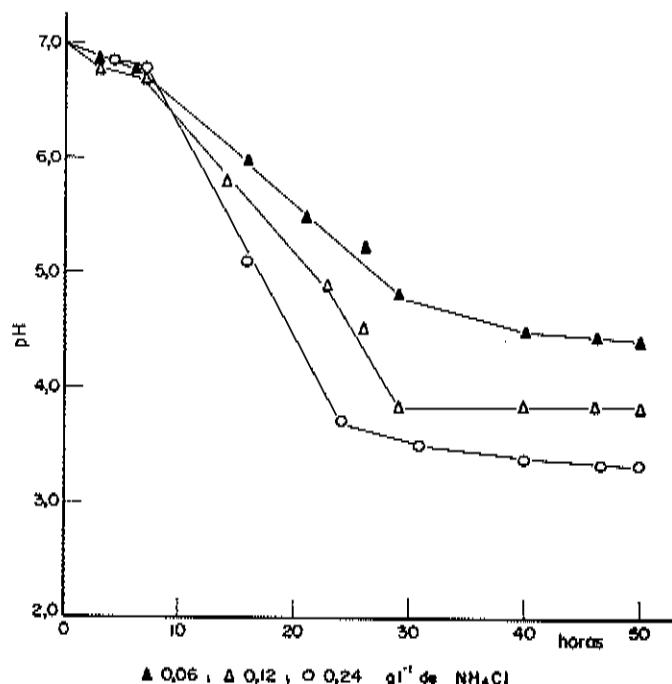


Figura 12 - Variação de pH do meio de cultura contendo diferentes concentrações de cloreto de amônio, no crescimento de *Chlorella homosphaera*



ácida, que se processa, quando da absorção do íon, com queda nos valores de pH. Também verificamos essa queda (Fig.12), mas, não conseguimos aumento da produção celular, em experimentos com controles de pH.

#### Referências Bibliográficas

1. Araújo, J.M. - Fonte de nitrogênio e teor de vitamina B<sub>6</sub> em *Chlorella homosphaera*. Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia da UFRJ, 1976. (Tese de Mestrado).
2. Cain, B.J. - Nitrogen utilization in 38 freshwater Chlamydomonad algae. Can. J. Bot., 43:1367-1378, 1965.
3. Davis, E.A. - Nitrate reduction by *Chlorella*. Plant. Physiol. 28:539-544, 1953.
4. Farmacopéia Brasileira. 3.ed. São Paulo, Andrei Editora, 1976.
5. França, F.P. de; Gomes, M.P.D.; Alvernaz, M.T.G. & Silva Filho, M.V. - Influence of temperature on the production of *Chlorella homosphaera* biomass. Rev. Lat. Amer. Microbiol., 20:235-238, 1978.
6. França, F.P. de & Maçaira, L.A. - Influência da concentração de glicose no crescimento de *Chlorella* sp. Rev. Lat. Amer. Microbiol., 18:69-71, 1976.

7. França, F.P. de & Yuan, M.C. - Influência da concentração de  $\text{NaNO}_3$  na produção de biomassa de *Chlorella homosphaera*. Rev. Microbiol. (S. Paulo), 9:88-91, 1978.
8. Haass, D. & Tanner, W. - Regulation of hexose transport in *Chlorella vulgaris*. Plant. Physiol., 53:14-20, 1974.
9. Kitch, S. & Hori, S. - Metabolism of urea in *Chlorella ellipsoidea*. Plant & Cell Physiol., 18:513-519, 1977.
10. Leftley, J.W. & Syrett, P.J. - Urease and ATP: urea amidolyase activity in unicellular algae. J. Gen. Microbiol., 77:109-115, 1973.
11. Little, L.W. & Mah, R.A. - Ammonia production in urea grown cultures of *Chlorella ellipsoidea*. J. Phycol., 6:277-280, 1970.
12. Morris, I. & Syrett, P.J. - The development of nitrate reductase in *Chlorella* and its repression by ammonium. Archiv. für Microbiol., 47:32-41, 1963.
13. Pratt, R. & Fong, J. - Studies on *Chlorella vulgaris*. III - Growth of *Chlorella* and changes in the hydrogen-ion and ammonium-ion concentrations in solutions containing nitrate and ammonium nitrogen. American J. of Botany, 27:735-742, 1940.
14. Przytacka-Jusiak, M. - Growth and survival of *Chlorella vulgaris* in high concentrations of nitrogen. Acta Microbiol. (Pol.), 25:287-289, 1976.
15. Rex, A. & Romero, A. - Feasibility of the use of Chilean nitrate as a nitrogen source for the growth of *Chlorella pyrenoidosa*. J. Sci. Fd. Agric., 23:1293-1296, 1976.
16. Sălăgeanu, N. & Ionănescu, L. - Some physiological process in the green algae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutiformis* cultivated in laboratory conditions and on various nutritive media. An. Univ. Bucur. Biol. Veg., 19:117-126, 1970.
17. Schuler, J.F.; Diller, V.M. & Kersten, H.J. - Preferential assimilation of ammonium ion by *Chlorella vulgaris*. Plant Physiol., 28:299-303, 1952.
18. Shah, A.U. & Chughtai, M.I.D. - Studies on the kinetics of nitrogen assimilation and protein turnover by some Chlorophyceae. Proc. Pak. Acad. Sci., 13:69-15, 1976.
19. Silva Filho, M.V. - Influência da relação carbono/nitrogênio (C/N) no crescimento heterotrófico de uma amostra de *Scenedesmus intermedius* Chod. Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia UFRJ, 1978. (Tese de Mestrado).
20. Trugo, L.C. - Dosagem de nitrato em presença de nitrito em carnes curadas. Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina Veterinária UFF, 1979. (Tese de Mestrado).

# VACINAÇÃO ORAL ANTI PROPIONEBACTERIUM ACNES\*: AVALIAÇÃO POR NÍVEIS DE ANTICORPOS SÉRICOS

Octávio Augusto de Carvalho Pereira  
& Rosa Maria Silva

Deptº de Microbiologia e Imunologia, Escola Paulista de Medicina  
Rua Botucatu, 862/3º andar  
04023 São Paulo SP, Brasil

## Introdução

Parece claro, atualmente, que componentes genéticos e hormonais estejam envolvidos no processo de desenvolvimento do acne vulgaris(16).

Contudo, os bons resultados, obtidos com o emprego de antibióticos, em um significativo número de casos, sugerem, fortemente, que bactérias tenham, também, importante participação.

O encontro sistemático do *Propionebacterium acnes*, em todos os estágios da acne, excedendo em muito o número de cocos gram-positivos, tem levado diversos autores a sugerir um importante papel para este microrganismo, na patogênese da doença(10,12,14,19).

Este achado tem encaminhado a maioria dos trabalhos, que procuram estudar os mecanismos imunológicos, envolvidos no acne, no sentido da resposta específica aos抗igenos do *Propionebacterium acnes*.

A detecção e titulação, por diferentes técnicas, de anticorpos dirigidos contra uma variedade de抗igenos constitucionais ou extra-cellulares do microrganismo, têm mostrado, de uma forma geral, que níveis mais elevados são encontrados em pacientes portadores de acne do que em controles sadios(12,13,14,15).

Hipersensibilidade imediata, relacionada a níveis elevados de anticorpos séricos, pode também ser demonstrada(15); hipersensibilidade de tipo tardio, entretanto, foi detectada nas mesmas proporções em pacientes e controles sadios, não parecendo ser influenciada por diferentes estágios ou formas clínicas da doença(15).

Por outro lado, foi recentemente demonstrado que o aumento no nível de IgG sérica, através da administração de amino-ácidos essenciais, promovia melhora clínica em pacientes que apresentavam aquela imuno-globulina em níveis abaixo do normal (Woscoff, A., Bozzola, C.J. & Trotta, M.C. - Comunicação pessoal).

Diversos estudos experimentais hoje já considerados clássicos demonstraram que em determinadas condições a administração por via oral de抗igenos bacterianos provoca uma resposta imune local(2,4,22).

Publicações mais recentes(9,17,20) demonstraram de forma inequívoca que a administração de抗igenos por via oral desencadeava também uma resposta imune sistêmica com o aparecimento de anticorpos séricos específicos.

\*Material gentilmente cedido para pesquisa pelo Deptº Científico de Wesley - Laboratórios Farmacêuticos Ltda.

Se o *Propionebacterium acnes* tem um papel definido na etiologia da doença, e uma resposta imune contra ele está claramente presente nos casos clínicos, é lícito supor que mecanismos imunológicos possam desempenhar importante papel no controle da infecção.

Seguindo esta linha de idéias, Belliboni(1) empregou, recentemente, no tratamento do acne, uma vacina oral preparada com *Propionebacterium acnes* e *Staphylococcus aureus* (frequente contaminante secundário das lesões) e que continha ainda sulfato de zinco. A avaliação dos resultados foi feita em bases clínicas e o produto foi considerado eficaz.

O objetivo do presente trabalho é avaliar laboratorialmente a capacidade desta vacina oral em estimular uma resposta imune específica sérica. Para isto uma partida especial da mesma foi preparada contendo apenas *Propionebacterium acnes* (ATCC 6921). Afim de descartar eventuais influências do estímulo imunológico desencadeado pela própria infecção, o experimento inclui pacientes e controles sadios. O seguimento do nível de anticorpos no decorrer e após a imunização foi o parâmetro escolhido para estimar os resultados da vacinação. A prova de imunofluorescência foi adotada em função de sua sensibilidade e da facilidade que oferece para o reconhecimento da imunoglobulina envolvida.

### Material e Métodos

*Vacina* - Foi administrada uma vacina oral, em cápsulas contendo抗ígenos de *Propionebacterium acnes* e preparada de forma a oferecer a liberação uniforme e cronogramada de absorção entérica, através de microesferas. Cada cápsula apresentava 500 milhões de unidades formadoras de colônias e era administrada diariamente, em jejum, por via oral, durante um período de 60 dias.

*Indivíduos* - Foram submetidos, à vacinação, 12 indivíduos, sendo oito do sexo feminino e quatro do sexo masculino, com idades variando entre 16 e 47 anos. Sete deles apresentavam acne, sendo quatro com forma mais severa e três com forma leve. Os cinco indivíduos restantes eram sadios. Todos os indivíduos concordaram, voluntariamente, em participar do ensaio e pertenciam, alguns, ao Depto. de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Escola Paulista de Medicina e outros ao Depto. Científico do Laboratório Wesley.

*Soros* - Foram obtidas amostras de soro de todos os indivíduos, antes de se iniciar o programa de vacinação e a 14, 28, 42, 56 e 70 dias, após iniciada a imunização.

*Avaliação do título de anticorpos* - A avaliação do título de anticorpos foi feita pela técnica de imunofluorescência indireta(7). Foi usado, como antígeno, a mesma cepa de *Propionebacterium acnes* (ATCC 6921), utilizada na produção da vacina. Os soros, a serem estudados, foram diluídos em razão dupla, a partir de 1/4. Foram utilizados conjugados anti-imunoglobulinas, das classes IgM e IgG humanas (Hyland - Division Travenol Laboratories, Incosta Mesa, California, USA), no título que garantia uma fluorescência de quatro cruzes, frente a soros positivos.

### Resultados

Na Tabela 1 aparecem os títulos de anticorpos da classe IgG, apresentados pelos 12 indivíduos, submetidos à vacinação, no decorrer do

Tabela 1 - Níveis de anticorpos de classe IgG em relação à presença de acne e dia do início da vacinação

Pacientes	Presença de acne	Dia					
		0	14	28	42	56	70
1	-	1024	1024	2048	2048	2048	2048
2	-	256	256	512	512	512	512
3	++	512	512	1024	1024	1024	1024
4	-	512	1024	1024	1024	1024	2048
5	+	1024	1024	2048	4096	4096	4096
6	++	8192	8192	8192	16384	16384	32768
7	++	8192	8192	8192	8192	8192	8192
8	+	1024	1024	2048	4096	4096	4096
9	+	512	1024	1024	1024	2048	2048
10	-	256	256	512	1024	1024	1024
11	-	256	256	1024	2048	2048	2048
12	++	8	8	16	16	16	16

experimento. Estes anticorpos estavam presentes, por ocasião do início da vacinação, na totalidade dos indivíduos, em títulos que variaram de oito a 8192. Foi observada elevação de título, em 11 dos 12 casos estudados.

Os resultados da pesquisa de anticorpos da classe IgM aparecem na Tabela 2. Sua detecção ocorreu em apenas dois indivíduos (um paciente e outro sadio), ao início da vacinação, em títulos que se elevaram, no decorrer do experimento. O paciente nº 8, sem anticorpos da classe IgM contra *Propionebacterium acnes*, ao início da vacinação, apresentou conversão sorológica posterior.

Tabela 2 - Níveis de anticorpos da classe IgM em relação à presença de acne e dia do início da vacinação

Indivíduos	Presença de acne	Dia					
		0	14	28	42	56	70
8*	+	-**	8	32	32	32	16
10	-	4	8	16	16	16	16
12	++	8	8	16	16	16	16

\* Os demais apresentaram soro não reagente em todo o transcorrer do experimento.  
\*\* Título inferior à 1/4.

A Tabela 3 apresenta a média dos títulos de anticorpos da classe IgG, encontrados ao inicio e fim do experimento, no grupo todo e, isoladamente, dos pacientes com acne e do grupo controle, bem como dos índices de conversão sorológica.

Tabela 3 - Anticorpos da classe IgG. Título médio antes e após a vacinação e média dos índices de conversão sorológica

Individuos	Antes	Após	Índice conversão sorológica
Pacientes	2781	7463	2,7
Controles	461	1536	3,3
Total	1814	4993	2,75

#### Discussão

Os resultados obtidos demonstram uma resposta efetiva, em termos de níveis de anticorpos séricos, à imunização com a vacina oral, preparada com *Propionebacterium acnes*.

Anticorpos de classe IgG foram detectados, na totalidade dos indivíduos estudados, antes do inicio da imunização (Tabela 1). Em média, títulos mais elevados foram encontrados entre os portadores de acne do que no grupo controle (Tabela 3), de acordo, aliás, com dados da literatura(12,16).

Com apenas uma exceção, todos os indivíduos estudados apresentaram aumento no teor de anticorpos. Os índices médios de conversão sorológica aparecem na Tabela 3 e foram discretamente maiores no grupo controle.

Anticorpos da classe IgM apareceram irregularmente, apenas na minoria de indivíduos.

Os mecanismos imunológicos fundamentais, envolvidos na resistência do hospedeiro, às infecções, variam, substancialmente, conforme o processo infeccioso considerado e, em apreciável número de casos, o controle da infecção não é, ainda, bem compreendido. Analisando-se, de forma parcial, em algumas situações, como a difteria e o tétano, anticorpos séricos estão diretamente relacionados com a resistência. Em outras, como a maioria das infecções a vírus das vias aéreas superiores, as imunoglobulinas presentes nas secreções, sobretudo IgA, desempenham um papel fundamental. Na tuberculose e algumas outras infecções, a resistência é dependência da imunidade, mediada por células e os anticorpos, embora presentes, não parecem desempenhar papel significativo.

Estímulos antigênicos, ao nível das mucosas, podem, por outro lado, determinar o aparecimento de respostas imunes, sistêmicas ou locais, tanto humorais como celulares e que terão importância variável, conforme a natureza do processo infeccioso(5,11,21).

Hoje está demonstrado, claramente, que preparações de抗igenos, administradas por via oral, podem estimular o aparecimento de todos

estes tipos de resposta imune, sejam elas constituídas por抗igenos solúveis ou celulares(3,6,11,18,21).

A etiopatogenia e imunologia do acne vulgaris incluem-se entre aquelas que estão, ainda, longe de serem adequadamente conhecidas. Parece claro que *Propionebacterium acnes* desempenha papel importante, embora outros fatores devam estar presentes. A inoculação de *Propionebacterium acnes*, em local de pele sadia, leva ao aparecimento de lesões típicas, em indivíduos com acne, mas não em controles sadios.

Em que pesem as alterações imunológicas, evidentes, no decorrer da moléstia, não está claro quais delas desempenham papel importante, seja no controle da infecção, seja na intensificação de mecanismos inflamatórios.

Não é objetivo do presente trabalho tentar esclarecer estes aspectos. Pretendíamos, apenas, verificar a eventual ocorrência de um mecanismo imunológico, caracterizado pela aparição de anticorpos específicos, em resposta à administração de uma vacina oral, que apresentou resultados eficazes do ponto de vista clínico(1).

Naquela ocasião, a vacina continha também *Staphylococcus aureus* e sulfato de zinco, que poderiam, eventualmente, ter influenciado de forma significativa os resultados, avaliados em bases clínicas. Utilizamos, por isto, uma vacina semelhante, contendo apenas *Propionebacterium acnes* e procuramos verificar suas condições de chegar a determinar uma resposta imune sistêmica, avaliável pela pesquisa e titulação de anticorpos séricos. Empregamos a imunofluorescência indireta, utilizando, como antígeno, uma suspensão bacteriana, pesquisando, fundamentalmente, portanto, anticorpos dirigidos para antígenos constitucionais da superfície do microrganismo.

Os resultados obtidos mostram que a vacina oral empregada foi eficaz, em estimular uma resposta imune sistêmica humorai, tanto em pacientes com acne, como em controles sadios.

O significado deste achado, em termos de controle da infecção, bem como eventual ocorrência simultânea de outros mecanismos imunológicos, requerem, evidentemente, novos estudos, como também sugerem outros autores(8).

#### Referências Bibliográficas

1. Belliboni, N. - Vacina oral e sulfato de zinco no tratamento do acne vulgaris: estudo duplo-cego comparativo com placebo. F. Méd. (BR)., 82:459, 1981.
2. Besredka, A. - Local immunization. Baltimore, Williams and Wilkins, 1927.
3. Bienenstock, J.; Dermott, M.; Befus, D. & O'Neill, M. - A common mucosal immunologic system involving the bronchus, breast and bowel. Advances in Experimental Medicine and Biology, 107:53, 1978.
4. Burrows, W. & Havens, I. - Studies on immunity to Asiatic cholera. V - The absorption of immune globulin from bowel and its excretion in the urine and feces of experimental animals and human volunteers. J. Inf. Dis., 82:231, 1948.
5. Carrington, P.W.; Roux, M.E.; McWilliams, Quagliata J.M.P. & Lamm, M.E. - Organ and isotype distribution of plasma cells producing specific antibody after oral immunization: evidence for

- a generalized secretory immune system. *The Journal of Immunology*, 123:1705, 1979.
6. Druguet, M. & André, C. - Réponse proliférative spécifique des lymphocytes circulants induite chez le rat ingérant de l'ovalbumine. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)*, 126:475, 1975.
  7. Fleming, A. - On etiology of acne vulgaris and its treatment by vaccines. *Lancet*, 176:1035, 1909.
  8. Harrison, H.R. & Fulginiti, V.A. - Bacterial immunizations. *Am. J. Dis. Child.*, 134:184, 1980.
  9. Husband, A.J. & Dowell, G.H. - Local and systemic immune responses following oral immunization of foetal lambs. *Immunology*, 29:1019, 1975.
  10. Marples, R.R. & Izumi, A.K. - Bacteriology of pustular acne. *J. Invest. Derm.*, 54:252, 1970.
  11. Mestecky, J.; McGhee, J.R.; Arnold, R.R.; Michalek, S.M.; Prince, S.J. & Babb, J.L. - Selective induction of an immune response in human external secretions by ingestion of bacterial antigen. *The Journal of Clinical Investigation*, 61:731, 1978.
  12. Puhvel, S.M.; Barfatani, M.; Warnick, M. & Sternberg, T.H. - Study of antibody levels to *Corynebacterium acnes*. *Arch. Derm.*, 90:421, 1964.
  13. Puhvel, S.M.; Warnick, M. & Sternberg, T.H. - Levels of antibody to *Staphylococcus epidermidis* in patients with acne vulgaris. *Arch. Derm.*, 92:88, 1965.
  14. Puhvel, S.M.; Hoffman, J.K. & Sternberg, T.H. - *Corynebacterium acnes*. *Arch. Derm.*, 93:364, 1966.
  15. Puhvel, S.M.; Hoffman, J.K.; Reisner, R.M. & Sternberg, T.H. - Dermal hypersensitivity of patients with acne vulgaris to *Corynebacterium acnes*. *J. Invest. Derm.*, 49:154, 1967.
  16. Puhvel, S.M. - Acne from an immunological perspective. *Cutis*, 17:502, 1976.
  17. Peri, B.A. & Rothberg, R.M. - Circulating antitoxin in rabbits after ingestion of diphtheria toxoid. *Infect. Immun.*, 32:1148, 1981.
  18. Raettig, H. - Mechanisms of oral immunization with inactivated microorganisms. *Progr. Immunobiol. Standard*, 4:336, 1970.
  19. Shehadeh, M.H. & Kligman, A.M. - The bacteriology of acne. *Arch. Derm.*, 88:829, 1963.
  20. Veronesi, R.; Focaccia, R.; Mazza, C.C.; Feldman, C.; Bazone, R. & Oliveira, C.E. - Imunização oral antitetânica: novas contribuições sobre sua viabilidade. *Rev. Bras. Med.*, 36:26, 1979.
  21. Waldman, R.H. & Henney, C.S. - Cell-mediated immunity and antibody responses in the respiratory tract after local and systemic immunization. *The Journal of Experimental Medicine*, 134:482, 1971.
  22. Weller, T.H. & Coom, A.H. - Fluorescent antibody studies with agents of varicella and Herpes Zoster propagated in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 86:789, 1954.

# ATIVIDADE COMPARADA DA CEFOPERAZONA E CINCO CEFALOSPORINAS FRENTE A 628 AMOSTRAS DE ENTEROBACTERIAS, PSEUDOMONAS E STAPHYLOCOCCUS

Luiz Rachid Trabulsi  
 Neusa P. Silva  
 & Lilian R.M. Marques

Deptº de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia  
 Escola Paulista de Medicina  
 Rua Botucatu, 862/39  
 04023 São Paulo SP, Brasil

## Resumo

CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> da cefoperazona e outras cinco cefalosporinas (cefoxitina, cefamandol, cefazolina, cefalexina e cefaloridina) foram analisadas frente a 628 amostras de: *Escherichia coli*, *K. pneumoniae*, *S. enteritidis*, *Shigella*, *Enterobacter*, *P. mirabilis*, *P. morganii*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *S. aureus* e *S. epidermidis*. Este estudo confirmou o amplo espectro de ação da cefoperazona que, ao contrário das outras cefalosporinas, apresentou excelente atividade contra *P. aeruginosa*. Em relação às demais amostras, sua atividade foi superior ou semelhante às outras cefalosporinas, com exceção das amostras de *S. enteritidis*, que foram relativamente resistentes a cefoperazona e às cefalosporinas, com exceção da cefoxitina.

## Summary

*Comparative activity of cefoperazone and five other cephalosporins against 628 strains of Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Staphylococcus*

MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> for cefoperazone and five cephalosporins (cefoxitin, cefamandole, cefazolin, cefalexin and cephaloridine) were determined for 628 strains of *Escherichia coli*, *K. pneumoniae*, *S. enteritidis*, *Shigella*, *Enterobacter*, *P. mirabilis*, *P. morganii*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *S. aureus* and *S. epidermidis*. The results support the claim for cefoperazone's very wide spectrum of inhibition. Cefoperazone unlike the other five cephalosporins showed an excellent activity against *P. aeruginosa*. Its activity against the other bacteria was superior or similar to the other cephalosporins with exception of *S. enteritidis'* strains which were relatively resistant to cefoperazone but sensitive to cefoxitin.

## Introdução

O desenvolvimento de novos derivados de cefalosporinas tem contribuído para ampliar o espectro antibacteriano desta classe de antibióticos em relação aos agentes mais antigos tais como: cefalotina, cefaloridina, cefazolina e outros. Cefoperazona, uma cefalosporina semi-sintética, recentemente desenvolvida, resistente a diversas β-lac-

tamases indutíveis(4) e cefoxitina, que combina elevada resistência a  $\beta$ -lactamases, com boa atividade frente a alguns anaeróbios(3,5), são alguns dos agentes, recentemente obtidos, cuja atividade antimicrobiana vem sendo bastante estudada(1,2).

Neste trabalho, apresentamos a avaliação comparativa da sensibilidade de amostras de enterobactérias, *Pseudomonas* e *Staphylococcus* a cefoperazona, cefoxitina, cefamandol, cefazolina, cefalexina e cefaloridina.

#### Material e Métodos

**Amostras** - 628 amostras, isoladas de pacientes de hospital e de ambulatório, em São Paulo, durante o ano de 1979, foram identificadas quanto a gênero e espécie e empregadas na determinação da atividade antimicrobiana das cefalosporinas em estudo.

**Teste de sensibilidade** - As concentrações inibitórias mínimas (CIM) de cefoperazona, cefoxitina, cefamandol, cefazolina, cefalexina e cefaloridina, para as amostras estudadas, foram determinadas pelo método da diluição em meio sólido(6). A concentração dos antibióticos variou de 0,1 a 102,4 $\mu$ g/ml e o meio usado foi Müller-Hinton Agar. O inóculo, preparado por diluição salina de uma cultura em caldo, cresceu por 18-20 horas a 37°C, continha cerca de  $10^4$  bactérias. A concentração inibitória mínima foi definida como sendo a menor concentração de antibiótico que inibiu 50% do crescimento presente na placa controle.

**Antibióticos** - Os antibióticos empregados foram obtidos dos seguintes Laboratórios Farmacêuticos: cefoperazona - Pfizer S.A.; cefoxitina - Merck Sharp & Dohme; cefamandol, cefazolina, cefalexina e cefaloridina - Eli Lilly.

#### Resultados

A Tabela 1 apresenta as concentrações inibitórias mínimas capazes de impedir o crescimento de 50 e 90% das amostras de cada grupo e a faixa de concentração em que cada droga foi eficaz.

Como pode ser observado, cefoperazona e cefamandol mostraram atividade comparável frente aos gêneros *Enterobacter* e *Citrobacter*, que foram pouco inibidos pelas demais cefalosporinas. Todos os antibióticos apresentaram boa atividade frente às amostras pertencentes aos gêneros *Shigella*, *Escherichia* e *Klebsiella*, sendo a cefaloridina um pouco menos eficaz em inibir as amostras pertencentes aos dois últimos gêneros. Cefoxitina foi bastante ativa frente às amostras de *Salmonella* estudadas. Cefalexina, cefamandol e cefazolina apresentaram atividades semelhantes porém, inferiores à apresentada por cefoxitina, enquanto cefoperazona e cefaloridina foram pouco ativas frente a estas amostras.

Cefoperazona, cefoxitina e cefamandol foram mais ativas contra as amostras de *Proteus mirabilis* do que cefazolina, cefalexina e cefaloridina sendo esta última a menos ativa. Com relação às amostras de *Proteus morganii*, cefoperazona e cefamandol apresentaram atividade semelhante e superior à apresentada por cefoxitina, sendo as demais cefalosporinas inativas. Cefoperazona exibiu atividade ligeiramente superior às apresentadas por cefoxitina e cefamandol frente às amostras de *Serratia* que se mostraram resistentes às demais drogas testa-

Tabela I - Concentrações inibitórias mínimas da cefoperazona e cinco cefalosporinas capazes de inibir 50 e 90% das amostras testadas

Amostras	Nº	Cefoperazona		Cefoxitina		Cefamandol		Cefazolina		Cefalexina		Cefaloridina	
		50% (variação) ug/ml	90% (variação) ug/ml	50% (variação) ug/ml	90% (variação) ug/ml	50% (variação) ug/ml	90% (variação) ug/ml	50% (variação) ug/ml	90% (variação) ug/ml	50% (variação) ug/ml	90% (variação) ug/ml	50% (variação) ug/ml	90% (variação) ug/ml
<i>S. faecalis</i>	116	<0,1 (0,1)	1,85 (12,8)	1,07 (0,2)	1,85 (12,8)	0,26 (0,1)	2,56 (12,8)	0,70 (0,1)	2,38 (51,2)	2,74 (0,4)	6,15 (102,4)	1,73 (0,2)	13,45 (102,4)
<i>K. pneumoniae</i>	60	0,20 (0,1)	3,71 <td>1,03 (0,8)</td> <td>2,40<br (&gt;102,4)<="" td=""/><td>1,47 (0,1)</td><td>10,06<br (&gt;102,4)<="" td=""/><td>1,5 (0,4)</td><td>8,00<br (&gt;102,4)<="" td=""/><td>2,68 (1,6)</td><td>5,94<br (&gt;102,4)<="" td=""/><td>8,00 (0,4)</td><td>38,40<br (&gt;102,4)<="" td=""/></td></td></td></td></td>	1,03 (0,8)	2,40 <td>1,47 (0,1)</td> <td>10,06<br (&gt;102,4)<="" td=""/><td>1,5 (0,4)</td><td>8,00<br (&gt;102,4)<="" td=""/><td>2,68 (1,6)</td><td>5,94<br (&gt;102,4)<="" td=""/><td>8,00 (0,4)</td><td>38,40<br (&gt;102,4)<="" td=""/></td></td></td></td>	1,47 (0,1)	10,06 <td>1,5 (0,4)</td> <td>8,00<br (&gt;102,4)<="" td=""/><td>2,68 (1,6)</td><td>5,94<br (&gt;102,4)<="" td=""/><td>8,00 (0,4)</td><td>38,40<br (&gt;102,4)<="" td=""/></td></td></td>	1,5 (0,4)	8,00 <td>2,68 (1,6)</td> <td>5,94<br (&gt;102,4)<="" td=""/><td>8,00 (0,4)</td><td>38,40<br (&gt;102,4)<="" td=""/></td></td>	2,68 (1,6)	5,94 <td>8,00 (0,4)</td> <td>38,40<br (&gt;102,4)<="" td=""/></td>	8,00 (0,4)	38,40 
<i>S. enteritidis</i>	52	19,87 (0,1)	36,41 (51,2)	1,07 (0,8)	1,57 (3,2)	9,8 (0,1)	22,08 (102,4)	8,73 (0,8)	12,76 (102,4)	4,69 (3,2)	9,82 (25,6)	56,08 (1,6)	>102,4 
<i>Y. Enterocolitica</i>	31	<0,1 (0,1)	<0,1 (0,2)	1,11 (0,8)	3,12 <td>40,1 (0,1)</td> <td>&lt;0,1 (0,8)</td> <td>0,59 (0,2)</td> <td>1,04 (12,8)</td> <td>2,25 (0,8)</td> <td>3,20 (51,2)</td> <td>1,28 (0,8)</td> <td>2,72<br (&gt;102,4)<="" td=""/></td>	40,1 (0,1)	<0,1 (0,8)	0,59 (0,2)	1,04 (12,8)	2,25 (0,8)	3,20 (51,2)	1,28 (0,8)	2,72 
<i>Enterobacter</i>	44	<0,1 (0,1)	0,61 (12,8)	>102,4 (0,8)	>102,4 <td>0,51 (0,1)</td> <td>2,57<br (&gt;102,4)<="" td=""/><td>23,04 (0,8)</td><td>&gt;102,4<br (&gt;102,4)<="" td=""/><td>32,58 (3,2)</td><td>&gt;102,4<br (&gt;102,4)<="" td=""/><td>&gt;102,4 (1,6)</td><td>&gt;102,4<br (&gt;102,4)<="" td=""/></td></td></td></td>	0,51 (0,1)	2,57 <td>23,04 (0,8)</td> <td>&gt;102,4<br (&gt;102,4)<="" td=""/><td>32,58 (3,2)</td><td>&gt;102,4<br (&gt;102,4)<="" td=""/><td>&gt;102,4 (1,6)</td><td>&gt;102,4<br (&gt;102,4)<="" td=""/></td></td></td>	23,04 (0,8)	>102,4 <td>32,58 (3,2)</td> <td>&gt;102,4<br (&gt;102,4)<="" td=""/><td>&gt;102,4 (1,6)</td><td>&gt;102,4<br (&gt;102,4)<="" td=""/></td></td>	32,58 (3,2)	>102,4 <td>&gt;102,4 (1,6)</td> <td>&gt;102,4<br (&gt;102,4)<="" td=""/></td>	>102,4 (1,6)	>102,4 
<i>P. mirabilis</i>	50	0,46 (0,2)	3,84 (12,8)	1,24 (1,6)	1,6 (6,4)	0,45 (0,1)	1,28 (3,2)	2,54 (1,6)	5,12 (102,4)	6,91 (6,4)	12,03 (>102,4)	5,87 (3,2)	43,89 
<i>P. aeruginosa</i>	51	0,55 (0,1)	4,42 (12,8)	5,89 (1,6)	12,09 <td>0,65 (0,1)</td> <td>12,18<br (&gt;102,4)<="" td=""/><td>&gt;102,4 (6,4)</td><td>&gt;102,4 (&gt;102,4)</td><td>&gt;102,4 (12,8)</td><td>&gt;102,4 (&gt;102,4)</td><td>&gt;102,4 (51,2)</td><td>&gt;102,4 (102,4)</td></td>	0,65 (0,1)	12,18 <td>&gt;102,4 (6,4)</td> <td>&gt;102,4 (&gt;102,4)</td> <td>&gt;102,4 (12,8)</td> <td>&gt;102,4 (&gt;102,4)</td> <td>&gt;102,4 (51,2)</td> <td>&gt;102,4 (102,4)</td>	>102,4 (6,4)	>102,4 (>102,4)	>102,4 (12,8)	>102,4 (>102,4)	>102,4 (51,2)	>102,4 (102,4)
<i>Serratia</i>	12	0,73 (0,2)	92,20 <td>6,4 (3,2)</td> <td>&gt;102,4 (2,4)</td> <td>6,4 (1,6)</td> <td>&gt;102,4 (102,4)</td> <td>&gt;102,4 (51,2)</td> <td>&gt;102,4 (&gt;102,4)</td> <td>&gt;102,4 (25,6)</td> <td>&gt;102,4 (&gt;102,4)</td> <td>&gt;102,4 (25,6)</td> <td>&gt;102,4 (&gt;102,4)</td>	6,4 (3,2)	>102,4 (2,4)	6,4 (1,6)	>102,4 (102,4)	>102,4 (51,2)	>102,4 (>102,4)	>102,4 (25,6)	>102,4 (>102,4)	>102,4 (25,6)	>102,4 (>102,4)
<i>Citrobacter</i>	13	0,12 (0,1)	5,01 (6,4)	19,21 (0,8)	>102,4 <td>0,33 (0,1)</td> <td>21,77 (51,2)</td> <td>5,60 (0,8)</td> <td>&gt;102,4<br (&gt;102,4)<="" td=""/><td>11,74 (3,2)</td><td>47,37 (&gt;102,4)</td><td>38,41 (1,6)</td><td>&gt;102,4<br (&gt;102,4)<="" td=""/></td></td>	0,33 (0,1)	21,77 (51,2)	5,60 (0,8)	>102,4 <td>11,74 (3,2)</td> <td>47,37 (&gt;102,4)</td> <td>38,41 (1,6)</td> <td>&gt;102,4<br (&gt;102,4)<="" td=""/></td>	11,74 (3,2)	47,37 (>102,4)	38,41 (1,6)	>102,4 
<i>Pseudomonas</i>	102	2,77 (0,8)	18,21 <td>&gt;102,4 (6,4)</td> <td>&gt;102,4<br (&gt;102,4)<="" td=""/><td>&gt;102,4 (3,2)</td><td>&gt;102,4 (102,4)</td><td>&gt;102,4 (6,4)</td><td>&gt;102,4 (&gt;102,4)</td><td>&gt;102,4 (6,4)</td><td>&gt;102,4 (&gt;102,4)</td><td>&gt;102,4 (0,8)</td><td>&gt;102,4<br (&gt;102,4)<="" td=""/></td></td>	>102,4 (6,4)	>102,4 <td>&gt;102,4 (3,2)</td> <td>&gt;102,4 (102,4)</td> <td>&gt;102,4 (6,4)</td> <td>&gt;102,4 (&gt;102,4)</td> <td>&gt;102,4 (6,4)</td> <td>&gt;102,4 (&gt;102,4)</td> <td>&gt;102,4 (0,8)</td> <td>&gt;102,4<br (&gt;102,4)<="" td=""/></td>	>102,4 (3,2)	>102,4 (102,4)	>102,4 (6,4)	>102,4 (>102,4)	>102,4 (6,4)	>102,4 (>102,4)	>102,4 (0,8)	>102,4 
<i>S. aureus</i>	57	2,11 (0,8)	13,77 (102,4)	2,74 (1,6)	29,47 <td>0,37 (0,1)</td> <td>5,04 (25,6)</td> <td>0,38 (0,1)</td> <td>11,91 (102,4)</td> <td>3,06 (1,6)</td> <td>&gt;102,4<br (&gt;102,4)<="" td=""/><td>&lt;0,1 (0,1)</td><td>3,44 (12,8)</td></td>	0,37 (0,1)	5,04 (25,6)	0,38 (0,1)	11,91 (102,4)	3,06 (1,6)	>102,4 <td>&lt;0,1 (0,1)</td> <td>3,44 (12,8)</td>	<0,1 (0,1)	3,44 (12,8)
<i>S. epidermidis</i>	40	1,03 (0,2)	10,4 (25,6)	1,37 (0,4)	>102,4 <td>0,23 (0,1)</td> <td>15,36 (25,6)</td> <td>0,19 (0,1)</td> <td>12,8 (51,2)</td> <td>1,55 (0,1)</td> <td>76,8 (102,4)</td> <td>&lt;0,1 (0,1)</td> <td>7,68 (12,8)</td>	0,23 (0,1)	15,36 (25,6)	0,19 (0,1)	12,8 (51,2)	1,55 (0,1)	76,8 (102,4)	<0,1 (0,1)	7,68 (12,8)

das. Cefoperazona foi o único, dos antibióticos testados, capaz de inibir as amostras pertencentes ao gênero *Pseudomonas*. Com relação às amostras de *Staphylococcus*, cefaloridina foi a mais eficaz, seguindo-se em ordem decrescente de atividade cefamandol, cefazolina, cefoperazona, cefalexina e cefoxitina.

## Discussão

Os resultados do presente estudo são semelhantes aos referidos por outros autores(4,5) e confirmam o amplo espectro de ação da cefoperazona(2,4), novo agente antimicrobiano. Deve ser destacado que cefoperazona, ao contrário das demais cefalosporinas investigadas, apresentou excelente atividade contra as amostras de *P. aeruginosa*. Com relação aos demais germens investigados, a atividade da cefoperazona foi semelhante ou superior a das outras cefalosporinas. É interessante notar que as amostras de *S. enteritidis* foram relativamente resistentes a cefoperazona e a outras cefalosporinas, com exceção da cefoxitina. Este último antibiótico inibiu 90% das amostras na concentração de 32ug/ml.

## Referências Bibliográficas

- Jacobson, J.A.; Santos, J.I. & Palwer, W.M. - Clinical and bacteriological evaluation of cefoxitin therapy in children. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 16:183-185, 1979.
- Matsubara, N.; Minami, S.; Muracka, T.; Saikawa, I. & Mitsuhashi, S. - In vitro antibacterial activity of cefoperazone (T-1551), a new semi-synthetic cephalosporin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 16:731-735, 1979.
- Neu, H.C. - Cefoxitin, a semi-synthetic cephamycin antibiotic: antibacterial spectrum and resistance to hydrolysis by gram-nega-

- tive beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 6:170-176, 1974.
4. Neu, H.C.; Fu, K.P.; Aswapeeke, N.; Aswapeeke, P. & Kung, K. - Comparative activity of  $\beta$ -lactamase stability of cefoperazone, a piperazine cephalosporin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 16:150-157, 1979.
  5. Onishi, H.R.; Daoust, D.R.; Zimmerman, S.B.; Hendlin, D. & Stapley, E.O. - Cefoxitin, a semi-synthetic cephemycin antibiotic: resistance to beta-lactamase inactivation. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 5:38-48, 1974.
  6. Trabulsi, L.R.; Almada, N.P.S. & Marques, L.R.M. - Inhibitory concentrations of cefoperazone, cefazolin, cefamandole, cephaloridine and cefoxitin for 300 gram-negative clinical isolates. *Clin. Ther.*, 3(special issue):145-148, 1980.

## INFORMAÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA SBM

V Simpósio Nacional de Fermentação  
SBM-UFV Viçosa, 26 a 29 de julho de 1982

O V Simpósio Nacional de Fermentação, organizado pela SBM e a Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, foi conduzido por Daison Olzany Silva (Coordenador), Antônio Luiz de Lima, Benjamin de Almeida Mendes (vice-coordenador), Célia Lúcia de L.F. Ferreira, Emílio Gomide Loures, Walter Vieira Guimarães, Arnaldo Chaer Borges, Ivanete Gomes Silveira e Regina Eugênia Pinto.

O tema central foi dedicado à fermentação etanólica e metanogênica, abrangendo 24 palestras; 27 trabalhos, sob diversos processos fermentativos, foram apresentados sob a forma de painéis. Diversos grupos de trabalho se reuniram, para cuidar dos seguintes assuntos: Estruturação de Grupo Técnico-Científico da SBM para Microbiologia Industrial; Diretrizes Gerais para o Ensino de Fermentação a Nível de Graduação; Grupo de Zymomonas; Avaliação de Simpósios Nacionais de Fermentação; Organização do VI SNF (UFCe, Fortaleza, Ce). Mais de 1.000 pessoas estiveram presentes, sendo aproximadamente 60% de estudantes.

Os anais serão produzidos pela SBM e poderão ser encomendados através de correspondência para:

Prof. Daison Olzany Silva  
Universidade Federal de Viçosa  
Departamento de Biologia Geral  
Laboratório de Microbiologia  
36570 Viçosa MG

O VI Simpósio Nacional de Fermentação será organizado pela SBM e a Universidade Federal do Ceará, em Fortaleza, Ce., no mês de agosto de 1984. Informações com: Prof. José Oswaldo Bezerra Carioca, Universidade Federal do Ceará, 60000 Fortaleza, CE.

Já foi decidida a realização do VII Simpósio Nacional de Fermentação, para o ano de 1986, em Londrina, Paraná. Os interessados em contatos deverão dirigir-se a Kazuko Ogido, Fundação Universidade Estadual de Londrina, 86100 Londrina, Paraná.

Read, S.E. & Zabriskie, J.B., eds. - Streptococcal diseases and the immune response. New York, Academic Press, 830p., 1980. US\$ 45.00.

Trinidad, durante os últimos 25 anos, sofreu 5 grandes surtos epidêmicos de glomerulonefrite difusa aguda pós-estreptocócica. Em 1977 foi a sede de uma Conferência Internacional sobre "estreptococias e a resposta imunológica", que se estendeu de 7 a 11 de novembro, em 10 simpósios cujos relatórios integrais são agora publicados. A Conferência teve o patrocínio e foi feita sob os auspícios de várias agências e institutos de alto nível como o "National Institute of Allergy and Infectious Diseases" e a Universidade Rockefeller, o que demonstra o apreço em que a Conferência se realizou. Mais de 60 investiga-

dores, nomes da maior significação no campo, apresentaram trabalhos. Cerca de 60% de suas páginas estão dedicadas à FR, GNDA, ao agente etiológico bacteriano e às condições epidemiológicas; os restantes 40%, à resposta imunológica do hospedeiro como interações celulares, imunogenética, mediadores e mecanismos da injúria tissular. Há 3 índices: a) dos investigadores e seus respectivos institutos de origem; b) dos títulos das apresentações por simpósio e c) remissivo, com cerca de 250 citações de questões abordadas.

A impressão é nítida em fino papel "couché": letras, gráficos, foto e eletromicrografias, perfeitas.

Trata-se, portanto, da última de uma série de grandes conferências que periodicamente a comunidade científica internacional tem feito sobre *Streptococcus*, editadas, anteriormente, por McCarty (1954), Carravano (1968), Wannamaker & Madsen (1972) e Skinner & Quesnel (1978).

Dadas as características que acabam de ser referidas seria óbvio dizer algumas generalidades em recomendação a tão importante livro. Portanto, pareceu interessante ao revisor ressaltar alguns aspectos concretos num processo inevitável de escolha.

Aos aspectos de investigação sobre o agente etiológico e sobre as manifestações da resposta imunológica se juntam outros sobre as condições epidemiológicas, numa abordagem integral envolvendo agente + hospedeiro + meio. São também discutidas questões de importância decisiva na abordagem prática da assistência ao paciente e à comunidade, como: 1) a proficiência metodológica dos laboratórios de bacteriologia, recomendando-se a instalação de um autorizado "Laboratório Nacional de Referência" em Instituto capaz, cuja função seria a de assistir aos "laboratórios regionais", na manutenção de um contínuo controle de padrão de trabalho; 2) encaminhamento "político" da execução de programas de campo que, economicamente, e sem confrontação com as prioridades estabelecidas pelas autoridades sanitárias do país, podem ser "enxertadas" e dinamizadas nas agências de saúde pública já existentes.

Não faz tanto tempo se duvidava que as estreptococias tivessem nível importante nos países em desenvolvimento. Hoje se sabe que elas são, nesses países, tão importantes quanto o eram há algumas décadas em países desenvolvidos.

Desde o século passado, quando se iniciou a "fase heróica" da microbiologia até mesmo os anos 60, se enfatizava a importância essencial dos agentes etiológicos microbianos como "causa específica" em quase sinônímia de "causa única". Hoje se sabe, que um melhor "nível de vida\*" por si só tem importância decisiva favorável como fator ambiental na prevalência, incidência e gravidade das doenças infecções inclusive as estreptococias, de modo que aquela atual boa situação nos países desenvolvidos é atribuída mais a essas circunstâncias ambientais, do que a uma diminuição da virulência do estreptococo, e também não exclusivamente às medidas da chamada medicina tecnológico-científica.

A diferenciação entre portador-são de Grupo A e paciente com angina de Grupo A, ainda que de fundamental importância, continua em aberto. As dificuldades metodológicas em bacteriologia quantitativa fizeram nascer, em passado recente, a esperança de que uma elevação de anti-

---

\* Boas condições de higiene geral e nutrição, inexistência de excessivas aglomerações nas moradias, etc.

corpos específicos traduzisse com fidelidade uma reação do hospedeiro contra o microrganismo em processo de doença infecciosa. Ultimamente, porém, verificou-se que, se o portador-são de Grupo A desenvolve angina a vírus, o que não é raro, os anticorpos anti-estreptococos podem elevar-se em "prova experimental" (mas falsa!) de processo infeccioso a estreptococos ("booster"? anamnéstica?); aliás a ASO pode elevar-se mesmo quando a cultura para Grupo A for negativa\*\*.

Continua em debate o tipo de relacionamento entre a nefrite crônica, de prognóstico reservado (dos adultos) e a nefrite aguda, em princípio, de bom prognóstico (das crianças). Aportes observacionais e discussões conceituais foram feitas, mas não foi possível estabelecer um entendimento definitivo a respeito.

"A seqüência dos eventos que ocorrem desde a infecção pelo tipo nefritogênico até a doença renal ainda é controvertida apesar dos numerosos estudos clínicos, imunobiológicos, patológicos, bioquímicos e cinéticos; a natureza do antígeno, os fatores do hospedeiro, os mediadores da inflamação, o papel relativo da imunologia humorai e celular e a variabilidade da manifestação clínica, tudo permanece um enigma".

"Aquelas alterações que consistiram em esclerose glomerular sem proliferação foram interpretadas geralmente como uma forma de cicatrização e não como prova de cronicidade".

"Enquanto que alguns resolveram interpretar a proteinúria e a filtração glomerular reduzida como prova de dano renal irreversível de doença em progressão, outros parecem considerar estes aspectos simplesmente como resíduos de um episódio agudo".

Fica interessante saber que das amostras (cepas) de Tipo M-12 (Tipo "de faringite") somente aquelas capazes de lançarem ao exterior certa proteína nefritogênica é que exercem nefritogenicidade.

Chama-se a atenção para a diferença de resposta ao anticorpo anti-A entre pacientes com persistente doença reumática valvar e pacientes reumáticos sem cardite.

O relacionamento específico da FR à infecção do tecido faringeano, particularmente as amigdalas, é enfatizado.

Apesar do grande acervo de dados que afirmam o papel de mecanismos de imunologia humorai na FR, pouco se sabe sobre o papel da imunologia celular nessa doença.

A resposta celular dos reumáticos foi menor com as membranas isoladas daquelas amostras não associadas a FR. Isto sugere, que as amostras associadas à FR possuem抗ígenos que as associadas à GNDA não possuem, ou que aquelas os possuem mais do que estas.

Na FR as respostas imunológicas específicas são reguladas por cer-

\*\* Considerando-se axiomático que a bactéria em processo de doença infecciosa deve encontrar-se em número significativamente mais elevado do que no estado de portador, será provavelmente preciso insistir na bacteriologia quantitativa para reconhecer o nível de diferenciação: como a "unidade viável" (base da "contagem de colônias") pode variar no grupamento bacteriano estreptocócico, talvez se desse recorrer a uma avaliação fisiológica global dos indivíduos bacterianos e não à "contagem de colônias".

tos genes. A inoculação experimental em animais de laboratório (coelhos) produz modelos experimentais de alguma forma úteis no estudo das doenças humanas. Mas também, colateralmente, tornou possível a seleção científica de linhagens de coelhos, mesmo em 2 ou 3 gerações, que respondem muito bem aos antígenos de Grupo com produção de soros para grupagem de alta sensibilidade (teor elevado de anticorpos específicos, antipolissacáride de Grupo).

A susceptibilidade à FR está associada a um particular alo-antígeno (iso-antígeno) nas células B. Apresenta mecanismos imunológicos de auto-agressão em resposta intensa humoral e celular àqueles antígenos estreptocócicos que compartilham de vários determinantes antigênicos nos tecidos de mamíferos, mas nem todos concordam com o grau de importância desse mimetismo em biologia molecular.

Ainda que a maioria das seqüelas não-piogênicas em Trinidad seja de GNDA pós-estreptococcia de pele, houve casos de FR; as formas clínicas de ambas as doenças foram as clássicas. As amostras de estreptococos de Trinidad não têm sido fáceis de classificar, de acordo com o que habitualmente acontece na Europa e noutras partes do mundo. A amostra "M-41", implicada com maior freqüência nos casos de FR, preferiu produzir infecções de pele, e não de faringe, ao passo que as amostras nefritogênicas (M-1, M-60, M-50, no estudo) foram isoladas aproximadamente com a mesma freqüência tanto da pele como da faringe. De modo que a dicotomia que se tem estabelecido cada vez melhor: 1) pele-nefrite, 2) faringe-febre reumática, aparentemente não ficou nítida em Trinidad.

Se em Trinidad a FR segue infecções de faringe ou pele é difícil de confirmar mas parece muito provável, a partir de falta de prova ao contrário, que a infecção de pele deve ocasionalmente ser o foco primário da infecção para a FR. Apesar do intenso estudo dessa doença em Trinidad, os tipos M responsáveis pela FR e o local habitual de infecção estreptocócica que a precede, ainda precisam ser bem estudados.

Houve uma extensão considerável no número de tipos M com reações T em comum. A identificação de tipos M de amostras de países tropicais ou subtropicais sempre constituirão um problema, a menos que haja um programa ativo e contínuo de produção de soros anti-M. Neste volume estão descritos os resultados das mais recentes investigações sobre os diferentes tipos de "MAP" ("M Associated Protein"). Estão se tornando cada vez mais seguras as provas de que essa proteína (antigênica) associada à proteína M é uma das várias características que subdividem o Grupo A em categorias patogênicas, em confirmação científica da impressão dos primeiros tempos da bacteriologia: o *Strep. pyogenes* é um complexo de linhagens (Tipos) bem definidas sob o ponto de vista de sua múltipla patogenicidade.

O mínimo que se pode dizer sobre o maravilhoso trabalho apresentado por Maxted com relação aos Tipos M do Grupo A, sua associação às diversas estreptococias e sua distribuição geográfica, é que foi documentado, apresentado e comentado como só esse grande bacteriologista de nosso tempo poderia fazê-lo.

Para terminar esta breve revisão e citações de obra tão significativa, nada mais apropriado do que citar as palavras de Krause num dos capítulos ("Inquérito cartográfico sobre a topografia estreptocócica"): "Astutos e sub-reptícios, os estreptococos prosperam em comportamento reticente. Eles continuarão a fascinar os cientistas enquanto perdurar o mistério da febre reumática e da nefrite".

Tais informações poderão provir de estudos nos países em desenvolvimento e, evidentemente, a facilidade de acesso a serviços de laboratório de alto padrão para diagnóstico bacteriológico e sorológico, é essencial.

Carlos Solé-Vernin  
Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto  
Deptº de Parasitologia  
Campus de Ribeirão Preto  
14100 Ribeirão Preto SP

Fraenkel-Conrat, H. & Wagner, R.R., eds. - *Comprehensive virology*. Vol. 17 - Methods used in the study of viruses. New York, Plenum Press, 463p., 1981. US\$ 39.50.

A série *Comprehensive virology* foi organizada pelos seus editores Fraenkel-Conrat e Wagner, para servir como uma crônica dos recentes avanços no campo da virologia e basicamente acha-se organizada nos seguintes grandes tópicos: vol. 1, Catalogação; vols. 2-7, Reprodução; vols. 8-11, Regulação e genética; vols. 15, 16, Intereração vírus/hospedeira; vols. 5, 6 e 13, Estrutura; vols. 12, 14 e 17, Tópicos adicionais.

O presente volume, o de 17, tem por título "Métodos usados no estudo dos vírus", e compõe-se de 7 capítulos, apresentados por diferentes autoridades, que discutem as tecnologias ora disponíveis, para estudar os vírus, sob os aspectos bioquímico, biofísico e imunológico. Obviamente, pelas limitações de espaço, e tão pouco, por não ser esta a finalidade da obra, os tópicos são apresentados em suas essências, sem entrar em detalhes complexos, quer teóricos ou instrumentais. Dentro de cada capítulo, as metodologias são apresentadas juntamente com os princípios teóricos nos quais se assentam, com exemplos dos resultados obtidos. Tal tipo de abordagem é particularmente interessante aos virologistas e biólogos em geral, que não se acham especializados nessas áreas, pois podem ter uma idéia razoável sobre as mesmas. Para aqueles que eventualmente queiram iniciar-se nessa especialidade, por outro lado, constituir-se-ia em um excelente guia introdutório e ponto inicial das consultas bibliográficas.

A obra inicia-se com o capítulo sobre os métodos biofísicos, abordado de maneira elegante e autoritativo pelo Dr. Max Lauffer. Acham-se discutidos tópicos como viscosidade, difusão, centrifugação, cromatografia, eletroforese, dispersão de luz e termina com uma pequena apresentação da teoria da microscopia eletrônica. Como um prosseguimento natural, aparece o artigo de Fisher, introduzindo o leitor aos princípios gerais de preparo de espécimes para microscopia eletrônica-contraste negativa, espalhamento de ácido nucleico, métodos citológicos, etc., e uma avaliação crítica dos resultados. As bases teóricas e os resultados da aplicação das técnicas de difração de raio-X e de neutros são apresentadas por Jocrot, que demonstra como os conhecimentos sobre a estrutura e arquitetura de muitos vírus foram consideravelmente enriquecidas através desses métodos. A difração de raio-X tem contribuído para a compreensão das interações proteína-proteína, enquanto a dispersão dos neutros nos tem fornecido dados sobre o interior das partículas virais. Vários exemplos da aplicação

dessa metodologia em vírus isométricos e alongados são apresentados.

A serologia tem sido o método, senão o mais, um dos mais importantes para a diagnose das viroses. van Regenmortel discute com muita competência os métodos imunológicos, com especial ênfase aos princípios nos quais se fundamentam os diferentes testes como neutralização, aglutinação, precipitação, fixação de complemento, anticorpos marcados e imunomicroscopia eletrônica. As aplicações da serologia em virologia, desde diagnose, avaliação de vacinas, estudos sobre a estrutura do vírion, replicação dos vírus, e finalmente, na taxonomia, são comentadas.

Fraenkel-Conrat demonstra os tipos de modificações químicas que podem sofrer os vírus, e quais os reagentes empregados (tais como os agentes aciladores, aldeídos e cetonas, halógenos, ácido nitroso, etc.). Discorre ele também sobre os tipos de informações que tem sido podido obter às custas de tais modificações, tais como localização de componentes virais, inativação e mutagênese, substituição isomórfica para difração de raio-X.

Os dois últimos capítulos referem-se à fotobiologia dos vírus, de RNA e DNA, respectivamente apresentados por Murphy & Gordon e Day. Incluem-se além da metodologia, discussões sobre a fotoreativação e fenômenos de reparo dos ácidos nucleicos. É importante ressaltar que além de dados sobre a replicação do vírus, esses estudos fotobiológicos podem fornecer informações sobre a conformação do genoma e do vírion.

Elliot W. Kitajima  
Universidade de Brasília  
Deptº de Biologia Vegetal  
Campus Universitário  
70910 Brasília DF

**Malloch, D. - Moulds: their isolation, cultivation and identification.**  
Toronto, Toronto Press, 97p., 1981. US\$ 13.95.

Trata-se de texto introdutório de micologia. Esta característica está de acordo com o objetivo do autor, uma vez que a sua meta principal era a produção de um manual que permitisse a identificação dos fungos mais comuns. O autor selecionou 60 dos gêneros de fungos mais comumente encontrados e montou um conjunto de chaves para identificá-los. São chaves artificiais, sem qualquer preocupação filogenética, porém muito práticas, o que atende também à finalidade definida por Malloch para sua obra. As ilustrações são desenhos de muito boa qualidade. Acredito tratar-se de livro muito útil ao ensino de introdução à micologia.

José Carmine Dianese  
Universidade de Brasília  
Deptº de Biologia Vegetal  
Campus Universitário  
70910 Brasília DF

Sociedad Mexicana de Micología. Boletín, 15:1-252, Dec. 1981.  
 Sociedad Mexicana de Micología. Boletín, 16:1-161, Dec. 1981.

É uma revista científica, de publicação anual, no mês de dezembro e contém contribuições científicas originais de trabalhos micológicos, especialmente nas áreas de levantamentos, taxonomia, ecologia, fitopatologia e bioquímica de fungos.

A comissão editorial da revista para os anos de 1981-1982, é constituída por Dr. Gastón Guzmán, Amanda Trujillo, Guadalupe Vidal e Jovita Martínez e possui ainda um conselho deliberativo para assessoramento.

São publicados trabalhos em espanhol, inglês, francês e português de acordo com instruções publicadas na contra-capa da revista e entregues até 30 de junho de cada ano.

Os artigos são ilustrados com desenhos ou fotografias científicas de boa qualidade.

A revista inclui um apêndice intitulado "Notícias e Comentários", no qual são fornecidas informações sobre Congressos, simpósios, exposições, herbários, necrologia, cursos - atividades da Universidade do México, Teses e Revisões bibliográficas sobre fungos e líquens.

Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología é portanto uma revista de bom nível técnico, uma oportunidade principalmente para micologistas mexicanos e latino-americanos para divulgarem seus trabalhos de pesquisa.

Vera Lúcia R. Bononi  
 Instituto de Botânica  
 Caixa Postal 4005  
 01000 São Paulo SP

Rocklin, R.E. - Clinical immunology reviews. New York, Press Release, vol. 1, 1981. US\$ 45.00 per volume (total 4 vols.)

Foi recentemente lançado um novo periódico destinado a apresentar, sob forma de "revisões", os recentes avanços no campo da imunologia básica. Embora destinado à atualização de imunologistas clínicos, certamente oferecerá, a pesquisadores de outras áreas, a oportunidade de manterem-se informados sobre assuntos de grande interesse e rápido desenvolvimento, dentro do campo da imunologia. Distingue-se dos outros periódicos do gênero, pela rapidez com que essas informações serão transmitidas. Normalmente, um trabalho científico leva de seis a nove meses para ser publicado e um ano ou mais, no caso de revisões. Com a forma de impressão fotográfica adotada por Clinical Immunology Reviews, esse prazo será reduzido a 10-12 semanas, o que garantirá sua real atualidade.

Cada volume conterá 3 ou 4 revisões, realizadas por pesquisadores de renome, convidados para abordar, em profundidade, assuntos de sua especialidade. No primeiro volume J. Ellner revê os vários sistemas de células supressoras e sua importância para a imunologia clínica.

R. Henerman aborda a caracterização e o papel das células NK (natural killer cells) na resistência do hospedeiro. Os Drs. Lohr e Snyderman analisam os mecanismos e implicações clínicas dos defeitos de quimiotaxia.

As primeiras evidências experimentais da existência de células supressoras datam de 10 anos atrás. Mas, foi nos últimos 4 anos que ocorreu uma verdadeira explosão de informações sobre o papel imunoregulador das células supressoras humanas. Para se ter uma idéia, das 304 referências selecionadas, apenas 34 são anteriores a 1977. Tal interesse é motivado pela possibilidade de que, com uma melhor compreensão dos mecanismos imunoreguladores e da base de seus desvios, seus efeitos possam vir a ser controlados. A presente revisão compreende uma parte básica, na qual, são analisadas as várias subpopulações de linfócitos T humanos com função imunoreguladora e os métodos atualmente utilizados na sua caracterização. A parte introdutória é complementada por um apanhado sobre a função supressora de macrófagos e células produtoras de prostaglandinas. As seções seguintes são dedicadas à imunoregulação em infecções crônicas, doenças autoimunes, síndromes de deficiências imunológicas e tumores.

As células NK constituem outro assunto que vem atrairindo a atenção crescente de imunologistas, oncologistas e microbiologistas. A existência das células NK foi revelada em estudos nos quais se verificou que células linfoides de indivíduos normais apresentavam atividade citotóxica contra células tumorais e células infectadas por vírus. Sua importância na resistência aos tumores foi evidenciada pela capacidade de camundongos atípicos (nude mice) ou timectomizados resistirem ao crescimento de certos tumores, na ausência de linfócitos T. Inicialmente a caracterização das células NK baseava-se unicamente nessa característica funcional de mediar reações de citotoxicidade, contra certas células alvo, prescindindo de imunização prévia. A presente revisão contém 279 referências recentes e condensa os esforços desprendidos na sua caracterização, seu papel na resistência a tumores e infecções microbianas e possíveis implicações em imunoterapia.

O terceiro tema, selecionado para esse 1º volume, refere-se a defeitos de quimiotaxia de leucócitos humanos. O acúmulo de células inflamatórias no local de penetração do antígeno é um importante fator para a proteção contra infecções microbianas e provavelmente contra o crescimento neoplásico. Nesse artigo, são revistos os ensaios utilizados na avaliação da mobilidade celular, é apresentada uma classificação completa dos defeitos de quimiotaxia, são abordados os fatores inativadores de quimiotaxia e, finalizando, são discutidas várias proposições terapêuticas.

Para o segundo volume estão programados os seguintes assuntos: "Papel do Complemento em doenças alérgicas" (Dr. J. Gelfand), "Reação imunológica à insulina" (Dr. L. Rosenwasser) e "Doenças causadas por anticorpos anti-receptores" (Dr. J. Flier).

Chloé C. Musatti  
Escola Paulista de Medicina  
Deptº de Imunologia  
Rua Botucatu, 862  
04023 São Paulo SP