

Revista de Microbiologia



SBM

Sociedade
Brasileira de
Microbiologia

São Paulo — Brasil

Volume 13 Número 4 Out.-Duz. 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" (12.ª edição, AIBS, 1964). Os símbolos genéticos devem seguir, essencialmente, as recomendações de Demerec & col. (Genetics, 54:61, 1966). Abreviaturas 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 nano (n) e pico (p), ao invés de milímicro ($m\mu$) micromicro ($\mu\mu$). Comprimentos devem ser expressos em micrômetro (μm ; $10^{-6} m$), ao invés de micro (μ); nanômetro (nm ; $10^{-9} m$), ao invés de milímicro ($m\mu$); e Angströms (\AA ; $10^{-10} m$). Partes por milhão (ppm) devem ser expressas como microrganismos por milímetros ($\mu g/ml$) ou microlitros por litro ($\mu l/litros/litro$). 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, a 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) o(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 o 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 da 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 e 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 de trabalho, nome do periódico (abreviado de acordo com o World Medical Periodicals), número do volume, número do fascículo (quando desejado: colocado entre parênteses), número da primeira e da última página do artigo, e ano da publicação.

Exemplo:

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

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

Citações de livros devem ter a seguinte ordem: autor(es), título, edição, local, editoras e data. Exemplo:
Miller, S. E. — A textbook of clinical pathology, 6th ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1960.

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

TABELAS — Devem ser numeradas em árabe e datilografadas em páginas separadas. Os dados devem ser arranjados de maneira que colunas de material idêntico sejam lidas perpendicular e não transversalmente. Cabecinhos 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 rearranjo. Nenhuma parte do gráfico deverá ser datilografada, devendo ser usado um e o mesmo nomograma. As fotografias de ilustrações a traço devem ser feitas em papel de alto contraste apropriado. É recomendável submeter gráficos e desenhos no dobro da impressão final da Revista, prevendo-se todos os elementos da figura para as escalas de redução. Fotografias com reticulas devem ser feitas em papel brillante, com contraste adequado para a reprodução na escala 1:1, observados os espaços máximos disponíveis na Revista e seus submúltiplos, reservando-se espaço suficiente para a legenda. Sempre que houver escala de aumento ou redução, esta deverá ser superposta ou desenhada diretamente na fotografia ou figura. Ver instruções sobre legendas, notas de rodapé, etc. sob TABELAS. Proteja as ilustrações durante o trânsito, com uma folha de papelão.

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

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



Período 2:

REVISTA DE MICROBIOLOGIA - SBM

Av. Prof. Lineu Prestes, 1374

Cid. Universitária - USP

05508-900 — 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.

Impressão Gráfica Editora Hamburg Ltda.

Sociedade Brasileira de Microbiologia

Diretoria	Presidente João S. Furtado Instituto de Botânica Caixa Postal 4005 01000 São Paulo SP	Secretário Geral Maria Therezinha Martins CETESB Av. Prof. Frederico Hermann Jr., 345 05459 São Paulo SP
------------------	---	--

Vice-Presidente	Paulo Pinto Gonçalves 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 agrémier 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.

EMBRABIO - Empresa Brasileira de Biotecnologia e Representações Ltda.

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
Dep. de Microbiologia - ICB II - USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 - Cid. Universitária
CEP 05508-900 - São Paulo - SP - BRASIL
Site: www.revunifcv.ebj.usp.br

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA
VOLUME 13 OUTUBRO-DEZEMBRO 1982 NÚMERO 4
REV. MICROBIOL. (S. PAULO), 13(4)

CONTEÚDO

CONTENTS

Maria Regina F. de Toledo Cleuber F. Fontes & Luiz R. Trabulsi	309 EPM - Modificação do Meio de Rugai e Araújo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H ₂ S, urease e triptofano desaminase	EPM - a modification of Rugai and Araujo medium for simultaneous test of gas production from glucose, H ₂ S, urease and tryptophan deaminase
Anastácio F. Morgado João Paulo B. Hidebrandt Tania M. Loes Hermann G. Schatzmayr & Szacha E. Cynamon	316 Surto epidêmico de hepatite A associado com uso da água contaminada	An outbreak of hepatitis A apparently associated with use of contaminated water
Maria de Lourdes M. da Silva Norma P.F. Severo Rosana Puccia Laura L.P. Costa & Luiz R. Trabulsi	325 Lisogenia entre amostras de <i>E. coli</i> entero-patogênicas isoladas em São Paulo, entre 1963 e 1981	Lysogene among enteropathogenic <i>E. coli</i> strains isolated in São Paulo between 1963 and 1981
Anete Levi & Ilvan D. Ricciardi	332 <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>jejuni</i> (<i>C. jejuni</i>): isolamento e caracterização de amostras obtidas em galinhas, na cidade do Rio de Janeiro	<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>jejuni</i> (<i>C. jejuni</i>): identification of strains isolated from chickens in Rio de Janeiro
Maria Elisabeth B. Margutti & Fernando S. da Cruz	335 Crescimento de <i>Fonsecaea pedrosoi</i> em meio quimicamente definido	A minimum chemical defined medium for growing <i>Fonsecaea pedrosoi</i>

Leslie C. Benchetrit Armando A. Borges-Neto Ignácio Obadia Myrthes A. Gonzaga Richard R. Facklam & Lúcia M. Teixeira	347 Impetigo no Rio de Janeiro; estreptococos e estafilococos isolados de lesões cutâneas, nariz e garganta de crianças	<i>Impetigo in Rio de Janeiro: Streptococcal and Staphylococcal isolates from skins lesions, nose and throat in children</i>
Luiz Carlos D. Formiga Katia Regina N. dos Santos Hebe A.C. Rodrigues & Susie A. Nogueira	355 Avaliação do teste de fluorescência, em portadores cutâneos de <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	<i>Evaluation of the fluorescence test in cutaneous carriers of <i>Corynebacterium diphtheriae</i></i>
Lucila C. Ricci Antonio F.P. de Castro & Humberto de A. Rangel	359 Purificação da enterotoxina termo-estável (ST) de <i>Escherichia coli</i>	<i>Purification study thermos-table (ST) enterotoxin of <i>Escherichia coli</i></i>
Lucila C. Ricci Antonio F.P. de Castro & Humberto de A. Rangel	367 Características físicas-químicas da enterotoxina termoestável (ST) de <i>Escherichia coli</i>	<i>Physical and chemical characteristics of thermostable enterotoxin (ST) of <i>Escherichia coli</i></i>
Augusto F. da Eira	378 Tratamento de efuentes da indústria de chapas de fibras da madeira com fungos micelianos. I - Seleção das linhagens e determinação das temperaturas de incubação	<i>Mycelial fungi for fiberboard wastewater treatment. I - Selection of strains and determination of incubation temperatures</i>
Rita de C. Salomão & Adhemar Purchio	394 Atividade de substâncias de origem vegetal na inibição do crescimento e na produção de aflatoxinas por <i>Aspergillus flavus</i> e <i>A. parasiticus</i>	<i>Activity of extract of plants in the inhibition of growth and aflatoxin production of <i>Aspergillus flavus</i> and <i>A. parasiticus</i></i>
Deise P. Falcão Betty Maria de Lima Elizeth Marini & Mário T. Shimizu	402 Resistência a drogas em enterobactérias isoladas de alimentos	<i>Resistance to drugs of Enterobacteria isolated from food products</i>

Sonia P. Salzberg & Fumio Yokoya	412 Característica de crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> S50 pigmentado e suas variantes não pigmentadas	Growth characteristics of the pigmented strain <i>Staphylococcus aureus</i> S50 and its non pigmented derivatives
José S. Goldoni Urgel de A. Lima & Ismael Antonio Bonassi	418 Estudo microbiológico da fermentação lática com algumas hortaliças	Microbiological study of lactic acid fermentation with some vegetables
José S. Goldoni & Aparecida A. da Silva	433 Estudo microbiológico da produção de chucrute com repolho 'Matsukase' (<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>capitata</i> L.)	Microbiological study of sauerkraut production with cabbage's cultivar 'Matsukase' (<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>capitata</i> L.)

Informação Técnico-Científica SBM

440

EPM - MODIFICAÇÃO DO MEIO DE RUGAI E ARAUJO PARA A REALIZAÇÃO SIMULTÂNEA DOS TESTES DE PRODUÇÃO DE GÁS A PARTIR DA GLICOSE, H₂S, UREASE E TRIPTOFANO DESAMINASE

Maria Regina F. de Toledo

Deptº de Microbiologia

Escola Paulista de Medicina

Rua Botucatu, 862/39

04023 São Paulo SP, Brasil

Cleuber F. Fontes

Deptº de Microbiologia e Imunologia

UNICAMP

13100 Campinas SP, Brasil

& Luiz R. Trabulsi

Deptº de Microbiologia

Escola Paulista de Medicina

Resumo

Foi proposto um meio para a identificação de enterobactérias (meio EPM) que informa quanto aos testes de produção de gás a partir da glicose, H₂S, urease e triptofano desaminase. Utilizando 306 amostras de enterobactérias, os testes do EPM, com leitura após 20-24h de incubação, foram avaliados através de uma comparação com os testes bioquímicos dos meios convencionais, neste caso com leitura realizada nos tempos recomendados para cada teste. Para o teste de produção de gás, houve 90,2% de concordância, sendo que o meio EPM apenas não detectou produção de gás em amostras de *Proteus* e em poucas amostras de *Providencia*. Com relação ao teste de urease, houve 91,8% de correlação entre os testes nos dois meios, sendo que o meio EPM foi incapaz de detectar esta enzima, apenas, em amostras de *Citrobacter* e em 2 amostras de *Enterobacter*. O meio EPM mostrou ser mais sensível que o meio convencional (tríplice açúcar com ferro) para detectar H₂S em amostras de *Salmonella* que fermentam a lactose rapidamente; com relação às outras amostras houve 100% de concordância para este teste nos dois meios. Observou-se 100% de correlação entre os testes de triptofano desaminase no meio EPM e o de fe- nilalanina no meio convencional.

Summary

EPM - a modification of Rugai and Araujo medium for simultaneous test of gas production from glucose, H₂S, urease and tryptophan deaminase

A medium for identification of *Enterobacteriaceae* (EPM medium) informing about production of gas from glucose, H₂S, urease, and tryptophan deaminase was proposed. Using 306 *Enterobacteriaceae* strains, the tests of EPM were evaluated for accuracy as compared to the tests in the conventional media. The tests of EPM were read after 20-24h of incubation, whereas the tests in the conventional media were read according to the usual recommendation. Tests for gas production yielded a correlation of 90.2%; 20 strains of *Proteus* and 2 of *Providencia* produced small amounts of gas only in the

convencional medium. With the urease test, the correlation was 91.8%; 26 *Citrobacter* and 3 *Enterobacter cloacae* strains were urease positive only in the convencional medium. The EPM medium was more sensitive than the convencional medium (triple sugar iron agar) for detection of H₂S in prompt lactose-fermenting *Salmonella* strains; for the other strains the two media showed 100% of correlation. There was 100% of agreement for the tests of tryptophan deaminase in EPM and phenylalanine deaminase in the convencional medium.

Introdução

A reunião de dois ou mais testes bioquímicos em um único meio simplifica consideravelmente a identificação de bactérias, além de representar grande vantagem em termos econômicos. Entretanto, o requerimento básico para tal metodologia é de que seja tão precisa e digna de confiança quanto os métodos bioquímicos convencionais. Além disto, o meio deve conter informações sobre testes realmente importantes na identificação da bactéria para a qual foi proposto.

Em 1968, Rugai & Araujo (8) propuseram um meio de cultura para a identificação presuntiva de enterobactérias através dos testes de fermentação de glicose e de sacarose, produção de gás, H₂S e indol, hidrólise da uréia e desaminação do triptofano.

Objetivando introduzir o meio de Rugai & Araujo (8) em nossos laboratórios da Escola Paulista de Medicina, verificamos que o meio podia não detectar urease em enterobactérias que fermentavam a sacarose, o que foi observado com amostras de *Yersinia enterocolitica*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Serratia*. Além disto, com algumas destas amostras, o pH do meio tornava-se neutro, o que poderia sugerir uma bactéria não fermentadora de glicose. Isto ocorre devido à acidificação do meio, resultante da fermentação da sacarose, neutralizar a alcalinização proveniente da hidrólise da uréia. Observamos, também, que o método utilizado pelos autores para detectar produção de indol, em que se adiciona o reativo de Kovacs no tampão do tubo, apresentava menor sensibilidade, comparativamente ao método convencional. Considerando este dado e o fato de que a prova de fermentação de sacarose é irrelevante na identificação de enterobactérias, resolvemos eliminar este dissacarídio do meio e o reativo de Kovacs do tampão, mantendo os demais ingredientes como originalmente foi proposto (8). Além disto, o pH do meio foi alterado de 7,4 para 7,0. O meio assim modificado foi denominado EPM, sendo os testes do meio submetidos a uma extensa avaliação, através de um estudo comparativo com os testes bioquímicos convencionais, estudo este, aparentemente, não realizado por Rugai & Araujo (8).

Material e Métodos

1. Meio EPM - a) Composição e preparo do meio - Base A - Triptona, 10g; Extrato de carne, 2g; Cloreto de sódio, 5g; Fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄.5H₂O), 2g; 1-triptofano, 1g; Solução alcoólica de azul de bromotimol a 1,5%, 2ml; Ágar, 11g; Água destilada q.s.p., 1000ml.

Todos os elementos, com exceção do ágar, são adicionados à água, sendo a mistura aquecida até a dissolução dos componentes e o pH ajustado a 7,0. Em seguida adiciona-se o ágar e esteriliza-se o meio a 121°C, durante 20 minutos.

Solução B - Solução de indicador e substratos: Citrato de ferro amoniacial, 2g; Tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 2g; Glicose, 10g; Uréia, 40g; Água destilada, 85ml.

A mistura é aquecida em banho-maria à 65°C, com agitação constante, até a dissolução completa dos componentes e esterilizada à mesma temperatura, durante 1 hora.

Preparo final do meio: Base A, 1000ml; Solução B, 17,5ml.

Após resfriar a base A, a aproximadamente 65°C, adicionar a solução B com assepsia. Assepticamente, distribuir o meio em volumes de 4ml, em tubos de 12x120mm previamente esterilizados, e deixar solidificar em posição inclinada de maneira a se obter uma base de, pelo menos, 3,5cm. O meio pronto apresenta-se de cor verde.

b) *Inoculação e incubação* - Com agulha de platina, semear toda a superfície do meio e a base com uma picada central até o fundo do tubo. Incubar a 37°C durante 20 a 24 horas e fazer a leitura.

c) *Interpretação* - O meio EPM fornece, em um único tubo, informações quanto aos testes de produção de gás a partir da fermentação da glicose, H_2S , urease e 1-triptofano desaminase. A produção de gás, H_2S e urease são observadas na base do meio, enquanto que a produção de 1-triptofano desaminase é observada na superfície. As bactérias que fermentam glicose acidificam o meio na base, virando o indicador, azul de bromotimol, para amarelo. Se a fermentação da glicose ocorre com produção de gás, observa-se formação de bolhas. Quando a bactéria produz urease há alcalinização do meio e o indicador vira para azul, ou amarelo-esverdeado, neste último caso quando a reação é fraca. Quando há produção de H_2S a base do meio torna-se preta. Coloração verde-escuro na superfície indica produção de 1-triptofano desaminase.

2. *Meios convencionais* - Para o teste de produção de gás em glicose, foi empregado o meio básico utilizado para verificar fermentação de carboidratos, com tubo de Durham invertido, acrescido de 1% de glicose (3). Para o teste de H_2S , foi utilizado o tríplice açúcar com ferro-TSI (9) (Difco); para o teste de urease, o meio de uréia de Christensen (2) e para o teste de desaminação da 1-fenilalanina, o meio de fenilalanina ágar (5). O preparo e inoculação dos meios foram realizados conforme as recomendações de Edwards & Ewing (3). Os períodos de incubação foram os recomendados para cada teste (3).

3. *Amostras bacterianas* - Foram utilizadas 306 amostras pertencentes aos diferentes gêneros da família Enterobacteriaceae. conforme mostra a Tabela 1.

Resultados

1) *Correlação entre os testes do meio EPM e os testes dos meios convencionais* - Os resultados da comparação entre os testes no meio EPM (produção de gás a partir da glicose, H_2S , urease e triptofano desaminase) e os testes bioquímicos nos meios convencionais encontram-se na Tabela 2. No cálculo da porcentagem de correlação entre os testes foi aplicada a fórmula de classificação numérica da porcentagem de similaridade (6).

Com relação à produção de gás, houve 100% de concordância para a maioria das amostras. Entretanto, 8 amostras de *Proteus mirabilis* e 11 de *Proteus morganii*, bem como 1 amostra de *Proteus rettgeri* e 2

Tabela 1 - Enterobactérias utilizadas no estudo comparativo entre os testes do meio EPM e os testes bioquímicos convencionais

Enterobactéria	Nº de amostras
<i>E. coli</i>	20
<i>E. coli</i> (A-D) ^a	10
<i>S. dysenteriae</i>	9
<i>S. flexneri</i>	9
<i>S. boydii</i>	9
<i>S. sonnei</i>	3
<i>E. tarda</i>	4
<i>S. typhi</i>	5
<i>S. enteritidis</i> lac ^b	5
<i>S. enteritidis</i> lac ^c	20
<i>A. hirschaueri</i>	17
<i>C. freundii</i>	25
<i>C. diversus</i>	4
<i>K. pneumoniae</i>	4
<i>Klebsiella</i> sp.	26
<i>E. cloacae</i>	16
<i>E. aerogenes</i>	9
<i>E. hafniae</i>	1
<i>Enterobacter</i> sp.	4
<i>Serratia</i> sp.	30
<i>P. mirabilis</i>	9
<i>P. vulgaris</i>	3
<i>P. morganii</i>	11
<i>P. rettgeri</i>	7
<i>P. Providencia</i> sp.	30
<i>P. enterocolitica</i>	10
<i>P. pseudotuberculosis</i>	6
Total	306

^a Alkalase-Diaper; ^b lac+, fermentadora de lactose; ^c lac-, não fermentadora de lactose.

Tabela 2 - Correlação entre os testes do meio EPM (20h de incubação) e os testes bioquímicos convencionais

Amostras	Nº de amostras	Glicose (gás)		H_2S		Urease		LTD ^c /FAD ^d	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>E. coli</i>	20	18/17	95	4/4	100	0/0	100	0/0	100
<i>E. coli</i> (A-D) ^a	10	0/0	100	0/0	100	0/0	100	0/0	100
<i>S. cholerae</i> sp.	30	1/1	100	0/0	100	0/0	100	0/0	100
<i>E. tarda</i>	4	4/4	100	4/4	100	0/0	100	0/0	100
<i>S. enteritidis</i> lac ^b	25	20/20	100	25/25	100	0/0	100	0/0	100
<i>S. enteritidis</i> lac ^c	5	5/5	100	5/0	0	0/0	100	0/0	100
<i>A. hirschaueri</i>	17	17/17	100	17/17	100	0/0	100	0/0	100
<i>C. freundii</i>	25	25/25	100	25/25	100	0/23	8	0/0	100
<i>C. diversus</i>	4	4/4	100	0/0	100	0/3	25	0/0	100
<i>Klebsiella</i> sp.	30	29/29	100	0/0	100	28/28	100	0/0	100
<i>E. cloacae</i>	16	16/16	100	0/0	100	14/16	87,5	0/0	100
<i>E. aerogenes</i>	9	9/9	100	0/0	100	1/1	100	0/0	100
<i>E. hafniae</i>	1	1/1	100	0/0	100	0/0	100	0/0	100
<i>Enterobacter</i> sp.	4	4/4	100	0/0	100	4/4	100	0/0	100
<i>Serratia</i> sp.	30	0/0	100	0/0	100	1/1	100	0/0	100
<i>P. mirabilis</i>	9	0/8	11,1	9/9	100	9/9	100	9/9	100
<i>P. vulgaris</i>	3	3/3	100	3/3	100	3/3	100	3/3	100
<i>P. rettgeri</i>	7	0/1	85,7	0/0	100	7/7	100	7/7	100
<i>P. morganii</i>	11	0/11	0	0/0	100	11/11	100	11/11	100
<i>P. Providencia</i> sp.	30	13/15	93,3	0/0	100	0/0	100	30/30	100
<i>P. enterocolitica</i>	10	0/0	100	0/0	100	10/10	100	0/0	100
<i>P. pseudotuberculosis</i>	6	0/0	100	0/0	100	5/5	100	0/0	100
Total	306	90,2		95,4		91,8		100	

^a Nº de amostras positivas no meio EPM/Nº de amostras positivas nos testes bioquímicos convencionais;

^b Porcentagem de concordância entre os testes; ^c L-triptofano desaminase; ^d L-fenilalanina desaminase; ^e Alkalase-Diaper (A-D).

de *Providencia* produziram gás, em volume bastante reduzido, apenas no meio convencional. Uma amostra de *Escherichia coli* produziu gás somente no meio EPM.

No teste de H_2S , a concordância foi de 100% para todas as amostras, com exceção de 5 amostras de *Salmonella enteritidis* sorótipo

Typhimurium fermentadoras de lactose, em que H₂S foi detectado apenas no EPM e não no meio convencional (TSI).

Com relação à hidrólise da uréia, o teste foi negativo no meio EPM e positivo no meio convencional para 26 das 29 amostras de *Citrobacter* e para 2 das 16 amostras de *Enterobacter cloacae* representando, respectivamente, 10,3% e 87,5% de concordância entre os testes. Para as demais amostras houve concordância de 100%.

A comparação entre os testes de desaminação de L-triptofano no meio EPM e o de desaminação da L-fenilalanina no meio convencional mostrou 100% de concordância.

Considerando os resultados das 306 amostras, observou-se concordância de 90,2% para o teste de produção de gás, 95,4% para o de produção de H₂S, 91,8% para o de hidrólise da uréia e 100% para os testes de desaminação do triptofano e da fenilalanina, o que representa 94,3% de concordância entre os testes do meio EPM e os testes bioquímicos convencionais.

2) Características do meio EPM inoculado - Na Tabela 3 apresentamos as características apresentadas pelo meio EPM após inoculação com amostras dos diferentes gêneros da família Enterobacteriaceae.

Tabela 3 - Reações mais frequentes de enterobactérias no meio EPM

Gêneros	Superfície ^a	Dase ^b	Gás	H ₂ S
<i>Escherichia</i>	Azul	Amarola	+ (-)	-
<i>Shigella</i>	Azul	Amarola	- (+)	-
<i>Salmonella</i>	Azul	Amarola	+ (-)	+ (-)
<i>Citrobacter</i>	Azul	Amarola	+	+ ou -
<i>Edwardsiella</i>	Amarola ou Azul	Amarola	+	+
<i>Klebsiella</i>				
<i>Enterobacter</i>	Azul	Amarola ou Azul	+ (-)	-
<i>Enterobacter</i>				
<i>Proteus</i>	Verde-escuro	Azul	- (+)	+ ou -
<i>Providencia</i>	Verde-escuro	Amarola	+ ou -	-
<i>Yersinia</i>	Azul	Azul ou Amarola	-	-

a. Superfície azul ou amarola, incapazidade de produzir L-triptofano desaminase; verde-escuro, produção de L-triptofano desaminase; b. Dase amarola, indica fermentação de glicose; azul, indica produção de urease; Símbolos entre parênteses indicam reações ocasionais.

Discussão

A elevada concordância entre os resultados dos testes no meio EPM e nos meios convencionais (Tabela 2) demonstra que o EPM é bastante apropriado para a realização dos testes de produção de gás a partir da fermentação da glicose, produção de H₂S, hidrólise da uréia e desaminação do triptofano. Esta conclusão torna-se mais evidente quando considerarmos que as discordâncias encontradas referem-se, apenas, aos testes de produção de gás e urease, em gêneros ou espécies onde os resultados destes testes não são críticos para a identificação da amostra, como produção de gás por amostras de *Proteus* e de urease por amostras de *Citrobacter*. No teste de H₂S, o meio EPM, que não contém lactose, revelou ser mais sensível que o meio convencional (TSI), para amostras de *Salmonella* fermentadoras rápidas de lactose. A incapacidade do TSI indicar produção de H₂S em enterobactérias ca-

pazes de fermentar este carboidrato rapidamente, como *Arizona* e *Salmonella*, também foi verificada por outros autores (1, 4, 7). Parece indiscutível que a alimentação da sacarose do meio de Rugai & Araujo (8) aumentou a eficiência do meio, tornando-o adequado para a realização, em um só tubo, de 4 testes fundamentais na identificação rotineira de enterobactérias. A presença da sacarose no meio original pode provocar enganos na identificação de enterobactérias que fermentam este carboidrato e produzem urease simultaneamente, como pode ocorrer com amostras de *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus* e *Yersinia enterocolitica*, uma vez que o pH do meio pode se tornar ácido, indicando incapacidade de produzir urease, ou neutro, sugerindo a presença de um germe não fermentador de glicose.

As reações apresentadas no meio EPM são bastante claras e, portanto, de fácil interpretação. Recomenda-se, apenas, certa cautela para a leitura do teste de urease, quando a reação é fracamente positiva pois, ao invés de adquirir coloração azul, a base do meio torna-se amarelo-esverdeado, o que pode ocorrer com amostras de *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Serratia*. É interessante ressaltar que *Edwardsiella* determina um aspecto inteiramente característico no meio, isto é, cor amarela na base e na superfície, além de enegrecimento pela produção de H₂S (Tabela 3). Até o momento não observamos este aspecto com qualquer outra enterobactéria e ainda não temos uma explicação para o fato.

O período de incubação (20-24h) do meio EPM certamente representa uma grande vantagem para os laboratórios de Microbiologia Clínica que, muitas vezes, utilizam meios convencionais que requerem vários dias de incubação.

O meio EPM comporta-se como os meios semelhantes contendo glicose, quando inoculado com bactérias não fermentadoras de glicose ou com germes gram-positivos.

Estamos utilizando o meio EPM em nosso laboratório há, aproximadamente, 4 anos e os resultados têm sido idênticos aos relatados neste trabalho.

Agradecimentos

Agradecemos o apoio financeiro fornecido 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). Agradecemos também a Maria P. da Silva Dinardi e Neuza P. Alvim pela assistência técnica prestada durante a realização deste trabalho.

Referências Bibliográficas

1. Almeida, P.C.A. & Trabulsi, L.R. - Características culturais, bioquímicas, sorológicas e virulência de amostras de *Salmonella typhimurium* fermentadoras de lactose. Rev. Microbiol., 5:27-35, 1975.
2. Christensen, W.B. - Urea decomposition as a means differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. J. Bacteriol., 52:461-466, 1946.
3. Edwards, P.R. & Ewing, W.H. - Identification of *Enterobacteriaceae*.

- 3.ed. Minneapolis, Burgess Publishing, 1972.
4. Edwards, P.R. & Fife, M.A. - Lysine iron agar in the detection of *Arizona* cultures. *Appl. Microbiol.*, 9:478-480, 1961.
5. Ewing, W.H.; Davis, B.R. & Reavis, R.W. - Phenylalanine and malonate media and their use in enteric bacteriology. *Pub. Health Lab.*, 15:153-167, 1957.
6. Frobisher, M. - Fundamentals of microbiology. 8.ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 1968.
7. Pessoa, G.V.A. - Sobre a ocorrência de uma variante de *Salmonella typhimurium* fermentadora da lactose. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 33: 13-28, 1973.
8. Rugai, E. & Araujo, A. - Meio de cultura para identificação presumtiva de bacilos intestinais Gram-negativos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 28:79-83, 1968.
9. Sulkin, S.E. & Willett, J.C. - A triple sugar-ferrous sulfate for use in identification of enteric organisms. *J. Lab. Clin. Med.*, 25:649-653, 1940.

AN OUTBREAK OF HEPATITIS A APPARENTLY ASSOCIATED WITH USE OF CONTAMINATED WATER

Anastácio Ferreira Morgado
Escola Nacional de Saúde Pública
Fundação Oswaldo Cruz
Caixa Postal 8016
20000 Rio de Janeiro RJ, Brasil

João Paulo Bastos Hidebrandt
Hospital Pedro II
Ministério da Saúde
20000 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Tania Mattos Loes
Secretaria de Saúde Pública do Estado do Rio de Janeiro
20000 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Herr. nn G. Schatzmayr
Deptº de Virologia
Instituto Oswaldo Cruz
Caixa Postal 926
20000 Rio de Janeiro RJ, Brasil

& Szacha Eliasz Cynamon
Escola Nacional da Saúde Pública
Fundação Oswaldo Cruz

Summary

Between March and September, 1977, an epidemic outbreak of hepatitis A occurred in the city of Rio de Janeiro, with 60 cases in the Olaria section and 5 in the neighboring Ramos section. All cases were icteric, but complications or deaths were not registered. All of 29 serum samples tested for specific anti-hepatitis A antibodies were positive: 15(51.8%) with IgM, 9(31.0%) with IgM plus IgG, and 5(17.2%) with IgG. Sera from 36 patients, including the 29 positive for anti-hepatitis A antibodies, were all negative for HBs antigen. Forty eight cases were school children which led to the supposition that transmission was via lunch or water of the local schools. Other sources considered were via sewage pollution of some streets or by syringe transmission. An epidemiological investigation and case-control study revealed that none of these sources definitely associated with the outbreak. On the other hand, laboratory examination of water samples from one of the schools and from the home of one of the cases showed fecal contamination and extremely low levels of residual chlorine. At the time of the outbreak modifications of the piped water system of the section were being carried out, in a local contiguous to an open drainage ditch. These findings suggests the piped water as the primary source of infection, followed by transmission by interpersonal contact.

Resumo

Surto epidêmico da hepatite A associado com uso da água contaminada

Entre os meses de março e setembro de 1977 ocorreu um surto epidêmico de hepatite A, com 60 casos no bairro de Olaria e 5 no de Ra-

mos, ambos integrantes da cidade do Rio de Janeiro. Todos os 65 casos foram ictericos, sem ocorrência de óbito nem de complicações. 48 dos 65 casos surgiram entre escolares, o que levou à suposição de que a água das escolas ou a merenda escolar estivessem implicados na transmissão da doença. Considerou-se, também, que a fonte de infecção pudesse ser a poluição por esgoto, existente em algumas ruas, e "transmissão por seringas". Amostras de soro de 36 pacientes foram testadas para o HBsAg da hepatite B, sendo todos negativos. Esse material foi estocado até que fosse disponível o teste para o anticorpo da hepatite A. Este teste foi efetuado em 29 dos 36 soros, sendo todos positivos: 15(51,8%) para IgM, 9(31,0%) para IgM e IgG, e 5(17,2%) para o IgG. A investigação epidemiológica e o estudo de caso-controle revelaram que nenhuma das hipóteses acima formuladas estava associada ao surto epidêmico. De outro lado, exames laboratoriais da água de uma das escolas e da residência de um dos casos evidenciaram contaminação fecal e níveis de cloro residual muito baixos. Na época do irrompimento do surto epidêmico, vinha-se efetuando obras na rede d'água do bairro de Olaria e em um local a obra era contígua a uma vala - sem qualquer revestimento - pela qual se drenava toda sorte de dejetos, inclusive fecais. Epidemiologicamente não se pode excluir a hipótese de que a água tenha sido a fonte primária da infecção e a seguir tenha ocorrido transmissão por contato inter-pessoal.

Introduction

In June, 1977, three cases of hepatitis were reported at a school, at Olaria section of Rio de Janeiro.

A site visit confirmed the diagnosis of the three notified cases and a study was undertaken in the area; more cases were diagnosed and by the end of the study 65 cases of icteric hepatitis were confirmed, 60 within the Olaria section and five in the neighboring Ramos section of the city.

Most of the streets of the area of the outbreak are paved, with piped water, sewers and electric lights. Slums are also present on the hillsides of the section; the population of these slums is estimated as 10 per cent of the total population of the section.

Nevertheless of the 60 cases in the area, only three were reported from the slum area.

The total population of Olaria is estimated based on 1977 data, to be between 56.000 to 84.000 inhabitants.

Material and Methods

All children absent from school because of illness or without justification for more than three consecutive days were investigated. Any patient who was examined by a physician who confirmed the presence of jaundice and other signs and symptoms of hepatitis was considered as a positive case. When the study began in June, 1977, nine of the patients were already cured or in the convalescent phase, without icterus.

To identify the possible source of the infection the investigators decided that a case-control type study was necessary.

Two control group were established, using the patient home and his work area. Matching was done by age and sex. The residential control was chosen from neighboring houses.

The occupational control was selected from colleagues, at his work area. In analysis of case-control data, the McNEMAR statistics (2) was used without continuity correction.

An investigator interviewed each case and control, filling out for each a preestablished questionnaire. Signs, symptoms, chronology of illness and any available laboratory examination data were noted.

Blood samples were collected from 36 patients and examined in the biochemical laboratory, Evandro Chagas Hospital, Fundação Oswaldo Cruz, for direct and indirect bilirubin (4) and serum glutamic pyruvic transaminases (SGPT) (9). All samples were tested for hepatitis B antigen (HBsAg) by counterimmunolectrophoresis (12) in the Department of Virology, Institute Oswaldo Cruz. Samples of 29 sera, which had been stored at -20°C, were later tested by the same laboratory for anti-hepatitis A antibodies (IgG and IgM) by radioimmunoassay (14).

Several water samples were collected from Escola Chile and from the residence of one of the cases, located two blocks from the school. The samples were examined by the Sanitation and Environmental Health Department of the National School of Public Health and by the State Foundation for Environmental Engineering for bacterial contamination, residual chlorine and physico-chemical characteristics.

Results

Synopsis of cases - Table 1 lists the 65 cases in order of appearance of illness with SGPT and TB values and the number of days between onset of illness and the time of blood collection. Because of limited facilities for laboratory examination, TB and SGPT were tested in icteric patients, while SGPT alone was determined in symptomatic but nonicteric patients and in subjects who had recovered clinically but who requested laboratory confirmation. SGPT and TB levels were elevated in patients with active disease, i.e. with recent infection and were lower in patients in convalescence or who had recovered.

Clinically the 65 cases presented benign hepatitis, without hemorrhagic complications or alterations in consciousness. The icteric period was short, usually of one to two weeks, though it lasted up to four weeks in some cases. Patients were followed up until clinical recovery from their primary illness.

The outbreak was almost entirely confined to children and adolescents, with 12 cases less than 5 years of age, 51 between 6 and 17 years, and two young adults. Clinico-epidemiological evidence that this was an outbreak of hepatitis A virus was corroborated by serological results - all of 29 serum samples tested for specific anti-hepatitis A antibodies were positive: 15(51,8%) with IgM, 9(31,0%) with IgM plus IgG, and 5(17.2%) with IgG. Therefore, at least 15 of the cases tested most probably represented recent infections. As Table 1 shows, in general the cases with IgM antibodies had a shorter period of time between the onset of illness and the time of blood collection than the cases with IgG. In addition,

Table 1 - Hepatitis cases by order of onset of illness showing anti-hepatitis A antibodies, serum glutamic transaminase (SGPT) and total bilirubin (T.B.) Olaria section Epidemic, Rio de Janeiro, 1977

Case n° by order of onset	Class of anti- hepatitis A		T.B.	Case n° by order of onset	Class of anti- hepatitis A		T.B.
	S.G.P.T.	antibodies			S.G.P.T.	antibodies	
1 (19)*	- (**)	8	-	14 (40)	-	130	1.10
2 (100)	IgG	8	-	25 (3)	-	3,200	7.0
3 (99)	IgM + IgG	8	-	36 (11)	-	4,768	6.6
4 (1)	IgM + IgG	260	3.9	37 (1)	IgM + IgG	520	5.72
5 (3)	-	1,530	-	38 (1)	-	166	4.2
6 (70)	IgM + IgG	17	-	39 (1)	-	668	6.2
7 (69)	-	17	-	40 (3)	IgM	2,700	-
8 (1)	IgM + IgG	285	1.10	41 (-)	-	-	-
9 (8)	-	3,340	-	42 (3)	-	3,200	-
10 (21)	-	-	1.40	43 (5)	IgM	520	-
11 (19)	-	-	1.25	44 (7)	IgM	1,950	-
12 (15)	IgG	620	3.65	45 (1)	-	170	3.1
13 (69)	IgM	52	1.62	46 (13)	IgM + IgG	160	-
14 (4)	"	765	2.0	47 (2)	IgM	1,940	-
15 (-) (**)	-	"	"	48 (5)	IgM	1,140	5.8
16 (4)	-	415	6.5	49 (2)	IgM	2,780	-
17 (9)	-	1,960	-	50 (7)	-	1,380	-
18 (15)	IgM	117	1.04	51 (9)	IgM	440	10.56
19 (1)	IgM + IgG	825	3.9	52 (8)	-	1,260	1.2
20 (-)	IgG	-	-	53 (-)	-	-	-
21 (-)	"	-	-	54 (-)	-	-	-
22 (7)	-	510	-	55 (17)	-	57	-
23 (7)	IgM	750	2.40	56 (16)	"	2,000	"
24 (1)	-	150	4.3	57 (6)	-	2,520	5.1
25 (17)	IgM	48	-	58 (4)	IgM	830	3.52
26 (5)	IgM + IgG	930	9.25	59 (-)	"	"	"
27 (-)	-	-	-	60 (1)	-	1,260	5.0
28 (5)	IgM	220	-	61 (-)	-	-	-
29 (3)	-	1,550	-	62 (7)	IgM	910	-
30 (3)	IgM	1,100	0.0	63 (4)	"	1,900	-
31 (-)	-	-	-	64 (6)	-	-	-
32 (30)	IgG	65	-	65 (7)	IgM + IgG	-	-
33 (-)	IgG	-	-				

(*) Days after the onset of illness or the time of blood collection shown in parenthesis

(**) Not tested or not collected blood.

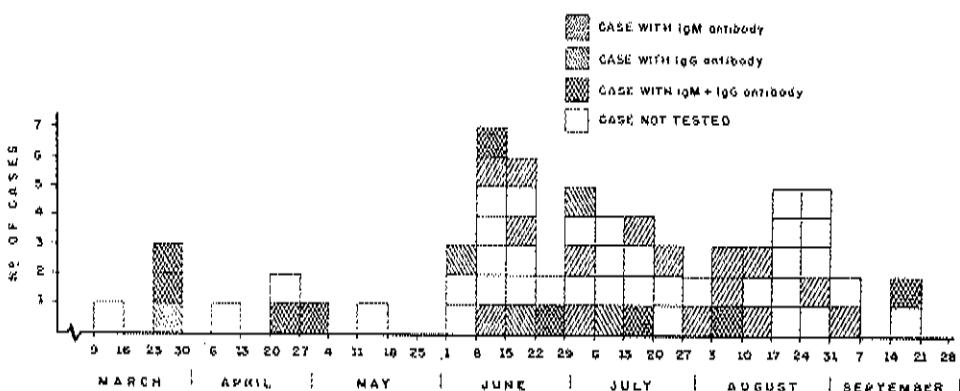
sera from 36 patients, including the 29 positive for anti-hepatitis A antibodies, were all negative for HBs antigen.

Chronological distribution - Figure 1 shows the week of onset of choloria, the criterion used to mark the onset of disease, for all cases. The appearance of 65 cases in seven months far surpassed local endemic level of hepatitis. In Escola Chile, where one to three cases per year had occurred annually since 1961, twelve cases occurred in the four months of May to August, 1977. After this outbreak, hepatitis returned to endemic levels among students, with three cases in 1978 and four in 1979.

As in Figure 1 shows, a high concentration of cases occurred during the months of June, July and August, representing 80% of the cases. For a disease such as hepatitis A, which has an incubation period of approximately 15-28 days, the distribution was not typical either of interpersonal transmission or of transmission from a sin-

gle source. Taken together, results are more easily interpreted as a combination of these two types of transmission. Chronological distribution of presence of IgM and IgG anti-hepatitis A antibodies are

Figure 1 - Hepatitis cases by week of onset of chaluria and by presence of anti-hepatitis A antibodies. Olaria epidemic, Rio de Janeiro, 1977



shown in Fig. 1. The 15 cases with only positive IgM antibodies, all occurred in June or later and blood was taken less than 70 days after onset of illness.

Probable sources of infection - The hypothesis of transmission via school lunch was excluded by the following observations: of the 65 cases, 34 occurred among students in schools which provided lunch, 14 among students of schools not providing lunch and 17 among persons not attending schools. In the analysis of case control data (Table 2) there was no significant difference in relation to consumption of the lunch among the 34 hepatitis cases and their respective student controls. There was also no difference, among the 12 cases from Escola Chile, and their controls, in relation to consumption of lunch.

There was no evidence that transmission had occurred via injections, since the epidemic was of hepatitis A and since no difference was noted between cases and controls in relation to this parameter. It was possible to provide adequate match for 61 cases by occupation and for 64 cases by residence (Table 2).

The hypothesis of transmission in streets polluted by sewage was not supported by the evidence, since of 65 cases only 24 resided on or near such streets, and no significant association was noted in relation to residential controls.

Laboratory examination of water samples from Escola Chile and from the residence of case n° 13 (Table 1) showed fecal contamination. The total coliform, fecal coliform and residual chlorine levels (Table 3) suggested that this contamination was more probably in the internal distribution system than in the public water system of the area. Samples from the roof tank and kitchen tap of the residence of Case n° 13 were also contaminated. Residual chlorine was absent or

very low except in the sample from the Escola Chile underground tank collected June 30, which can be explained by the cleaning of school tanks, local treatment and treatment of the public water system, carried out after the laboratory examination on June 28. Turbidity of the water samples was around 6.0 Jackson units. In all samples, color, pH, hydroxide, carbonate and bicarbonate alkalinity total

Table 2 - Distribution of cases home and occupational control groups according to three possible sources of infection, Olaria epidemic, Rio de Janeiro, 1977

Risk Factor Groups Studied	School lunch	Sewage-polluted street		Use of injection	
		Exposed	Total	Exposed	Total
		NY	NY	NY	NY
Cases		22	24	22	24
Home Controls		-	-	20	24
Occupational Controls		21	34	-	-
				31	61

(*) 18 of 61 cases paired with the 61 occupational controls.

Table 3 - Total coliforms, fecal coliforms and residual chlorine in water samples from Olaria section Rio de Janeiro during the Hepatitis outbreak, June, 1977

Location of sample collection	Total coliform/ 100ml		Fecal coliform/ 100ml		Residual chlorine mg/l 1 liter	
	Collection date		Collection date		Collection date	
	June 23	June 28	June 30	June 23	June 28	June 30
Escola Chile	Inlet pipe	2.0	0.0	0.0	0.0	-
	Underground tank	49.0	23.0	0.0	8.0	23.0
	Roof tank	6.0	0.0	0.0	2.0	0.0
House of Case no 13	Kitchen tap	170.0	-	w	13.0	-
	Bathroom tap	2.0	-	-	0.0	-
	Roof tank	4.5	-	-	0.0	-

- Not determined.

calcium and magnesium hardness calcium, chlorides total iron, and N and NO₃ nitrogen were all within normal limits by Brazilian standards.

The total coliform index of 2.0/100ml observed in water from the public system inlet on June 23, as well as the low residual chlorine

values in samples from June 23, 28 and 30, are not within normal limits. In different sections of Rio de Janeiro, residual chlorine values normally range from 0.5 to 1.0mg/l.

The source of contamination of the water remains undetermined; contamination of water systems by sewage may have occurred. The consequences would be greater in Escola Chile, attended by 1,751 students at the time, among whom 12 cases occurred. Other cases occurred in students of other schools and in nonstudents, most of whom had no contact with the Escola Chile cases, though perhaps the virus could have circulated in the Olaria population via Escola Chile students with subclinical infections. Another point whose importance can not be evaluated was the observation that at the time of the outbreak an engineering project was under way to extend the public water system to a part of the Olaria section not previously served. The pipe installations being modified were next to an open ditch which drained all types of refuse from residences located on a hillside above. It is possible that contamination of the public water system occurred during these modifications of the pipe network and may thus have provided the primary source of the infection.

Discussion

The hypothesis of transmission via school via school lunch, or through contact with dirt from streets with sewage pollution, or by injections were excluded. The fact that hepatitis occurred primarily in children and adolescents, most of them students, suggests that interpersonal transmission would be the most plausible. However, sections of the city contiguous with Olaria, with similar socioeconomic structures and in which the children and adolescents frequented the same types of schools, show no higher incidence of hepatitis during this period. This finding, plus the fact that the water of at least two locations in the Olaria section was fecally polluted and that hepatitis was more frequent in that part of the population with piped water in their homes, make it impossible to exclude piped water as the primary source of infection. Taken together, the results of this study are better explained if the two types of transmission are hypothesized to have occurred. The primary source of infection would be the contaminated water of at least one school and one home (the only two locations from which water was examined) and further transmission could have occurred by interpersonal contact.

The inactivation of hepatitis virus in public water systems, especially when there is heavy contamination with organic material, has represented a challenge for public health authorities. At least five different hepatitis epidemics whose most probable source of transmission was treated water have been described (3, 5, 8, 10, 11, 15). Under experimental conditions, it was established since 1945 that hepatitis A virus was inactivated only when the water was pretreated by chemical coagulation, clarification and filtration, and issued by treatment with chlorine (7); a recent monograph on this subject shows that there is no an ideal process to assure potable water free from viruses (13).

The outbreak here described may not fulfill completely the criteria for water-borne hepatitis (6), but certainly the contaminated water remains the most highly suspected source. This epidemic is not

an unique example in Brazil of hepatitis A outbreaks possibly transmitted by contaminated water, but whose sources cannot be inquestionably defined due to technical and methodological limitations.

Acknowledgments

We wish to thank Mrs. Cydnea Bouyer, director of Escola Chile, and the teachers of that school, for their good will and cooperation during this study; colleagues P.C. Sabroza, J.G. da Fonte and E. de A. Costa for methodological suggestions given in the planning phase; Professor E.A. de Castilho, Department of Preventive Medicine, Universidade de São Paulo, for aid in the quantification of data; Dr. C.P.T. Yoshida and J.G. de Souza both of Instituto Oswaldo Cruz, the former for carrying out the Radioimmunoassay and Immunoelectrophoresis Tests and the second for carrying out Bilirubin and Transaminase Tests. Dr. P.L. Moriarty for helping in the preparation of the English manuscript; and Mrs. M.E.R. Valente for her typing assistance.

References

1. Editorial: Potabilidade de água tem normas e padrão em todo o país. Engenharia Sanitária (Rio de Janeiro), 16:26-30, 1977
2. Flies, J.L. - Statistical methods for rates and proportions. New York, John Wiley & Sons, p. 72-75, 1973.
3. Hayward, M.L. - Epidemiologic study of an outbreak of infectious hepatitis. Gastroenterology, 6:504-510, 1946.
4. Malloy, H.T. & Evelyn, K.A. - Determination of bilirubin with photoelectric colorimeter. Journal of Biological Chemistry, 119: 481-490, 1937.
5. Melnick, J.L. - A water-borne urban epidemic of hepatitis. In: - Hartman, F.W., ed. - Henry Ford Hospital International Symposium, Hepatitis Frontiers, Boston, Little Brown, pp. 221-225, 1957.
6. Mosley, J.W. - Water-borne infectious hepatitis. New England Journal of Medicine, 261:703-708, 1959.
7. Neefe, J.R.; Stokes, J.; Baty, J.B. & Reinhold, J.G. - Desinfection of water containing a causative agent of infectious (epidemic) hepatitis. Journal of the American Medical Association, 182:1076-1080, 1945.
8. Poskanzer, D.C. & Beadenkopf, W.G. - Waterborne infectious hepatitis epidemic from a chlorinated municipal supply. Public Health Report, 76:745-751, 1961.
9. Reitman, S. & Frankel, S. - A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. American Journal of Clinical Pathology, 28:56-63, 1957.
10. Sidhu, A.A. & Nair, S.A. - Sample survey of the incidence of infectious hepatitis in Delhi (1955-56). Indian Journal of Medical Research, 45(Suppl.1):31-47, 1957.

11. Tucker, C.B.; Owen, W.H. & Farrel, R.P. - Outbreak of infectious hepatitis apparently transmitted through water. Southern Medical Journal, 47:732-740, 1954.
12. Wallis, C. & Melnick, J.L. - Enhanced detection of Australia antigen in serum hepatitis patients by discontinuous counter-immunoelectrophoresis. Applied Microbiology, 25:867-869, 1971.
13. World Health Organization - Human viruses in water, wastewater and soil: virus removal by treatment processes. Technical Report Series n° 639, pp.29-33, 1979.
14. World Health Organization - Manual for rapid laboratory viral diagnosis: serodiagnosis of acute viral hepatitis A by radioimmunoassay for IgM. WHO Offset Publications (Geneva), 47:39-43, 1979.

LYSOGENY AMONG ENTEROPATHOGENIC *E. COLI* STRAINS ISOLATED IN SÃO PAULO BETWEEN 1963 AND 1981

Maria de Lourdes Monteiro da Silva

Norma P.F. Severo

Rosana Puccia

Laura L.P. Costa

& Luiz R. Trabulsi

Escola Paulista de Medicina

Deptº de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia

Caixa Postal 20342

01000 São Paulo SP, Brasil

Summary

A collection of 193 strains belonging to the enteropathogenic *E. coli* serogroups 026, 055, 086, 0111, 0119, 0125, 0126, 0128 and 0142 were studied in relation to lysogeny. A K12 *E. coli* was used as indicator strain for the tests. I - *Lysogeny among 0111 strains*. One hundred strains belonging to serotypes 0111:H2, 0111:H12 and 0111:H⁻ were tested. Sixty-eight strains were isolated in 1963-1968 period, 20 strains in 1976-1978 and 12 in 1981. The results showed that 43 strains were lysogenic. Lysogeny was more frequent among 0111:H2 strains than the other serotypes. Cross tests made with 42 lysogenic strains showed that some have identical phages and some harbors more than one phage. II - *Lysogeny among other enteropathogenic E. coli serogroups*. Ninety-three strains belonging to eight different serogroups were tested. Only three strains were lysogenic, belonging to serogroups 086, 0119 and 0128. Cross tests made with these 3 strains and 42 *E. coli* 0111 lysogenic strains suggest that the 45 strains have identical phages, since each one was immune to lysates of all the other strains. Although the detection of lysogeny could be increased by using other sensitive strains, the results of this study show that: 1) lysogeny is more frequent among 0111 strains; 2) the number of lysogenic strains belonging to this serogroups is decreasing over the years.

Resumo

Lisogenia entre amostras de E. coli enteropatogênicas isoladas em São Paulo, entre 1963 e 1981

Cento e noventa e três amostras de *E. coli* pertencentes aos sorogrupo enteropatogênicos 026, 055, 086, 0111, 0119, 0125, 0126, 0128 e 0142 foram estudados quanto à lisogenia. Uma linhagem de *E. coli* K12 foi utilizada como indicadora para os testes. I - *Lisogenia entre as amostras do sorogrupo 0111*. Foram testadas 100 amostras pertencentes aos sorotipos 0111:H2, 0111:H12 e 0111:H⁻. 68 amostras foram isoladas no período de 1963-1968, 20 amostras entre 1976-1978 e 12 em 1981. Os resultados mostraram que 43 amostras eram lisogênicas. A lisogenia foi mais frequente entre as amostras 0111:H2 do que as dos demais sorotipos. Testes cruzados feitos com 42 linhagens lisogênicas mostraram que algumas têm fagos idênticos e algumas contêm mais do que um fago. II - *Lisogenia entre os outros sorogrupo enteropatogênicos de E. coli*. Foram testadas 93 amostras pertencentes à 8

sorogrupos diferentes. Somente 3 amostras eram lisogênicas, pertencentes aos sorogrupos 086, 0119 e 0128. Testes cruzados feitos com essas 3 amostras e as 42 amostras lisogênicas de *E. coli* 0111 sugerem que as 45 amostras têm fagos idênticos, pois cada uma é imune aos lisados das demais amostras. Embora um maior número de amostras lisogênicas pudesse ser detectado aumentando-se o número de amostras indicadoras, os resultados deste estudo mostram que: 1) a lisogenia é mais frequente entre as linhagens 0111; 2) o número de amostras lisogênicas pertencentes à este sorogrupo está diminuindo nos últimos anos.

Introduction

Enteropathogenic *E. coli* strains (EPEC) have been described as an important etiological agent of infant diarrhea, mostly in the tropical countries. In Brazil the most frequent serogroup isolated from feces of young children with diarrhea is *E. coli* 0111 (8). The other serogroups of importance are: 026, 055, 086, 0119, 0125, 0126, 0128 and 0142. Among these, serogroup 0119 is isolated with high frequency. Some strains of serogroup 0128 produce ST toxin and are, therefore, enterotoxigenic (9).

The mechanism of pathogenicity of enteropathogenic strains has not been established. Some serogroups were described as producing VT toxin (6). Other types of toxin were described by Klipstein & col. (5). Adherence to the intestinal epithelium was described with a 026 strain (11) and a 0125 strain (10). Adherence in HEp-2 tissue culture cells was described by Cravioto & col. (2). Probably the mechanisms of virulence of the enteropathogenic strains are different regard the serogroup (or serotype) considered.

The objective of our work is to study the different characteristics of the enteropathogenic *E. coli*. In this paper we describe the results obtained with tests of lysogeny performed with *E. coli* 0111 belonging to the most frequent serotypes in São Paulo (0111:H2, 0111:H12 and 0111:H⁻) and strains belonging to serogroups 026, 055, 086, 0119, 0125, 0126, 0128 and 0142. The results obtained with strains of serogroup 0111 were correlated with their isolation periods.

Material and Methods

Strains - A total of 193 strains belonging to nine EPEC serogroups were studied. One hundred *E. coli* 0111 strains belong to 0111:H2, 0111:H12 and 0111:H⁻ serotypes. The other ninety-three strains belong to serogroups 026, 055, 086, 0119, 0125, 0126, 0128 and 0142. The strains of serogroup 0128 are ST⁻. All strains were isolated in our laboratory from feces of children with diarrhea, no more than 5 years old. They were in treatment in different hospitals in São Paulo. The strains studied are presented in Tables 1 and 2. *E. coli* K12 MA 335 was used as indicator strain for the tests of lysogeny.

Preparation of amplified lysates - The strains to be tested and the sensitive strain were grown in 3ml of LB Medium (Tryptone, 10g; Yeast extract, 5g; NaCl, 5g; H₂O, 1000ml) for 16-20h. 0.25ml of the sensitive strain were then inoculated into 5ml of LB Medium and grown for 2h with aeration (one tube of MA335 for each strain to be tested). Meanwhile, the strains to be tested were treated with four

Table 1 - *E. coli* O111 strains

Serotype	Year(s) of isolation	No. of strains	No. of strains per serotype
O111:H2	1963-1966	26	30
	1967	4	
O111:H12	1963-1965	6	6
O111:H-	1963-1968	36	64
	1976-1978	16	
	1981	12	
Total		100	

Table 2 - List of enteropathogenic serogroups studied and isolation period of the strains

Serogroup	No. of strains	Isolation period
O26	10	1977-1981
O55	17	1965-1981
O86	5	1968-1977
O119	42	1966-1981
O125	9	1968-1981
O126	3	1977-1981
O128	6	1964-1977
O142	1	1981
Total	93	

drops of chloroform and centrifuged to remove the bacterial debris. One ml of each supernatant was added to one tube of MA335 in exponential phase of growth to amplify the production of phage. The tubes were incubated for 3 hours with aeration, and then treated again with chloroform and centrifuged. The supernatants were transferred to screwcap tubes containing 2-3 drops of chloroform and tested for the presence of phage.

Tests of lysogeny - The tests were performed on fresh L Medium plates (LB Medium with 2% of agar), 25-30ml per plate. These plates were overlaid with 3ml of melted soft agar cooled to 45-50°C (LB Medium with 0.7% of agar) and added with the sensitive strain diluted in LB Medium (0.08ml of an overnight culture in 0.9ml of LB). After solidification the plates were inoculated with the lysates, using wooden sterile toothpicks. In each plate we usually tested 16 lysates and a positive control. The plates were incubated for 16-20h at 37°C and observed for the appearance of plaques of lysis.

Use of MgSO₄ - All the tests were also performed using 0.01M MgSO₄ instead LB Medium as the diluent for indicator strain.

Cross tests - Each lysogenic strain was cross tested against the lysates of all the other strains to test the identity of the phages of the different serogroups.

Results

Comparing the results obtained with the tests performed with the sensitive strain diluted in LB Medium and MgSO₄ solution we considered that is no advantage to the use of Mg⁺⁺ to increase the adsorption of the phages when working with EPEC strains. There were differences among the number of plaques in the spot test of several strains using the one or the other method, but for some strains we observed more plaques using MgSO₄ whereas for others we found the reverse. Anyway, the differences were not sufficiently significant to justify the use of Mg⁺⁺ for lysogeny tests with EPEC strains, as

it was described for other phages (1). In the same manner, Grunnet (4) found that magnesium sulfate and calcium chloride did not increase the number of demonstrated coliphages in isolates from sewage and fresh water.

I - *Lysogeny among E. coli 0111 strains* - The results obtained with the lysogeny tests are presented in Table 3. 43% of the strains tested are lysogenic. If we consider the isolation period we see that most of them belong to the group isolated in 1963-1968 (60.29%), while the number has decreased during the subsequent periods (10% and 0%).

Table 3 - Lysogeny of *E. coli* 0111 strains regard their isolation period

Isolation period	No. of strains	No. of lysogenic strains	%
1963-1968	68	41	60.29
1976-1978	20	2	10
1981	12	0	0
Total	100	43	43.00

Table 4 shows the percentage of lysogenic strains in relation to the isolation period and the serotypes of the strains. In 1963-1968 the serotypes possessing most lysogenic strains were 0111:H2 and 0111:H⁻ (96.15 and 41.66%). This frequency is lower among the strains isolated in 1976-1978 (25% and 6.25%) and none of the strains isolated in 1981 are lysogenic. Only one strain with H12 antigen was lysogenic, belonging to the group of strains isolated in the first period.

The distribution of lysogenic strains belonging to 0111:H2 and 0111:H⁻ serotypes during the 1963 to 1968 isolation period is uniform showing that there was not an epidemic lysogenic strain predominating in a certain year of the period.

Cross tests made with 42 lysogenic strains showed that some strains have identic phages since there is immunity in relation to their lysates and some strains possess more than one prophage producing plaques of lysis in sensitive strains.

II - *Lysogeny among other EPEC serogroups* - Lysogenic strains among the eight serogroups studied are very rare. Among the 93 strains tested, only three are lysogenic. They belong to the 086, 0119 and 0128 serogroups, representing 20.00, 2.38 and 16.66% of the strains of each serogroup (Table 5).

The results of the 261 cross tests done with these three strains and the 42 lysogenic *E. coli* 0111 strains showed that they have identic phages. All strains are immune to all the phages produced by them, except strain 0111:H2 no. 36 which is sensitive to the phages

produced by the 3 lysogenic strains. This strain is also sensitive to lysates prepared with other *E. coli* 0111 strains, showing that strain no. 36 is different from the other lysogenic strains. It is important to remember that it's phage was detected using a K12 indicator strain.

Table 4 - Lysogeny among *E. coli* 0111 serotypes

Isolation period	Serotypes	No. of strains	No. of lysogenic strains	%
1963-1968	0111:H2	26	25	96.15
	0111:H12	6	1	16.66
	0111:H ⁻	36	15	41.66
1976-1978	0111:H2	4	1	25
	0111:H12	0	0	0
	0111:H ⁻	16	1	6.25
1981	0111:H2	0	0	0
	0111:H12	0	0	0
	0111:H ⁻	12	0	0

Table 5 - Lysogeny among other EPEC serogroups

Serogroup	No. of strains	Lysogenic strains No.	%
026	10	0	0
055	17	0	0
086	5	1	20.00
0119	42	1	2.38
0125	9	0	0
0126	3	0	0
0128	6	1	16.66
0142	1	0	0
Total	93	3	3.22

None of the lysates prepared with the 42 *E. coli* 0111 strains showed plaques of lysis when the 086, 0119 and 0128 strains were used as indicator strains. These results confirm the identity of the phages of the 086, 0119, 0128 and 0111 lysogenic strains.

Discussion

Lysogeny in enteropathogenic *E. coli* strains has been studied by R. Tashpulatov (refered in 7) who worked with 0111, 055 and 026 serogroups. His experiments have shown that 77.3% of the strains of 0111 serogroup are lysogenic, but no phages were detected in the other serogroups.

Experiments done in our laboratory confirmed the results obtained by that author in relation to 0111 serogroup, although we observed that strains isolated in Brazil showing this characteristic are decreasing along the last twenty years from 60% to 0%. Most of the *E. coli* 0111 strains isolated during the 1963-1968 period were lysogenic (60.29%). The strains studied by Tashpulatov were isolated probably a few years earlier than ours, but it is interesting to compare the results and see the frequency of the lysogenic 0111 strains isolated in both countries.

The characteristic of lysogeny among *E. coli* strains belonging to 0111 serogroup seems to be changing over the years. Only 2 strains out of 20 isolated in 1976-1978 period were lysogenic and none of the isolates of 1981 presented this characteristic (Table 3).

These results could suggest that lysogeny could be related with the storage of the strains for a long period, but studies made by Deak (3) with *E. coli* 0124 showed that cultures maintained in the

laboratory for years showed no alteration in phage type.

Taking in consideration the percentage of lysogenic serotypes of each period studied we can see that lysogeny is more frequent among 0111:H2 than the other serotypes (Table 4). On the other hand, the number of 0111:H2 isolates is decreasing from 1963 until now. Among the 12 strains of *E. coli* 0111 isolated in our laboratory in 1981 until August, none of them had the H2 antigen.

The 0111:H⁻ strains were frequent during the 1963-1968 period, but it looks like that they tend to predominate among the 0111 isolates. All the strains of this serogroup isolated in 1981 until August are non-motile.

Studying other eight enteropathogenic serogroups, we found that only 3 among 93 (3.22%) strains tested are lysogenic. These three strains are no. 135/17 (086 serogroup), 142/4 (0119 serogroup) and 2 (0128 serogroup).

On the contrary with what occurred with 0111 serogroup, there is not a relationship between lysogeny and isolation period of the strains. Strain no. 2 was isolated in the period between 1964-1970 and the other two between 1977-1979.

Cross-tests made with these three strains and 42 *E. coli* 0111 lysogenic strains suggest that the 45 strains have identical phages, since each one was immune to the lysates of all the other strains.

Although the detection of lysogeny could be increased by using other sensitive strains, the results of this study suggest that there is a remarkable difference between the strains belonging to the 0111 serogroup and other EPEC strains regard lysogeny.

Whether or not there is any relationship between lysogeny and virulence in enteropathogenic *E. coli* strains is not known. We intend to test other sensitive strains and "cure" the lysogenic strains to see if the phage confers a phenotypic characteristic to them.

Acknowledgments

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), III Plano Integrado de Genética, grant no. 40.0568/80 (PIG III) and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

References

1. Adams, M.H. - *Bacteriophages*. New York, Interscience Publishers, 1959.
2. Cravioto, A.; Gross, R.J.; Scotland, S.M. & Rowe, B. - An adhesive factor found in strains of *E. coli* belonging to the traditional infantile enteropathogens serotypes. *Current Microbiol.*, 3:95-99, 1979.
3. Deak, Z. - Phage-typing of *Escherichia coli* 0124:K72 (B17) by the examination of lysogenicity. *Acta Microbiol. Acad. Sci. hung.*, 12:261-267, 1965.
4. Grunnet, K. - Comparison of methods for demonstrating coliphages in waters. *Rev. Int. Oceanogr. Med.*, 48:17-19, 1977.

5. Klipstein, F.A.; Rowe, B.; Engert, R.F.; Short, H.B. & Gross, R.J. - Enterotoxigenicity of enteropathogenic serotypes of *Escherichia coli* isolated from infants with epidemic diarrhea. *Infect. Immun.*, 21: 171-178, 1978.
6. Konowalchuk, J.; Speirs, J.I. & Stavric, S. - Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 18:775-779, 1977.
7. Kudlay, D.G.; Petrovskaya, V.G. & Tashpulatov, R.Y. - Episomic determinants of heredity in the Enterobacteriaceae. In: - Cos, B.S. & Huizinga, J., eds. - Heredity and variability of microorganisms. Amsterdam, Excerpta Medica Foundation, p. 15-18, 1962.
8. Murahovschi, J. & Trabulsi, L.R. - Aspectos etiológicos e epidemiológicos das diarréias infecciosas bacterianas. In: - Microbiologia das infecções intestinais. São Paulo, Livraria Atheneu, p. 11-24, 1981.
9. Reis, M.H.L.; Castro, A.F.P.; Toledo, M.R.F. & Trabulsi, L.R. - Production of heat-stable enterotoxin by the O128 serogroup of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 24:289-290, 1979.
10. Ulshen, M.H. & Rollo, J.L. - Pathogenesis of *Escherichia coli* gastroenteritis in man: another mechanism. *New Engl. J. Med.*, 302:99-101, 1980.
11. Williams, P.H.; Sedgwick, M.I.; Evans, N.; Turner, P.J.; George, R.H. & McNeish, A.S. - Adherence of an enteropathogenic strain of *Escherichia coli* to human intestinal mucosa is mediated by a colicinogenic conjugative plasmid. *Infect. Immun.*, 22:393-402, 1978.

CAMPYLOBACTER FETUS SUBSP. JEJUNI (*C. jejuni*): ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS OBTIDAS EM GALINHAS, NA CIDADE DO RIO DE JANEIRO

Anete Levi
 & Ilvan D. Ricciardi

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

Resumo

Ocorrência de *C. jejuni* em galinhas, vivas e abatidas, comercializada na cidade do Rio de Janeiro. De 168 amostras fecais e 227 amostras de carcaças, foram isoladas e caracterizadas 287 cepas de *C. jejuni*, sendo 108 (64,2%) provenientes de amostras fecais e 179 (78,7%) provenientes de carcaças. Os dados sugerem a possibilidade das aves serem reservatórios potenciais de infecção para o homem. A incidência em carcaças admite a hipótese de que trabalhadores ou donas-de-casa, que lidam diretamente com frangos, constituam grupos populacionais com maior risco de contágio.

Summary

Campylobacter fetus subsp. jejuni (*C. jejuni*): identification of strains isolated from chickens in Rio de Janeiro

Occurrence of *C. jejuni* in 168 fecal samples and 227 carcasses from chickens commercialized in Rio de Janeiro. A total of 287 strains were obtained, 108 (64,2%) being from feces and 179 (78,7%) from carcasses. Therefore chicken may be potential reservoirs of infection for man. Furthermore, the incidence of *C. jejuni* in carcasses also admits the hypothesis that workers and homehandling with chickens may represent populational groups with major risk of infection.

Introdução

Campylobacter fetus subsp. jejuni (*C. jejuni*) tem sido reconhecido, nos últimos anos, como importante agente de infecções humanas. Meningites, artrites, colecistites e outras patologias têm sido descritas mas, a gastroenterite é sem dúvida o evento mais frequentemente relatado (13).

Estudos epidemiológicos, a respeito de possíveis transmissores e/ou reservatórios de *C. jejuni*, têm apontado animais domésticos como possíveis fontes de contaminação humana e entre elas, particularmente cães e aves (2, 7, 10, 14, 16). Entre as últimas, as galinhas têm sido fonte de isolamento de amostras de *C. jejuni* a partir da flora fecal (8, 15) e carcaças (11).

No Brasil, *C. jejuni* já foi encontrado tanto no homem como em cães (6, 12). Neste artigo, é relatado o isolamento de galinhas, vivas e

abatidas, comercializadas na cidade do Rio de Janeiro.

Material e Métodos

Durante o período de setembro/1980 a março/1981 foram retiradas 395 amostras, sendo 168 a partir de fezes e 227 de carcaças de galinhas. As amostras obtidas foram semeadas no máximo até 4 horas após a colheita, em meio agar-sangue VPT (14). Após incubação de 24 ou 48 horas, em micro-aerofilia (95% N₂ e 5% CO₂), a 42°C, colônias com morfologia compatível (13) foram selecionadas para isolamento e identificação. Os microrganismos foram identificados, sumariamente, como *C. jejuni*, quando apresentavam as seguintes características: células curvas-espiraladas, Gram-negativas, não apresentando crescimento a 25°C.

Testes complementares foram realizados, posteriormente, de acordo com a metodologia descrita por Bryner & Frank (4), para confirmação da sub-espécie, a saber: produção de catalase, oxidase e H₂S; não crescimento em 40µg/ml de ácido nalidíxico e em 8% de glicose; crescimento em 0,4mg/ml de TTC, em 1% de glicina e em 3,5% de cloreto de sódio.

Resultados e Discussão

Dos 395 materiais investigados, foram isoladas 287 cepas de *C. jejuni*, sendo 108 (64,2%) provenientes de amostras fecais e 179 (78,7%) provenientes de carcaças (Tabela 1).

Tabela 1 - Isolamento de *C. jejuni* de amostras provenientes de galinhas

Expedimentos	Nº de amostras	Amostras	
			positivas
Fezes	168	108 (64,2%)	
Carcaças	227	179 (78,7%)	
Total	395	287 (72,6%)	

C. jejuni tem sido isolado de vários animais e, entre as aves, as galinhas têm merecido destaque, já que constituem importante e frequente fonte de alimentação humana. Hayek & Cruckshank (9) descreveram enterites por *Campylobacter*, possivelmente relacionados à ingestão de galinhas contaminadas e Bertchinger (1) isolou este microrganismo da bile de 21% de galinhas com hepatite necrosante.

Em concordância com os nossos dados, Bruce & col. (3) isolaram *C. jejuni* de 62% de 63 carcaças de galinhas. Já Grant & col. (8) verificaram que, de 46 frangos, 38(83%) continham *C. jejuni* na flora retal.

Os resultados obtidos sugerem que *C. jejuni* ocorre como importante comensal na flora intestinal de galinhas comercializadas na cidade do Rio de Janeiro. A elevada incidência em carcaças, admite a hipótese de que, trabalhadores ou donas-de-casa, que lidem diretamente

com frangos constituam grupos populacionais de alto risco à infecção por *C. jejuni*.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com recursos do CNPq e FINEP.

Referências Bibliográficas

1. Bertschinger, H.U. - Machweis von vibrionen bei Huhnern mit hepatitis. Zentralbl. Veterinaermed. Reihe B, 12:33-40, 1965.
2. Blaser, M.; Powers, B.W.; Cravens, J. & Wang, W.L. - *Campylobacter* associated with canine infection. Lancet, 11:979-981, 1978.
3. Bruce, D.; Zochowschi, W. & Ferguson, I.R. - *Campylobacter enteritis*. Brit. Med. J., 2:1219, 1977.
4. Bryner, J.M. & Frank, A.M. - A preliminary report on the identification of *Vibrio fetus*. Amer. J. Vet. Res., 16:76-78, 1955.
5. De Mol, P. & Bosman, E. - *Campylobacter enteritis* in Central Africa. Lancet, 1:604, 1978.
6. Ferreira, M.C.S.; Ribeiro, V.L.S. & Ricciardi, I.D. - *Campylobacter* dogs and human enteritis. Vet. Rec., 105:451, 1979.
7. Fleming, M.P. - Incidence of *Campylobacter* infection in dogs. Vet. Rec., 107:202, 1980.
8. Grant, I.H.; Richardson, N.J. & Bokkenheuser, V.D. - Broiler chickens as potential source of *Campylobacter* infections in humans. J. Clin. Microb., 11:508-510, 1980.
9. Hayek, L.J. & Cruickshank, J.G. - *Campylobacter enteritis*. Brit. Med. J., 2:1219, 1977.
10. Holt, P.E. - Incidence of *Campylobacter*, *Salmonella* and *Shigella* infections in dogs in an industrial town. Vet. Rec., 107:264, 1980.
11. Park, C.E.; Stankiewicz, Z.K.; Lowett, J. & Hunt, J. - Incidence of *Campylobacter jejuni* in fresh eviscerated whole market chickens. Can. J. Microbiol., 27:841-842, 1981.
12. Ricciardi, I.D.; Ferreira, M.C.S.; Otto, S.; Oliveira, N.; Sabrá, A. & Fontes, C.F. - Thermophilic *Campylobacter* associated diarrhoea in Rio de Janeiro. Rev. Bras. Pesq. Med. Biol., 12: 189-191, 1979.
13. Ricciardi, I.D. & Ferreira, M.C.S. - In: Trabulsi, L.R., ed. - Microbiologia das infecções intestinais. São Paulo, Atheneu, p. 90-101, 1981.
14. Skirrow, M.B. - *Campylobacter enteritis*: a "new" disease. Brit. Med. J., 2:9-11, 1977.
15. Smith, M.V. & Muldoon, P.J. - *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* (*Vibrio fetus*) from commercialy processed poultry. Appl. Microbiol., 27:995-996, 1974.
16. Svedhem, A. & Kaiser, B. - Isolation of *Campylobacter jejuni* from domestic animal and pets: probable origin of human infection. J. Inf., 3:37-40, 1981.

CRESCIMENTO DE FONSECAEA PEDROSOI EM MEIO QUIMICAMENTE DEFINIDO

Maria Elisabeth Bernardes Margutti

Deptº de Microbiologia

Instituto de Ciências Biológicas UFMG

Caixa Postal 2486

30000 Belo Horizonte MG, Brasil

& Fernando Steele da Cruz

Deptº de Microbiologia Geral

Instituto de Microbiologia UFRJ

Centro de Ciências da Saúde, Bloco I, Ilha do Fundão

21941 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Resumo

Meio mínimo, quimicamente definido, que permitisse o ótimo crescimento do fungo dematiáceo, *Fonsecaea pedrosoi*, foi desenvolvido. Vários glicídios foram utilizados como fonte de carbono, entretanto os melhores resultados foram observados com os di e tri-sacarídis. Dentro destes, maltose foi o que melhor crescimento proporcionou. Ácidos orgânicos e ácidos aminados não foram utilizados como fonte única de carbono. Com relação à fonte de nitrogênio, treonina exerceu efeito estimulante sobre o crescimento. Quanto aos demais amino-ácidos, não houve diferença marcante em comparação ao crescimento obtido com sulfato de amônio. Em relação às exigências de vitaminas, ficou demonstrado que tiamina era fator essencial para o crescimento do fungo. Finalmente, foi proposto meio mínimo, quimicamente definido, que proporcionou amplo crescimento de *F. pedrosoi*, por pelo menos dez sub-culturas.

Summary

A minimum chemical defined medium for growing Fonsecaea pedrosoi

A minimum chemicaldefined medium for growing the dermatiaceous fungus *F. pedrosoi* was defined. Several carbohydrates were able to support growth of *F. pedrosoi*, however di and trisaccharides were more effective. Organic acids and amino acids were unable to promote growth as the only carbon source. Concerning nitrogen sources treonine had a sharp stimulating effect on growth. Among the vitamins only thiamine was an essential growth factor. The effectiveness of the minimum chemicaldefined médium on supporting growth of *F. pedrosoi* was tested at least for ten transfers of subcultures.

Introdução

Fonsecaea pedrosoi é fungo dimórfico, patogênico para o homem, que se apresenta na forma micelial em cultura e leveduriforme no tecido parasitado. É um dos principais agentes da dermatite verrucosa cromoparasitária (cromomicose), afecção cutânea que pode tornar-se, ocasionalmente, generalizada, observando-se então o acometimento de tecidos profundos. É uma doença crônica, que predomina nas regiões tropicais e subtropicais da América (19, 20), embora seja de ocorrência universal (8, 9, 23, 29).

Embora muito seja conhecido sobre os aspectos clínicos (18, 19), histopatológicos e epidemiológicos da cromicose (5, 9, 20), bem como sobre a morfologia dos seus agentes (15, 25, 34), pouco se sabe sobre a fisiologia destes fungos. A revisão feita por Al Doory & Páiron (3) mostra que de 600 trabalhos publicados sobre estes patógenos, menos de 2% dizem respeito a aspectos nutricionais e fisiológicos (2, 11, 12, 13, 16, 22, 30, 31, 32).

No sentido de que as informações sobre a fisiologia pudessem fornecer subsídios para maior entendimento da sua biologia dos fungos, estudou-se vários aspectos do seu comportamento. Uma parte versou sobre a fase parasitária (25, 27, 31) e consistiu na tentativa de se obter, regularmente as formas celulares predominantes, bem como de se verificar a influência de substratos no dimorfismo. Outro aspecto envolveu a fase saprofítica (10, 11, 13, 16, 21, 26, 32, 33, 35), na qual os autores procuraram estabelecer uma diferenciação bioquímica dos agentes da dermatite verrucosa cromoparasitária.

Como se sabe, a morfologia macro e microscópica apresenta variações que estão em função de muitos fatores, como por exemplo, temperatura, pH e composição do meio de cultura (32). Sabe-se que os nutrientes exercem grande influência na reprodução sexuada e asssexual em fungos (12, 14). De posse desses conhecimentos, resta saber então até que ponto se deve dar importância às características morfológicas.

Os diversos métodos de estudo se completam, uns aos outros, pois é quase impossível raciocinar sobre situações novas, com dados isolados. Cada vez mais, o estudo das exigências nutritivas dos microrganismos torna de maior importância, não apenas para sistematização de características bioquímicas, que possam contribuir para a classificação, mas, igualmente, na elucidação da bioquímica funcional.

Somente a compatibilização desses conhecimentos é que poderá explicar as interações dos microrganismos com o meio ambiente.

Tendo em vista as considerações acima, propomos um meio quimicamente definido que permite o crescimento do agente da cromomicose, *F. pedrosoi*.

Material e Métodos

Amostra - *F. pedrosoi* isolado de paciente da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, através biópsia da lesão, foi mantido na Micoteca do Departamento de Microbiologia da U.F.M.G. sob o nº 25.

Manutenção - A amostra vem sendo mantida em laboratório, desde 1974, em meio de Sabouraud (Tabela 1), com repiques mensais.

Inóculo - A amostra de *F. pedrosoi* foi inicialmente cultivada em Czapeck-Dox (Tabela 1) com extrato de levedura a 28°C, em tubos 18x180mm. Após sete dias de crescimento, um fragmento da cultura era homogeneizado em "Tissue-grinder", com solução salina estéril. A suspensão assim obtida era inoculada em frascos de soro contendo aproximadamente 50ml do meio Czapeck-dox, sem extrato de levedura (Tabela 1).

Tal procedimento, apesar de proporcionar crescimento mais pobre, permitia melhor rendimento em esporos. Estes eram posteriormente retirados com solução salina estéril, lavados a 3.000rpm por 30 mi-

Tabela 1 - Composição dos meios de cultura utilizados para o cultivo de *Fonsecaea pedrosoi*

Constituintes g/l	Sabouraud	Czaapeck I	Czaapeck II	Smith	Yeast N. Base + vitaminas*
Glicose	2,0	-	-	0,5	1,0
Sacarose	-	3,0	3,0	-	-
Glicerina	-	-	-	2,5ml	-
Asparagina	-	-	-	0,7	-
Citrato de sódio	-	-	-	0,03	-
Citrato férreo amoniacal	-	-	-	0,03	-
Nitrito de sódio	-	0,3	0,3	-	-
Cloreto de amônio	-	-	-	0,7	-
Sulfato de amônio	-	-	-	-	0,5
Sulfato de magnésio	-	0,05	0,05	0,15	0,05
Sulfato ferroso	-	0,001	0,001	-	-
Cloreto de potássio	-	0,05	0,05	-	-
Cloreto de sódio	-	-	-	-	0,01
KH ₂ PO ₄	-	-	-	0,12	0,1
K ₂ HPO ₄	-	0,1	0,1	-	-
Peptona	1,0	-	-	-	-
Extracto de levedura	0,5	1,0	-	-	-
* Mistura de vitaminas	-	-	-	-	+

pH = 6,5

Inóculo = 0,2ml de uma suspensão com 10⁸ esporos/ml

H₂O de destilada q.s.p.

* Mistura de vitaminas: biotina 0,2ug/l; pantotenato de cálcio 40ug/l; imidazole 200ug/l; niacina 40ug/l; PABA 200ug/l; piridoxina 200ug/l; cloramina 60ug/l; riboflavina 20ug/l.

nutos com a mesma solução, contados em câmera de Newbauer e ajustados para concentração de 10⁸ esporos/ml. Um inóculo de 0,2ml desta suspensão final foi utilizado nos experimentos. Evitou-se usar o micélio danificado (homogeneizado no "tissue-grinder").

Estimativa de crescimento - A quase totalidade das experiências teve sua estimativa através da determinação da turvação, em fotocolorímetro Klett-Summerson, utilizando-se filtro verde (540nm). Os resultados foram expressos em unidades Klett (UK) e representam a média de pelo menos três determinações em duplicata. Para a curva de crescimento de *F. pedrosoi*, a 28°C (Figura 5), foi feita avaliação através da determinação do peso seco.

Resultados e Discussão

A falta de dados na literatura, com relação a estudos sobre a biologia dos agentes da cromomicose, estimulou a realização de experimento preliminar, com o intuito de verificar o comportamento de *F. pedrosoi* em alguns meios de cultura de uso corrente em micologia. Neste propósito, esperava-se obter alguma informação que pudesse conduzir a procedimento mais adequado, visando a determinação de meio quimicamente definido para cultivo de *F. pedrosoi*.

O comportamento do fungo foi verificado nos seguintes meios de cultura líquidos (Tabela 1): Sabouraud; Czaapeck Dox I; Czaapeck II; "Yeast Nitrogen Base" (Wickerham & Burton, 1948); Smith (Smith, 1948).

Repiques sucessivos, nesses meios, mostraram que Sabouraud líquido, Czaapeck Dox I e "Yeast Nitrogen Base" foram bastante eficientes na manutenção da amostra de *F. pedrosoi* por seis passagens sucessivas.

Os meios Czaapeck-Dox II e Smith foram ineficientes, não suportando o crescimento do microrganismo por mais de cinco sub-culturas. Os resultados desses experimentos encontram-se na Tabela 2.

Exigência de vitaminas - Para verificar a exigência de vitaminas no crescimento de *F. pedrosoi*, foram testadas as oito, existentes no meio "Yeast Nitrogen Base", mantendo-se as respectivas concentrações. A técnica de omissão foi utilizada para o estudo do requerimento de vitaminas. Utilizando-se passagens sucessivas, verificou-se que *F. pedrosoi* exige tiamina como fator essencial de crescimento. (Tabela 3).

Tabela 2 - Crescimento e sub-culturas de *Fonsecaea pedrosoi* em diferentes meios

Meio de cultura	Crescimento(U.K) nas diversas passagens						
	0	1a*	2a	3a	4a	5a	6a
Sabouraud (líquido)	110	105	098	112	099	100	116
Czaapeck-Dox I	100	112	104	109	110	105	113
Czaapeck-Dox II	103	100	082	020	012	(-)	(-)
"Yeast Nitrogen Base"	210	258	240	269	251	260	268
Smith	105	093	059	023	011	(-)	(-)

* Transferência foi feita com inóculo de 0,2ml da cultura anterior, após incubação por sete dias a 28°C.

Tabela 3 - Exigência de vitaminas por *Fonsecaea pedrosoi* (Método da Exclusão)

Sistemas	Crescimento(U.K.)nas diversas passagens						
	0	1a*	2a	3a	4a	5a	6a
Meio YNB sem vitaminas (MM)	179	105	065	029	020	009	-
MM c/todas as vitaminas*	298	274	284	295	292	278	284
MM s/riboflavina	269	271	262	275	262	271	263
MM s/tiamina	181	090	059	018	012	009	-
MM s/piridoxina	279	262	265	276	280	279	278
MM s/PABA	270	260	281	280	277	280	279
MM s/niacina	239	272	260	271	269	279	268
MM s/inositol	296	271	274	269	281	278	277
MM s/pantotenato de cálcio	288	278	271	260	276	275	274
MM s/biotina	295	281	272	269	266	280	273
MM + tiamina	295	281	276	274	272	269	275

YNB = Meio de "Yeast Nitrogen Base", Tabela 1

MM = Meio YNB sem adição de vitaminas

* = Transferência foi feita com inóculo de 0,2ml da cultura após 7 dias de incubação a 28°C

** = Biocina, 0,2μg%; pantotenato de cálcio 40μg%; inositol 200μg%; niacina 40μg%; PABA 20μg%; piridoxina 20μg%; tiamina 40μg%; riboflavina 20μg%.

Sabe-se que a molécula de tiamina consiste de duas unidades: uma pirimidina e uma tiazol. Portanto, a dependência de tiamina pode ser entendida ou pela incapacidade do microrganismo em sintetizar uma das duas unidades ou então pela inabilidade em ligá-las. Muitos fungos tiamina-dependentes crescem bem com a tiamina intacta ou na presença das unidades adicionadas em concentração equimolecular, mostrando capacidade em condensar as duas metades (4). No caso de *F. pedrosoi*, testou-se apenas a molécula intacta. Não foi detectado, portanto, em que ponto se localizava a deficiência. A maioria dos fungos é capaz de sintetizar a metade tiazol da molécula de tiamina e assim exige a pirimidina (4). Como *F. pedrosoi* não requer pirimidinas, é possível que sua deficiência esteja na capacidade em sintetizar a metade tiazólica ou de condensar as duas metades. A capacidade de sintetizar a pirimidina e não a metade tiazólica, parece ser bem menos frequente. Entretanto, esta reação tem sido descrita em *Mucor ramannianus*, *Stereum frustulosum*, *Endomyces magnusii* e *Trichophyton concentricum* (1).

O efeito da tiamina sobre o crescimento de fungos foi inicialmente demonstrado em *Phycomyces blakesleanus* (1). Em seguida, grande número de investigadores demonstraram que a exigência de tiamina ocorre com bastante frequência nas grandes classes de fungos (4). Nos basidiomicetos, a maioria das espécies já investigadas são dependentes de tiamina (1).

Entre os zigomicetos, a tiamina é o único fator de crescimento necessário para a maioria das espécies testadas.

Ascomicetos muitas vezes exigem um ou mais fatores de crescimento, como biotina e piridoxina, mas sempre em acréscimo à tiamina (4).

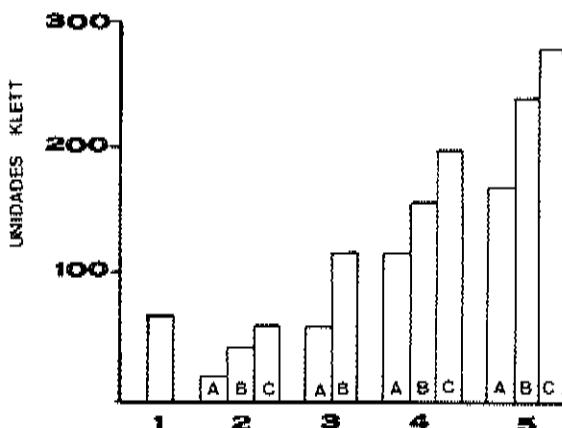
Os dermatófitos em geral ou não exigem fator de crescimento ou exigem apenas a tiamina (1). Os resultados, com respeito à exigência desta vitamina por *F. pedrosoi*, estão de acordo com os obtidos por Area Leão & Cury (6), que demonstraram a exigência por parte de *F. pedrosoi*, *F. verrucosa*, *F. compacta* e *P. jeanselmei*.

Utilização das fontes de carbono - Foi observado pequeno crescimento de *F. pedrosoi* em meio isento de fonte de carbono (Figura 1). Este resultado poderia ser explicado pela presença de reservas no fungo estudado, tendo em vista que, para o preparo do inóculo, foi utilizado um meio (Czapeck II, Tabela 1), que contém elevada quantidade de sacarose (3%). Além disso, é comum a ocorrência de glicogênio com função de reserva em outros fungos (1).

Poram bastante curiosos os resultados, quando se utilizaram ácidos aminados como única fonte de carbono. Todos eles, particularmente a asparagina, induziram crescimento menor que o obtido na ausência de qualquer fonte de carbono. O resultado obtido com a asparagina, de certa forma, está em contradição com os obtidos por Montemayor (21), que demonstrou a assimilação de asparagina por agentes da cromomicose. No entanto, as diferenças entre as condições experimentais empregadas e as amostras utilizadas poderiam explicar as diferenças obtidas.

De maneira geral, os ácidos orgânicos não são utilizados como única fonte de carbono. Somente oxalacetato estimulou o crescimento em relação ao controle. É possível que ocorram problemas de permeabilidade na entrada dos ácidos orgânicos, tendo em vista que os valores

Figura 1 - Efeito de diferentes fontes de carbono sobre o crescimento de *Fonsecaea pedrosoi*



1. Sem adição; 2. Ácidos aminados**; a) asparagina; b) cisteína; ácido aspártico, ácido glutâmico; c) prolina, alanina; 3. Ácidos orgânicos: a) citrato, piruvato, succinato, -ceto glutarato; b) oxalacetato; 4. Monosacarídios: a) manose; b) glicerol, ribose, glicose, arabinose, frutose, ramnose; c) sorbitol, galactose. 5. Dissacarídeos e trissacarídeos: a) lactose; b) sacarose, rafinose; c) maltose, trealose; * Meio Básico: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5g%; MgSO_4 , 0,05g%; CaCl_2 , 0,01g%; NaCl , 0,01g%; KH_2PO_4 , 0,1g%; tiamina, 40 μg %. ** Todos os componentes foram testados a 1g%.

de pH próximos à neutralidade não são ideais para o transporte deste grupo de substâncias através da membrana citoplasmática.

Todos os açúcares testados apresentaram efeito estimulante do crescimento, em relação ao controle. Os melhores resultados foram obtidos com sacarose, rafinose, maltose e trealose. Montemayor (21) também obteve estímulo de crescimento quando utilizou glicose, maltose e galactose. No entanto, este autor não demonstrou a assimilação de lactose por estes fungos. Os resultados observados concordam com os obtidos por Silva (32) que demonstrou o estímulo do crescimento de *F. pedrosoi* na presença dos seguintes açúcares: sacarose, glicose, frutose, arabinose, maltose e lactose. A autora demonstrou também, utilizando quatro amostras de *F. pedrosoi*, uma variabilidade quanto à resposta em presença de diferentes açúcares. Assim, *F. pedrosoi*, variedade *comunis*, utiliza eficientemente a lactose, enquanto que *F. pedrosoi*, variedade *typicus*, utiliza pouco este dissacarídio.

O bom rendimento, obtido com maltose, levou a escolher este açúcar como fonte de carbono, nas experiências sucessivas, tendo em vista, inclusive, o baixo custo deste composto.

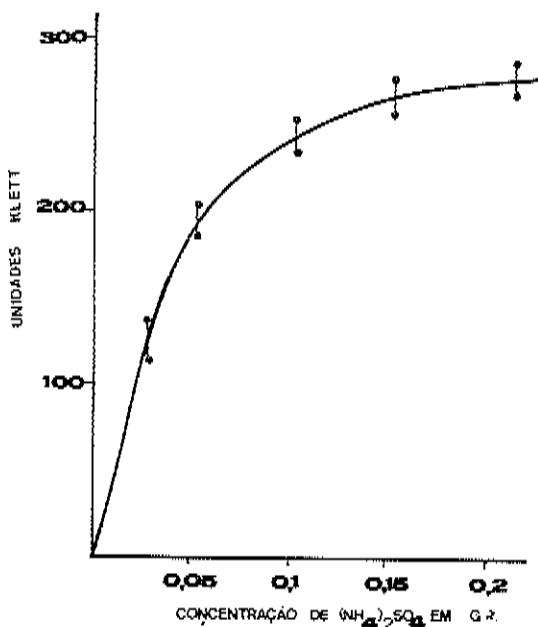
Utilização de fontes de nitrogênio - Com relação à fonte de nitrogênio para *F. pedrosoi*, foram realizadas três séries de experiências.

Na primeira delas, verificou-se qual seria a concentração ideal de nitrogênio inorgânico para o crescimento de *F. pedrosoi*. Com tal objetivo, foram testadas diversas concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Figura 2).

Na segunda série de experiências (Figura 3), foram testados 21 aminoácios, isoladamente, como fontes de nitrogênio, na concentração de 0,1g. Todos experimentos forneceram resultados equivalentes aos observados com o nitrogênio inorgânico $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, com exceção da treonina, que estimulou significativamente o crescimento de *F. pedrosoi*.

Na terceira série de experimentos, procurou-se verificar o possível estímulo de diversas fontes de nitrogênio orgânico no crescimen-

Figura 2 - Influência da concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sobre o crescimento de *Fonsecaea pedrosoi*



Meio utilizado: MgSO_4 , 0,05g%; CaCl_2 , 0,01g%; NaCl , 0,01g%; KH_2PO_4 , 0,1g%; tiamina, 40ug%; maltose, 1,0g%.

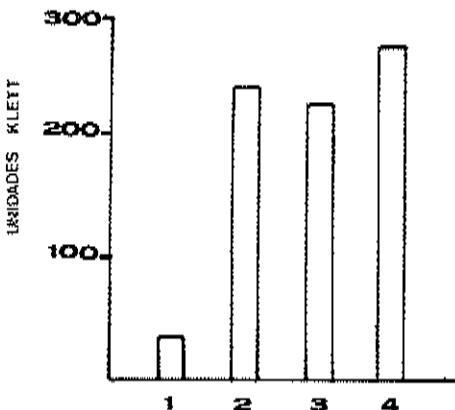
to de *F. pedrosoi* em presença de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Os resultados da Figura 4 mostram que aqui também não houve diferença significativa, em relação aos aminoácidos testados separadamente, com relação ao crescimento obtido utilizando-se sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. Foi também confirmado o efeito estimulatório em presença de treonina.

Os resultados obtidos no presente estudo, com vistas ao aproveitamento de fontes de nitrogênio por *F. pedrosoi*, demonstraram que o fungo pode utilizar fonte inorgânica de nitrogênio. Este fato ficou evidente pelos resultados apresentados nas Figuras 2 e 3. Além de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, *F. pedrosoi* pode utilizar outras fontes inorgânicas de nitrogênio, como NaNO_3 (presente no meio de Czapecck-Dox I, Tabela 1). *Fonsecaea pedrosoi*, à semelhança de outros fungos (4), cresceu bem em presença de substâncias nitrogenadas inorgânicas. Assim, os sais de amônio ou nitritos constituem fontes de nitrogênio adequadas para o crescimento da grande maioria dos fungos (1).

Todos os ácidos aminados testados foram utilizados, resultando um crescimento semelhante ao obtido com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Figura 3). A única exceção foi verificada quando se utilizou treonina, que apresentou um estímulo significativo sobre o crescimento do fungo.

Silva (33) observou uma exigência absoluta de fonte de nitrogênio orgânico para uma amostra de *P. jeanselmei*, sendo que para outras amostras *P. verrucosa* e *P. obscura*, a fonte orgânica de nitrogênio apresentou efeito estimulante. A autora também observou que, com a adição de NaNO_3 em substituição ao NH_4Cl , ocorreu maior esporulação do tipo pseudo-acroteca.

Figura 3 - Efeito de diferentes fontes de nitrogênio sobre o crescimento de *Fonsecaea pedrosoi*



1. Sem adição; 2. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,1g%); 3. Alanina; arginina; asparagina; ácido aspártico; cisteína; ácido glutâmico; glutamina; histidína; isoleucina; hidroxiprolína; leucina; lisína; metionina; fenilalanina; prolína; serina; triptofano; tirosina; valina (0,2g%); 4. Treonina (0,1g%). Meio utilizado: MgSO_4 , 0,05g%; CaCl_2 , 0,1g%; NaCl , 0,01g%; KH_2PO_4 , 0,1g%; tiamina 40 $\mu\text{g}\%$, maltose 1,0g%

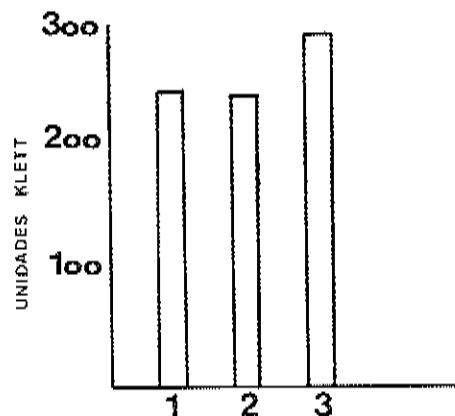
Treonina foi capaz de estimular o crescimento de *F. pedrosoi*, mesmo na presença de uma fonte inorgânica de nitrogênio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Figura 4). Este resultado sugere que a treonina, além de prover nitrogênio, pode estar implicada em outras funções. Uma possibilidade é a treonina ser precursora de lipídios, através da produção de acetato, que ocorre em tripanosomatídeo e resulta da clivagem de treonina em acetato e glicina (17).

Além disso, não pode ser afastada a possibilidade da treonina ser utilizada pelo menos em parte na formação de polímeros de superfície em *F. pedrosoi*. De fato, em leveduras, algumas unidades de manose, da parede celular, estão associadas, como oligossacarídis, a uma cadeia polipeptídica através de ligação com treonina e serina (7). Contudo, a maioria das unidades de manose está ligada à asparagina, componente da cadeia polipeptídica, via N-acetyl-D-glucosamina (7).

Curva de crescimento - Para concluir os experimentos, foi feita a curva de crescimento de *F. pedrosoi* no meio definido (Tabela 4). Comparando-a com aquela do meio de Sabouraud (Figura 5), constata-se que o crescimento do microrganismo é aproximadamente o mesmo nos dois casos. Entretanto, enquanto a fase logarítmica se inicia a partir do 5º dia no meio de Sabouraud (Tabela 1), no meio definido (Tabela 4) a fase "log" começa a partir do 3º dia. Embora o inóculo para o experimento tivesse vindo do mesmo meio (Czapecz-Dox III), verifica-se a redução na fase "log", no meio definido.

O meio proposto no presente trabalho (Tabela 4), apesar de não ser o único meio definido para *F. pedrosoi*, apresenta a vantagem de ser bastante simples, quanto ao número de componentes e de ser um meio mínimo, ao contrário do meio "Yeast Nitrogen Base", que contém elevado número de vitaminas, que não são exigidas por *F. pedrosoi*. O meio introduzido poderá ser utilizado para o estudo da composição química do fungo, sem interferência de substâncias complexas ou compostos não exigidos e que estejam presentes no meio de cultura. Ao mesmo tempo, pode ser utilizado para a obtenção de抗ígenos e no estudo da seleção de novas drogas que atuem no fungo, eliminando-se o possível efeito de substâncias reversoras. Por outro lado, estudos

Figura 4 - Efeito de fontes orgânicas de nitrogênio no crescimento de *Fonsecacea pedrosoi* cultivado em meio provido de fonte inorgânica de nitrogênio



1. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,1g%); 2. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,1g%) + alanina; arginina; asparagina; ácido aspártico; cisteína; cistina; ácido glutâmico; glutamina; histidina; isoleucina; hidroxiprolina; leucina; lisina; metionina; fenilalanina; prolina; serina; triptofano; tirosina; valina (0,1g%); 3. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,1g%) + treonina (0,1g%). Meio utilizado: MgSO_4 , 0,05g%; CaCl_2 , 0,01g%; NaCl , 0,01g%; KH_2PO_4 , 0,1g%; tiamina 40 μg ; maltose, 1,0g%.

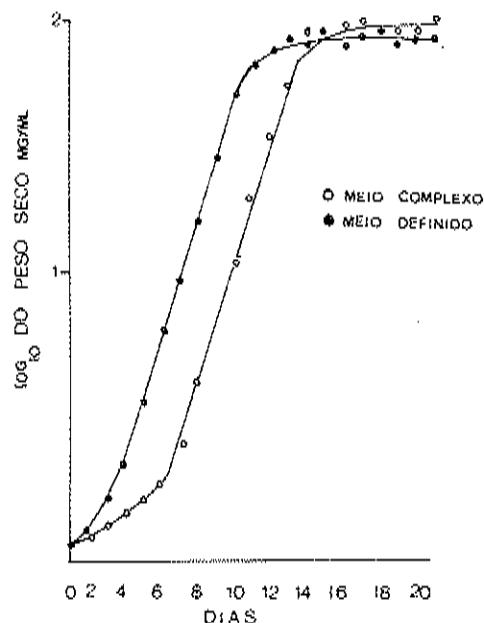
subsequentes sobre alterações qualitativas do meio, poderiam induzir a diferenciação do fungo, da forma vegetativa para a parasitária,

Tabela 4 - Meio mínimo definido para o cultivo de *Fonsecacea pedrosoi*

Componentes	q.t	Procedência
Maltose	1,0	Difco
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,1	Merck
KH_2PO_4	0,1	Carlo Erba
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05	Sigma
NaCl	0,01	Sigma
Treonina	0,1	Merck
Tiamina	40 μg	Sigma
H_2O q.s.p. 100ml		

pH = 6,5.

Figura 5 - Curva de crescimento de *Fonsecacea pedrosoi* no meio complexo e meio definido



fornecendo informações relevantes, relacionadas ao mecanismo desta diferenciação.

Os fungos estão entre os microrganismos mais ubiquitários, crescendo em uma grande variedade de meios e sob diversas condições. Portanto, a seleção das condições de crescimento dependerá em parte do propósito do estudo a ser desenvolvido.

Agradecimentos

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Banco Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/Fundo Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/Projeto nº 62; e Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP.

Referências Bibliográficas

1. Ainsworth, G.C. & Susman, A.S., eds. - *The fungi: an advanced treatise*. New York, Academic Press, 1965.
2. Ajello, L. & Runyon, L. - Abortive "perithecial" production by *Phialophora verrucosa*. *Mycologia*, 45:947-950, 1954.
3. Al-Doory, Y. & Pairan, R. - A bibliography of chromomycosis. *Mycopathol. Mycol. Appl.*, 54:91-109, 1974.
4. Altman, P.L. & Dittmer, D.S., comp. - *Metabolism*. Bethesda, Federation of American Societies for Experimental Biology, c1968.
5. Arellano, O.; Tamayo, P.R. & Victoria, V.R. - Bio-geographic characteristics of the region where the first 4 cases of chromomycosis caused by *Cladosporium carrionii* were found. *Invest. Salud Pública*, 31:78-96, 1971.
6. Area Leão, A.E. & Cury, A. - Deficiências vitaminicas de cogumes patogênicos. *Mycopathol. Mycol. Applic.*, 5:65-68, 1950.
7. Ballon, E.C. - Some aspects of the structure, immunochemistry and genetic control of yeast mannans. *Adv. in Enzymology*, 40: 239-269, 1974.
8. Brygoo, E.R. & Secretáin, G. - Étude épidémiologique et mycologique de la chromoblastomycose à Madagascar. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 53:443-475, 1960.
9. Brygoo, E.R. & Destombes, P. - Epidemiologie de la chromoblastomycose humaine. *Bull. Inst. Pasteur*, 74:219-243, 1976.
10. Butterfield, W. & Shumg, J.C. - Effect of carbon source on conidiogenesis in *Fonsecaea dermatitidis*, agent of chromomycosis. *Mycopathologia*, 58:59-62, 1976.
11. Carríon, A.L. & Silva, M.H. - Taxonomic criteria for the fungi of chromoblastomycosis with reference to *Fonsecaea pedrosoi*. *Int. J. Dermatol.*, 10:35-43, 1971.
12. Cole, G.T. & Kendrick, B. - Taxonomic study of *Phialophora*. *Mycologia*, 55:661-688, 1973.
13. Fuentes, C.A. & Bosch, E.Z. - Biochemical differentiation of the etiologic agents of Chromoblastomycosis from nonpathogenic *Cla-dosprium species*. *J. Invest. Dermatol.*, 34:419-423, 1960.

14. Hawker, L.E. - The physiology of reproduction in fungi. London, Cambridge Univ. Press, 1957.
15. Howard, D.H. - The morphogenesis of the parasitic forms of dimorphic fungi: a review. *Mycopathol. Mycol. Appl.*, 18:127-131, 1962.
16. Jotisankasa, V.; Nielsen, H.S. & Conant, F.N. - *Phialophora dermatitidis*: its morphology and biology. *Sabouraudia*, 8:98-107, 1970.
17. Kross, G.A.M.; Klein, R.A. & Kinstead, D.J. - Utilization of amino acids by *Trypanosoma brucei* in culture: L-threonine as a precursor for acetate. *Parasitology*, 71:311-326, 1971.
18. Lacaz, C.S. - Aspectos clínicos e epidemiológicos das micoses profundas na América do Sul. *Mycopathol. Mycol. Appl.*, 10:353-378, 1958.
19. Londero, A.T. & Ramos, D.C. - Chromomycosis: a clinical and mycologic study of thirty-five cases observed in the Hinterland of Rio Grande do Sul. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 25:132-135, 1976.
20. Mackinnon, J.E. - Regional peculiarities of some deep mycosis. *Mycopathol. Mycol. Appl.*, 46:249-265, 1972.
21. Montemayor, L. - Estudio de las propriedades biológicas de varias cepas de hongos patógenos y especies vicinas. *Mycopathol. Mycol. Appl.*, 4:379-383, 1949.
22. Nickerson, W.J. & Edwards, G.A. - Studies on the physiological bases of morphogenesis in fungi. I - The respiratory metabolism of dimorphic pathogenic fungi. *J. Gen. Physiol.*, 33:41-55, 1949.
23. O'Campo, F.A. - Estudio epidemiológico de la cromomicosis en México. *Medna Cutanea*, 6:309-319, 1972.
24. Oliveira, L.G.; Resende, M.A.; Lopes, C.F. & Cisalpino, E.O. Isolamento e identificação dos agentes da cromomicose em Belo Horizonte. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 7:7-10, 1973.
25. Oujezdsky, K.B.; Brove, S.N. & Szaniszlo, P.J. - Morphological and structural changes during the yeast-to-mold conversion of *Phialophora dermatitidis*. *J. Bacteriol.*, 113:468-477, 1973.
26. Pagnocca, F.C. - Alguns aspectos do metabolismo do *Cladoporus carrionii*, Trejos (1954). Belo Horizonte, 1976. 47p. (Tese de Mestrado).
27. Reiss, E. & Nickerson, W.J. - Control of dimorphism in *Phialophora verrucosa*. *Sabouraudia*, 12:202-213, 1971.
28. Resende, M.A. - Metabolismo oxidativo de formas de cultura de *Ponseaea pedrosoi* (Brumpt) Negroni, 1936. Belo Horizonte, 1975. 47p. (Tese de Mestrado).
29. Rippon, J.W. - Medical mycology. Philadelphia, W.B. Saunders, 1974.
30. Silva, M.H. - Influence of culture media on sporulation and growth of various fungus isolates from chromoblastomycosis. *Am. J. Bot.*, 36:815-819, 1949.
31. Silva, M.H. - The parasitic phase of the fungi of chromoblastomycosis development of sclerotic cells *in vitro* and *in vivo*. *Mycologia*, 49:318-331, 1957.

32. Silva, M.H. - The saprophytic phase of the fungi of chromoblastomycosis: effect of nutrients and temperature upon growth and morphology. *Trans. N.Y. Acad. Sci.*, 21:46-57, 1958.
33. Silva, M.H. - Growth characteristics of the fungi of chromoblastomycosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 89:17-29, 1960.
34. Silva, M.H. & Carrion, A.L. - Differential characteristics of the fungal agents of chromoblastomycosis. *Pan Am. Health Organ. Sci. Publ.*, 304:118-124, 1975.
35. West, B. - Nutrition of *Phialophora verrucosa* A 126. *Mycopathol. Mycol. Appl.*, 31:12-15, 1967.

IMPETIGO IN RIO DE JANEIRO: STREPTOCOCCAL AND STAPHYLOCOCCAL ISOLATES FROM SKINS LESIONS, NOSE AND THROAT IN CHILDREN

Leslie C. Benchetrit
Armando Alves Borges-Neto
Dept. of Medical Microbiology
Institute of Microbiology UFRJ
Caixa Postal 68040
21944 Rio de Janeiro RJ, Brazil

Ignácio Obadia
Dept. of Pediatrics, UFRJ
Ilha do Fundão
21944 Rio de Janeiro RJ, Brazil

Myrthes Amorelli Gonzaga
Hospital Municipal Jesus
20000 Rio de Janeiro RJ, Brazil

Richard R. Facklam
& Lúcia Martins Teixeira
Staphylococcus and Streptococcus
Section, Centers for Disease Control
Atlanta, GA, 30333, USA

Summary

Streptococcal impetigo was investigated in 64 children. Skin lesions were cultured to yield group A streptococci or *Staphylococcus aureus* or both from 43 of 64 lesions. *S. epidermidis* was isolated from 4 lesions. Only 11 of the 38 group A strains were M-typable. Eight of the 9 strains with the T-pattern 3/13/B3264 were M-typable. Phage types of group II accounted for the majority of staphylococcal isolates from impetiginous lesions.

Resumo

Impetigo no Rio de Janeiro: estreptococos e estafilococos isolados de lesões cutâneas, nariz e garganta de crianças

O impetigo estreptocócico foi pesquisado em 64 crianças. Estreptococos do grupo A ou *Staphylococcus aureus* ou ambas as bactérias foram obtidas de 43 das 64 lesões da pele de que se fez cultura. *S. epidermidis* foi isolado de 4 lesões. Apenas 11 das 38 amostras do grupo A foram tipáveis com antissoros M. Oito das 9 amostras com o padrão T 3/13/B3264 foram tipáveis com antissoros M. Estafilococos com fagotipos do grupo II foram os mais freqüentes nas lesões impetiginosas.

Introduction

Various studies have confirmed that group A streptococci and *Staphylococcus aureus* are the organisms most often implicated in the epidemiology of the streptococcal skin disease (4, 17, 24). Difficulty to M-type "skin" strains of group A streptococci has been reported and the serum opacity reaction has also been used in classifying the

strains (14, 23). Production of the opacity factor (OF) can be a valuable tool in differentiating M-nontypable isolates that have the same T-typing pattern and could either lack M antigen or represent new M types. Phage typing allows a more precise differentiation of *S. aureus* isolated from skin lesions (3, 16, 17).

Impetigo contagiosa (impetigo) continues to be a common skin disease in pediatrics populations of tropical and subtropical countries (15, 20). In earlier studies from Brazil, streptococcal pyoderma strains from patients with acute glomerulonephritis, were identified by T agglutination; T-types 3/13/B3264 and 8/25/Imp.19 were reported (18) and identified again in later studies together with T-types 1, 11, 13, 28(21), 2, 3, 2/4, 2/28, 6, 12, 15/17/23/47/19, 55(12) and 14(19). Some of these isolates were M typable. In a survey among amerindian populations of Amazonia, groups A and G streptococci, *S. aureus* and *C. diphtheriae* were isolated from skin lesions. Five of the 37 strains examined at the Centers for Disease Control were M-typable (11).

We report here studies on strains of group A streptococci and *S. aureus* cultured from skin lesions in a group of children with impetigo in the urban area of Rio de Janeiro.

Material and Methods

Clinical material - Strains of beta-hemolytic streptococci and staphylococci reported here were collected from October 1978 until March 1979. The study period corresponded to late Spring and Summer with hot climate and high degrees of humidity. Sixty four children between the ages of 5 months and 14 years were examined. These children were eligible for the study because the pediatric dermatologists considered they had streptococcal skin infection based on clinical evidence. Cultures of skin lesions (one for each child) including pustular, crusty and healed lesions, were obtained when the patients were seen by the physicians. Swabs were also taken from nose and throat. The children were not cultured again. Specimens were swabbed immediately on plates containing tryptose blood agar (Bifco Laboratories, Detroit, MI, USA) and 5% sheep blood and incubated for 18 hr at 35°C. Streptococci and staphylococci were picked from these plates and checked for purity before further identification.

Methods for streptococcal studies - Streptococcal isolates were tested by the bacitracin disk method of Maxted (13) for the presumptive identification of strains as group A streptococci. This was followed by serological grouping with use of acid extracts prepared by the nitrous acid procedure of El Kholy & col. (6). All strains were also grouped by the method of Lancefield (10). Streptococcal grouping sera were prepared in Rio de Janeiro. Group A strains were further classified by T-protein agglutination patterns (8) and M-protein precipitation reaction (22). Sera for T-agglutination and M-typing were from the Centers for Disease Control. The strains were also tested for the production of the serum opacity factor (14, 23).

Methods for staphylococcal studies - The following tests were performed on strains of *Staphylococcus aureus* isolated from the original blood agar plate. 1 - Catalase test - isolated colonies tested for the production of gas bubbles with hydrogen peroxide. 2 - Coagulase test - tube tests for free coagulase using rabbit citrated-plasma were made with single colonies (1, 7). The clumping factor

was demonstrated by the slide test using human plasma. 3 - Carbohydrate dissimilation - the production of acid from mannitol under aerobic and anaerobic conditions was tested for as described by Baird-Parker (1). 4 - Deoxyribonuclease production - this was determined by the toluidine blue - DNA - agar microslide method of Lachica & col. (9). 5 - Phage-typing was carried out by the Staphylococcal Reference Laboratory of the Medical School of Ribeirão Preto, SP, Brazil, according to the methods described by Blair & Williams (3) and Parker (16). Strains untypable at routine test dilution (RTD) were restested at 100 x RTD.

Antimicrobial susceptibility tests - Streptococcal and staphylococcal strains were tested by the disk diffusion method for their susceptibility to antimicrobics using sheep blood-supplemented Mueller-Hinton agar (2).

Results

Fifty five cultures were positive for beta-hemolytic streptococci. Table 1 shows the number of children with positive cultures at given sites. Fifteen skin lesions did not yield any of the 2 species of gram-positive cocci. Group A streptococci were recovered from 38 of the remaining 49 skin lesions. Group C and G accounted for the remaining 2 beta-hemolytic streptococci isolated. An additional 8 group A streptococci were isolated from either the throat or the nose of the children. Staphylococcal strains were isolated from 24 skin lesions.

Table 1 - Distribution of bacterial isolates by sites cultured in the 64 children examined

Organism isolated	Number of children with culture positive at any site	Number of culture sites positive	Sites cultured and number of children positive at given positive sites		
			Skin lesions	Throat	Nose
Beta-hemolytic streptococcus	40	55	40 ^a	17 ^b	4 ^c
Staphylococcus aureus	22	32	20	3	9
Staphylococcus epidermidis	4	4	4	0	0

a. Groups A (38 strains), C and G (one strain each) streptococci; b. Groups A (4 strains), B and C (2 strains each) and G streptococci; c. Group A streptococci.

Table 2 shows the distribution of the bacterial genera recovered from the lesions. Group A streptococcus (23 strains) was more commonly isolated in pure culture than other bacteria. Streptococci and staphylococci coexisted in 15 of the skin lesions. Pure staphylococcal lesions occurred in 8 instances. Recovery of *S. epidermidis* along with group A streptococcus occurred in 3 instances.

Group A streptococci from skin lesions were classified serologically and are shown in Table 3. One strain was M-and T-nontypable and OF negative. The agglutination patterns known to be commonly

Table 2 - Bacterial isolates and bacteriophage types of *Staphylococcus aureus* from skin lesions

Bacterial isolates	Number of skin lesions positive (64) ^a	Bacteriophage types of <i>S. aureus</i>
Group A streptococcus only	23	
Group C streptococcus only	1	
Group G streptococcus only	1	
<i>S. aureus</i> only	8 ^b	29, 3C, 3A/3C/71, 53/54/55, 53/83A, D11
<i>S. epidermidis</i> only	1	
Group A streptococcus and <i>S. aureus</i>	12 ^c	3C, 3A/3C/71, 3C/55/71, 53/83A, 54/84/85, 81/6/42E/ 47/84, 86, 94/96, 96
Group A streptococcus and <i>S. epidermidis</i>	3	

a. Total number of skin lesion cultured; b. Two strains were not phage typable; c. Two strains of *S. aureus* were not phage typable and 3 strains were lysed by phage type 71.

associated with pyoderma (5, 17, 20), 8/25/Imp.19 and 3/13/B3264, accounted for 3 and 9 of the strains classified respectively. Eight of the strains sharing antigens in the 3/13/B3264 type were M-typable. Twenty seven of the 38 group A strains were not M-typable with available M-antisera. Three T-4 strains were OF - positive and did not give precipitation reactions with available M antisera. All isolates of the T-typing complex 3/13/B3264 were OF - negative. One T-4, M-60 strain did not produce the opacity factor. The four M-32 strains that agglutinated in the 3/13/B3264 pattern did not produce the opacity factor either. One boy was carrying a M-nontypable OF - positive strain of the T-typing complex 8/24/Imp. 19/2 at all 3 sites. One boy had a T-4, M-nontypable OF - positive strain at 2 sites (skin and nose) and his brother carried the same strain in a skin lesion; staphylococcal phage type 71 was encountered in skin lesions of the 2 children. A girl had a T-11, M-11, OF-positive strain isolated from an impetigenous lesion and from the nose; however her sister was carrying a T-11, M-nontypable, OF - positive strain in a skin lesion. Two sisters were carrying the same strain (T-4, M-60, OF - positive) in skin lesions; one of them had also the strain in the nose. Two brothers and their sister were carrying T-11, M-nontypable strains in skin lesions and 2 of the 3 isolates were OF - negative; however the girl had a T-11, M-nontypable, OF - positive strain in the throat.

Eighteen of the *S. aureus* isolates recovered from skin lesions were phage typable either at RTD or at 100 x RTD. The distribution of staphylococcal phage in pure cultures and mixed cultures from lesions is shown in Table 2. Staphylococci of phage group II (3A, 3C, 55 and 71) accounted for the majority of staphylococcal strains.

S. aureus strains from 3 skin lesions were lysed by phage 71.

Table 3 - Serological classification and serum opacity reaction of group A streptococci recovered from skin lesions^a

T-pattern	M-type	Serum opacity reaction	No of strains
B3264	NT ^b	- ^c	1
3/13/B3264	32	-	4
3/13/B3264	39	-	1
3/13/B3264	42	-	1
3/13/B3264	69	-	2
3/13/B3264	NT	-	1
4	60	+	1
4	60	-	1
4	NT	+	3
6/23	NT	+	3
11	NT	+	4
11	NT	-	5
11/12/14	NT	+	1
5/27/44	NT	-	1
5/11/12/27/28	70	+	1
5/11/12/27/28/44	NT	+	1
5/11/12/14/27/44	NT	+	1
14	NT	+	1
14	NT	-	1
8/25/Imp 19	NT	+	1
8/25/Imp 19/2	NT	+	1
8/25/Imp 19/4	NT	+	1
NT	NT	-	1
		Total	38

a. The standard set of T-agglutination antisera included the following pools and individual antisera: "T" pool: 1, 3, 13, 83264; "U" pool: 2, 4, 6, 28; "W" pool: 5, 11, 12, 22, 27, 44; "X" pool: 8, 14, 25; Imp. 19; "Y" pool: 22, 23; "Z" pool: 9-18. M-antisera included antisera for M-types 1-6, 8, 11, 12, 14, 15, 17-19, 23-27, 29-33, 36-43, 46, 47, 49, 51-57, 60, 65 and provisional types 68-74. b. NT, Not typable. c. +, Serum opacity reaction positive; -, Serum opacity reaction negative.

The activity *in vitro* of aminoglycosides, cephalosporins and other antimicrobial agents against streptococcal and staphylococcal isolates from skin lesions is shown in Table 4. All group A streptococci were susceptible to ampicillin, carbenicillin, penicillin G, chloramphenicol, lincomycin, erythromycin, cephalothin and the new antibiotic, cefoxitin. All *S. aureus* isolates were susceptible to amikacin, gentamicin, bacitracin and cephalothin. Two of the 20 staphylococcal strains were resistant to chloramphenicol, streptomycin and kanamycin. A group A and the group G strains were isolated from the same skin lesions culture and behaved identically for each antibiotic.

Discussion

In the study reported here, serological classification of 38 group A streptococci isolated from skin lesions confirmed the relation between the T-agglutination patterns 3/13/B3264, 8/25/Imp.19 and pyoderma (5, 18, 20, 24). The absence of M-types 14, 49 and 55 should

Table 4 - Antimicrobial susceptibility of group A streptococci and *S. aureus* strains isolated from skin lesions^a

Antimicrobial agent	Group A streptococci (39) ^b	<i>S. aureus</i> (20)
Amikacin	ND ^c	20 ^d
Gentamicin	18	20
Kanamycin	1	18
Neomycin	0	ND
Streptomycin	ND	18
Ampicillin	38	ND
Penicillin G	38	2
Carbenicillin	38	ND
Cefoxitin	38	ND
Cephalexin	38	20
Bacitracin	ND	20
Chloramphenicol	38	18
Colistin	0	ND
Erythromycin	38	13
Lincosamide	38	ND
Nalidixic acid	0	ND
Tetracycline	10	16
Sulphamethoxazole/ Trimethoprim	1	16

^a. Susceptibility of organisms to antimicrobials was determined by the disk diffusion method (1); ^b. Total number of strains tested; ^c. ND, Not done; ^d. Number of strains susceptible.

be noted even though only 11 of the group A strains were M-typable. Eight of the 9 strains agglutinated by 3/13/B3264 antisera were M-typable. This could support the hypothesis that common pyoderma strains form M-antigens. With regard to the production of the serum opacity factor by our streptococcal strains, there was a good agreement with the results reported in other studies (14, 23). Five of the nine T-11 strains were OF - negative. This raises the possibility that two different M types were present. It should also be kept in mind that 2 of the four T-11, M-nontypable strains carried by 2 brothers and their sister did not produce the opacity factor and that only one of the two T-11 OF-positive strains isolated from skin lesions in 2 sisters gave a precipitation reaction with antiserum for M type II.

Phage types of group II (2A, 3C, 55 and 71) commonly associated with staphylococcal skin infections (4, 17) accounted for the majority of *S. aureus* isolates from our skin lesions although their clinical appearance was that of streptococcal lesions. Phage type 75 was not encountered in skin lesions. Different results have been reported by other investigators who have emphasized the almost total absence of phage group II staphylococci and recovered phage type 75 from 58% of skin lesions (4).

The presence of *S. epidermidis* in 4 lesions supports the observation that further investigations are required to gather information on the possible role of the bacterium in the epidemiology of skin infections (2, 11).

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Brazilian National Research Council (to Dr. Benchetrit), CEPG (Federal University, Rio de Janeiro) and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP). Lucia Martins Teixeira is the recipient of a fellowship from the National Research Council (Brasilia).

We thank Drs. Elisa Gastão da Cunha Penido and Carlos Solé-Vernin for assistance in staphylococcal studies.

References

1. Baird-Parker, A.C. - A classification of micrococci and staphylococci based on physiological and biochemical tests. *J. Gen. Microbiol.*, 30:409-427, 1963.
2. Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M.; Sherris, J.C. & Turck, M. - Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45:493-496, 1966.
3. Blair, J.E. & Williams, R.E.O. - Phage typing of staphylococci. *Bull. Wld. Hth. Org.*, 24:771-784, 1961.
4. Dajani, A.S.; Ferrieri, P. & Wannamaker, L.W. - Natural history of impetigo. II - Etiologic agents and bacterial interactions. *J. Clin. Invest.*, 51:2863-2871, 1972.
5. Dillon, H.C.; Derrick, C.W. & Dillon, M.S.M. - Antigens common to pyoderma and acute glomerulonephritis. *J. Infect. Dis.*, 130:257-267, 1974.
6. El Kholy, A.; Wannamaker, L.W. & Krause, R.M. - Simplified extraction procedure for serological grouping of beta-hemolytic streptococci. *Appl. Microbiol.*, 28:836-839, 1974.
7. Fisk, A. - The technique of the coagulase test for staphylococci. *Brit. J. Exp. Pathol.*, 21:311-314, 1940.
8. Griffith, F.-Serologic classification of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Hyg. (Camb.)*, 34:542-584, 1934.
9. Lachica, R.V.F.; Genigeorgis, C. & Hoeprich, P.D. - Metachromatic agar-diffusion methods for detecting staphylococcal nucleic acid activity. *Appl. Microbiol.*, 21:585-587, 1971.
10. Lancefield, R.C. - A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.*, 57:571-595, 1933.
11. Lawrence, D.N.; Facklam, R.R.; Sotthenek, F.O.; Hancock, G.A.; Neel, J.V. & Salzano, F.M. - Epidemiologic studies among amerindian populations of Amazonia. I - Pyoderma: prevalence and associated pathogens. *Am. J. Trop. Hyg.*, 28:548-558, 1979.
12. Martini, A.S.; Solé-Vernin, C. & Da Silva, E.M.C. - Aspectos bacteriológicos e epidemiológicos na glomerulonefrite difusa aguda (pós-estreptocócica) de casos esporádicos em Londrina, PR. *Rev. Microbiol. (São Paulo)*, 9:62-70, 1978.

13. Maxted, W.R. - The use of bacitracin for identifying group A haemolytic streptococci. *J. Clin. Pathol.*, 6:224-226, 1953.
14. Maxted, W.R.; Widdowson, J.P.; Fraser, C.A.M.; Ball, L.C. & Bassett, D.C. - The use of the serum opacity reaction in the typing of group A streptococci. *J. Med. Microbiol.*, 6:83-90, 1973.
15. Mehta, G.; Prakash, K. & Sharma, K.B. - Streptococcal pyoderma and acute glomerulonephritis in children. *Indian J. Med. Res.*, 71:692-700, 1980.
16. Parker, M.T. - Phage-typing of *Staphylococcus aureus*. In:-Norris, J.R. & Ribbons, D.W., eds. - Methods in microbiology. London/New York, Academic Press, 1972.
17. Parker, M.T.; Tomlison, A.J.H. & Williams, R.E.O. - Impetigo contagiosa: the association of certain types of *Staphylococcus aureus* and of *Streptococcus pyogenes* with superficial skin infections. *J. Hyg. (Camb.)*, 53:458-473, 1955.
18. Rigatto, H.; Nogueira, J.L.; Solé-Vernin, C.; Córrea, C.E.C.; Dabori, A. & Cicogne, A.C. - Glomerulonefrite aguda: estudo de um surto familiar com levantamento epidemiológico. *Rev. Paul. Med.*, 73:53-64, 1968.
19. Salles, B. de Campos - Aspectos clínicos, epidemiológicos e bacteriológico da glomerulonefrite aguda pós-estreptocócica na região de Ribeirão Preto. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, 1980. (Tese de Doutorado).
20. Sharrett, A.R.; Finklea, J.F.; Potter, E.V.; Poon-King, T. & Earle, D.P. - The control of streptococcal skin infections in South Trinidad. *Am. J. Epidemiol.*, 99:408-413, 1974.
21. Solé-Vernin, C. & Moody, M.D.-Beta-hemolytic streptococci grouping and group A typing in Ribeirão Preto, SP, Brasil, 1966-1970. *Rev. Inst. Med. Trop. (São Paulo)*, 15:272-283, 1973.
22. Swift, H.F.; Wilson, A.T. & Lancefield, R.C. - Typing group A hemolytic streptococci by M precipitation reactions in capillary pipettes. *J. Exp. Med.*, 78:127-133, 1943.
23. Top Jr., F.H. & Wannamaker, L.W.-The serum opacity reaction of *Streptococcus pyogenes*: frequency of production of streptococcal lipoproteinase by strains of different serological types and relationship to M protein production. *J.Hyg. (Camb.)*, 66:49-58, 1968.
24. Wannamaker, L.W. - Medical progress: differences between streptococcal infections of the throat and of the skin. *N. Engl. J. Med.*, 282:23-31, 1970.

AVALIAÇÃO DO TESTE DE FLUORESCÊNCIA, EM PORTADORES CUTÂNEOS DE CORYNEBACTERIUM DIPHTERIAE*

Luiz Carlos Duarte Formiga
 Katia Regina Neto dos Santos
 Hebe Alves Corrêa Rodrigues
 & Susie Andries Nogueira

Serviço de Microbiologia e Imunologia,
 Faculdade de Ciências Médicas UERJ,
 Rua Prof. Manuel de Abreu, 48
 20550 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Resumo

Avaliação da eficácia do teste de triagem de *C. diphtheriae*, em laboratório de microbiologia clínica, por fluorescência no meio B de King. O teste abrevia o diagnóstico bacteriológico e ainda evita o trabalho adicional, para identificação dos difteroides associados ao *C. diphtheriae*, encontrados em lesões cutâneas.

Summary

Evaluation of the fluorescence test in cutaneous carriers of Corynebacterium diphtheriae

Evaluation of test for screening of *C. diphtheriae* in clinical microbiology based on fluorescence in King B medium. The fluorescence test shortens the time required for a definitive laboratory diagnosis and avoids additional efforts for identification of non-diphtheria coryneform bacteria isolated from *C. diphtheriae* infections in skin lesions.

Introdução

A eficácia da fluorescência em cultivos de bacilos diftéricos (3) como método de triagem em laboratório de microbiologia clínica foi avaliada em pacientes com infecção respiratória, e revelou-se adequada, uma vez que permite, também, reconhecer amostras atoxinogênicas (4).

A problemática do diagnóstico laboratorial de infecções por *C. diphtheriae* está relacionada principalmente com o isolamento de difteroides. A situação torna-se ainda mais difícil em lesões cutâneas. A dificuldade aumenta diante de amostras atoxinogênicas, particularmente mais frequentes na forma cutânea do que na respiratória. Ao contrário do que ocorre no trato respiratório, onde os difteroides fluorescentes são pouco frequentes (3, 4), na pele essa frequência é maior (1, 9, 10).

Pelo exposto, foi avaliada a eficácia do teste de fluorescência na investigação do bacilo diftérico, a partir de lesões de pele.

* Trabalho realizado com auxílio da FINEP.

Casuística e Métodos

Materiais de 25 indivíduos portadores de lesões cutâneas diversas foram colhidos com "swabs", embebidos em solução salina isotônica estéril. Em algumas ocasiões, foram colhidos materiais de mais de uma lesão, do mesmo paciente.

1. A semeadura foi feita no próprio local da colheita, em uma pequena porção da superfície dos meios de agar chocolate telurito e agar sangue de carneiro 5%, porém o esgotamento do inóculo foi feito 2-3 horas após, no laboratório, com alça de "nichrome".

2. Após incubação, por 24-48h, em estufa a 37°C, os cultivos foram examinados e os diversos tipos coloniais encontrados pescados e estocados em "Cystine Tripticase Agar-BBL" (2).

3. Todas as amostras de bastonetes Gram positivos isoladas foram submetidas a testes de fermentação de carboidratos (glicose e maltose) e hidrólise de uréia, no meio de Duplo-Açúcar-Ureia, DAU-modificado (7) e à pesquisa de fluorescência do cultivo (2, 3, 4). Para facilitar a leitura da fluorescência o meio B de King (2) foi distribuído e inclinado em tubos de ensaio 13/100mm, de forma a apresentar um longo bocal. Os microrganismos foram semeados (inóculo denso) apenas até a metade do bocal. A leitura, após 24h, foi feita em câmara escura, iluminando-se o tubo (bocal de perfil) com luz ultravioleta (365-375nm). Pela difusão da porfirina, produzida pelos microrganismos no meio, a metade do bocal torna-se amarelo-alaranjado-fluorescente.

4. A partir do cultivo no meio B de King (teste de fluorescência) foram realizados os testes de toxinogenicidade (6).

Resultados

De acordo com os resultados (Tabela 1), foram encontradas 32 amostras fluorescentes. Destas, 19 (23,45%) apresentaram caracteres bioquímicos do bacilo diftérico (fermentação de glicose e maltose), sendo três de bacilos toxinogênicos. Treze amostras de bastonetes Gram positivos (16,04%), embora com cultivos fluorescentes, não se assemelharam ao bacilo diftérico. A maioria das amostras isoladas não foi fluorescente (60,49%) e correspondeu àquelas com comportamento bioquímico diverso do *C. diphtheriae*.

Tabela 1 - Características dos bastonetes Gram positivos

Número de amostras	Fluorescentes				
	Comportamento bioquímico do bacilo diftérico		Comportamento bioquímico diferente do bacilo diftérico*	Não fluorescen- tes**	Fluorescen- tes***
	Toxinogênicos	Atoxinogênicos			
81	3	18	11***	49***	
100%	3,70%	19,04%	16,04%		60,49%

* Algumas amostras fermentaram apenas glicose e outras hidrolizaram uréia; ** Apesar de cinco amostras fermentarem glicose; *** Amostras atoxinogênicas.

Discussão

A fluorescência do cultivo bacteriano é muito útil na triagem de amostras suspeitas isoladas de populações com maior risco de contaminação diftérica, como é o caso dos contatos familiares (*). Nessas circunstâncias, a fluorescência permite resultados falso positivos, em torno de 2,1% dos casos (4), o que embora inadequado, abre a perspectiva de verificação posterior, ao contrário do que ocorreria com resultados falso negativos (5). Quando a problemática se transfere para a região cutânea, o teste aumenta o percentual de isolamento de amostras fluorescentes, com comportamento bioquímico do bacilo diftérico, surpreendendo no entanto o aparecimento de apenas três amostras toxinogênicas. Em vista de resultados anteriores (8) e devido a semelhança bioquímica entre "*C. minutissimum*" e o bacilo diftérico atoxinogênico, será necessário realizar o estudo adicional dos microrganismos fluorescentes, de lesões de pele, sempre que se mostrem negativos no teste de virulência. Este aspecto parece não ter sido considerado, anteriormente, por outros investigadores.

O teste de triagem possibilitou a exclusão de 49 amostras (60,4%). Isto é, que não precisaram ser submetidas a provas adicionais diversas, o que em termos de economia e rapidez recomendam a prática laboratorial avaliada, não só rotineiramente, mas principalmente em inquéritos epidemiológicos, quando é isolado grande número de amostras.

Referências Bibliográficas

1. Assis, T.L.; Formiga, L.C.D. & Assis, F.A. - A presença do *Corynebacterium minutissimum* nos espaços interdigitais dos pés. An. Bras. Dermatol., 51:1-16, 1976.
2. Formiga, L.C.D. - *Corynebacterium diphtheriae* e "difteróides": manual de exercícios práticos do tópico de Corinebactérias do Curso de Pós-graduação em Microbiologia. Publicação Técnica, Inst. Microbiol., U.F.R.J., R.J., 1975.
3. Formiga, L.C.D.; Nogueira, S.A. & Suassuna, I. - A fluorescência do *Corynebacterium diphtheriae* como um teste para seu reconhecimento. Rev. Bras. Patol. Clin., 16:201-202, 1980.
4. Formiga, L.C.D.; Nogueira, S.A. & Suassuna, I. - Avaliação do teste de fluorescência para reconhecimento do *Corynebacterium diphtheriae* em pacientes com difteria. Rev. Lat-amer. Microbiol., 23:131-133, 1981.
5. Formiga, L.C.D. & Suassuna, I. - Problemas e novas possibilidades para o diagnóstico laboratorial da difteria. F. Méd. (BR.), 84:115-118, 1982.
6. Pessoa, M.H.R.; Formiga, L.C.D.; Guaraldi, A.L.M.; Villela, L.H. C. & Lourenço, N.J. - Reavaliação da técnica de imunodifusão radial para identificação de amostras toxinogênicas de *Corynebacterium diphtheriae*. Rev. Bras. Patol. Clin., 17:69-73, 1981.
7. Rodrigues, H.; Lourenço, N.J.; Formiga, L.C.D.; Crespo, C.S.;

(*) Nogueira, S.A.; Formiga, L.C.D. & Lopes, P. - Pesquisa de portadores de *Corynebacterium diphtheriae* e da susceptibilidade à toxina de Schick em contatos de difteria. Rev. Lat-amer. Microbiol. (a ser publicado).

- Mattos, A.L.M.; Pessoa, M.H.R. & Suassuna, I. - Modificação do meio de Duplo-Açúcar-Uréia (DAU), na identificação presuntiva do gênero *Corynebacterium*. Resumos do XIº Congresso Brasileiro de Microbiologia, Florianópolis, 1981.
8. Santos, K.R.N.; Formiga, L.C.D. & Nogueira, S.A. - Presença do *Corynebacterium diphtheriae* em lesões cutâneas diversas. Resumos do XVIIº Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Ribeirão Preto, 1982.
 9. Sarkany, I.; Taplin, D. & Blank, H. - The etiology and treatment of erythrasma. J. Invest. Dermatol., 37:283-288, 1961.
 10. Somerville, D.A. - The microbiology of the cutaneous diphtheroids. Brit. J. Dermatol., 86:16-20, 1972.

PURIFICAÇÃO DA ENTEROTOXINA TERMO-ESTÁVEL (ST) DE *ESCHERICHIA COLI*

Lucila Costallat Ricci
 Antonio Fernando Pestana de Castro
 & Humberto de Araújo Rangel

Deptº de Microbiologia e Imunologia
 Instituto de Biologia UNICAMP
 13100 Campinas SP, Brasil

Resumo

A enterotoxina termo-estável (ST) de *E. coli*, proveniente de amostra humana, foi parcialmente purificada por cromatografia em coluna de permutador aniónico, equilibrado com acetato de amônio 0,01M, pH 9, diálise em sacos tratados com piridina e anidrido acético (V/V) e filtração em coluna de Sephadex G-15. Através desses processos, alcançou-se aumento na atividade específica de até 51 vezes. O material procedente da filtração em Sephadex G-15 foi examinado por cromatografia descendente em papel, no sistema de solventes ácido acético, butanol e água (1:4:5). Conseguiu-se distinguir diversas substâncias presentes na amostra e localizar, após eluição e análise pelo teste do camundongo recém-nascido, a mancha correspondente à enterotoxina ST. Em rechromatografia da toxina ST eluída, no mesmo solvente, obteve-se apenas uma mancha. Entretanto, em vista do baixo rendimento observado neste último método, o seu uso deve ser indicado, apenas como um processo analítico da purificação de ST.

Summary

Purification study thermostable (ST) enterotoxin of Escherichia coli

Thermostable (ST) enterotoxin produced by a human strain of *E. coli* was partially purified by column chromatography through anion exchanger equilibrated with 0.01M ammonium acetate pH 9, dialysis in bags treated by a mixture of pyridine and acetic anhydride (V/V) followed by filtration through Sephadex G-15. Using these procedures, an increase of the specific activity as high as 51 times was obtained. The material from Sephadex G-15 filtration was examined by descending paper chromatography using a solvent mixture containing acetic acid, butanol and water (1:4:5). Enough separation of the contaminants was enabled as well as identification of the spot containing biological activity of ST, after elution and assay by the infant mouse test. Rechromatography of the eluted ST, by the same method, revealed only a single spot. However, because of the low recovery of ST activity, observed in this chromatography method, we recommended it as an analytical process to evaluate ST purification only.

Introdução

Algumas amostras de *Escherichia coli* podem produzir, pelo menos, dois tipos distintos de enterotoxinas, caracterizados por suas propriedades de resistência ao calor: toxina termo-lábil (LT) e termo-estável (ST).

Devido ao alto peso molecular e imunogenicidade, a enterotoxina LT tem sido purificada por diversos autores (3, 6, 8, 20, 26) e já se conhecem muitas de suas propriedades (3, 5, 13, 19, 23). A purificação da enterotoxina ST tem sido bastante dificultada, por suas características de baixo peso molecular e não-imunogenicidade, além da escassez de métodos biológicos utilizáveis para sua caracterização.

Recentemente, pesquisadores descreveram a purificação de ST, através de métodos distintos (1, 24, 25), caracterizando, nas toxinas purificadas, algumas propriedades diferentes. Em trabalhos anteriores, vários autores (2, 7, 9, 15, 17, 22, 28) já haviam encontrado diferenças entre toxinas ST de origem diversa, quanto à termolabilidade e atividade biológica, sugerindo esse fato que diferentes toxinas termo-estáveis deveriam existir.

Recentemente, Olsson & Soderlind (16) caracterizaram toxinas termo-estáveis com atividades diferentes, em alça ligada de porco e teste do camundongo recém-nascido.

Tendo em vista as diferenças observadas, procuramos adaptar uma tecnologia de purificação da enterotoxina ST, trabalhando com toxina proveniente de uma amostra humana isolada em nosso meio. Com base em estudos iniciais sobre as características físico-químicas da enterotoxina ST, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma sequência para purificação.

Material e Métodos

Amostra - O preparo da toxina bruta foi a partir da amostra 3 de *E. coli*, isolada em Campinas, SP, Brasil, de um caso de diarréia em criança (21). Esta amostra, que produz exclusivamente enterotoxina ST, foi identificada como pertencente ao sorotípo 0128ac:H21 (18).

A amostra foi semeada em frascos Erlenmeyer, contendo em 10% do seu volume, meio de CAYE - Casamino Acids-Yeast Extract (16) e incubada em estufas com agitação (150-200rpm) a 37°C, durante 18 horas. As culturas foram então centrifugadas e os 3/4 superiores dos sobrenadantes obtidos, separados e conservados a -20°C.

Preparou-se total de 5 litros de sobrenadantes de cultura, com os quais foram realizados os estudos iniciais de propriedades físico-químicas e semi-purificação da toxina ST.

Ensaios para a detecção da enterotoxina ST - Na caracterização da toxina ST, utilizou-se o teste do camundongo recém-nascido (4, 10), específico para esta toxina. Para fins de quantificação, determinou-se, como uma unidade tóxica (U.T.), a maior diluição da toxina, numa série com razão de 2, que produzisse uma relação peso do intestino/peso da carcaça, superior ou igual a 0,085.

Cromatografia em permutador aniónico - Frações de 140ml de toxina bruta, com pH acertado para 9, com NaOH 0,1M, foram aplicadas a colunas (2,2 x 4,3) de permutador aniónico da Merck, equilibradas com tampão acetato de amônio, 0,01M pH 9. O material foi eluído no mesmo tampão, com fluxo de 10ml por minuto, coletando-se 10ml por fração. Os tubos contendo acima de 3 U.T./0,1ml foram reunidos em um só lote.

Diálise - As frações com atividade tóxica, obtidas a partir da cromatografia em permutador aniónico, foram concentradas através de liofilização e ressuspensas em um volume dez vezes menor de água destilada.

lada. Essas amostras foram então dialisadas contra volume de água destilada 200 vezes maior, sob agitação constante, a 4°C. Para que a toxina ST não fosse dialisada, os sacos de diálise foram tratados, segundo Graig (12), com solução de anidrido acético e piridina (V/V), que, por processo de acetilação, reduz o "cut off" dos mesmos. O tratamento foi desenvolvido sob agitação constante, durante 10 horas à temperatura ambiente.

Filtragem em Sephadex G-15 - Depois da diálise, as amostras foram concentradas por liofilização e aplicadas, após serem ressuspensas em 2,3ml de água destilada, na mesma coluna (1,3 por 88cm) de Sephadex G-15, padronizada por uma solução de azul de Dextran (0,25%) e NaCl 1,5M. O material foi eluído com água destilada, em pH 8, acertado com trimetilamina. Os tubos, correspondentes aos picos de atividade tóxica, das seis cromatografias realizadas nas condições acima descritas, foram reunidos em uma única fração. A solução foi liofilizada e o resíduo ressuspenso, em um volume dez vezes menor de água destilada.

Cromatografia em papel - A amostra, procedente das filtrações em Sephadex, foi analisada em cromatografia descendente, em papel Whatman nº 3, utilizando-se os seguintes sistemas de solventes: ácido acético-butanol-água (1:4:5) e etanol-butanol-água (3:3:4). Para a revelação das amostras cromatografadas, foi utilizado ninhidrina 0,25% em acetona. Para a determinação da atividade de ST, nas manchas obtidas com os dois sistemas de solventes, foram desenvolvidas cromatografias onde apenas as aplicações laterais eram reveladas, enquanto que as centrais eram eluídas. Procedeu-se a eluição, recortando-se o papel sob orientação das cromatografias laterais e embebendo-o em sálina 0,15M. Cada mancha, eluída, foi então analisada pelo teste do camundongo recém-nascido.

Resultados

Permutador aniônico - Foram realizadas 12 cromatografias em colunas de permutador aniônico, equilibradas em pH 9. Nessas condições, a toxina ST não se adsorveu à resina e a recuperação de U.T. foi de aproximadamente 70%. A atividade específica, em todas as cromatografias, aumentou cerca de 8 vezes (Tabela 1).

Diálise - Os resultados de 10 experimentos de diálise, desenvolvidos em sacos tratados por piridina e anidrido acético não foram homogêneos (Tabela 2).

Filtragem em Sephadex G-15 - Após a diálise, as amostras foram re-concentradas por liofilização e aplicadas a uma mesma coluna de Sephadex G-15. Os resultados das 6 cromatografias realizadas (Tabela 3), revelam aumento considerável na atividade específica. Por outro lado, demonstram a adsorção da enterotoxina ST à resina de Sephadex, uma vez que os picos de atividade máxima variaram entre as frações 16, 19 e 20.

Cromatografia em papel - Com base no fato de que a enterotoxina ST de *E. coli* poderia ser aplicada ao papel de filtro e, posteriormente, pelo prazo de 2 meses, eluída sem perda de sua atividade (11), tentou-se introduzir, na sequência de purificação, a cromatografia em papel. Entre as diversas manchas obtidas, após cromatografia em papel, com o sistema de solventes ácido acético-butanol-água (1:4:5), a atividade de ST foi detectada na terceira mancha após o ponto de aplicação de amostra.

Tabela 1 - Cromatografias em permutador aniónico pH 9

Experimento	Nº de U.T./ml	Absorbância a 280nm	A.c.*
Toxina Bruta	160	11,57	13,8
Nº 15	160	1,25	128
Nº 16	160	1,5	107
Nº 17	160	1,35	119
Nº 18	160	1,5	107
Nº 19	160	1,4	114
Nº 20	160	1,55	103
Nº 26	160	1,35	119
Nº 27	160	1,7	94
Nº 34	160	1,5	107
Nº 35	160	1,45	110
Nº 36	160	1,4	114
Nº 29	160	1,5	107

* Atividade específica: relação entre o número de U.T./ml pela absorção da amostra a 280nm.

Tabela 2 - Diálise das amostras procedentes da cromatografia em permutador aniónico

Experimento	Nº de U.T./ml	Absorbância a 280nm	A.c.*	Conc.§
Nº 25	160	1,25	573,5	4,5
Nº 28	160	3,42	280,7	6
Nº 29	80	1,69	187	4
Nº 30	40	1,86	68,9	3,2
Nº 31	160	2,15	186	2,5
Nº 33	160	3,41	156,9	3,3
Nº 37	80	1,52	105,3	2
Nº 38	40	1,44	61,2	2,2
Nº 41	40	1,59	35,1	1,4
Nº 42	160	1,82	219,8	2,5

§ Dados que indicam o número de vezes que a amostra está concentrada em relação à toxina bruta

* Atividade específica.

Tabela 3 - Filtração em Sephadex G-15

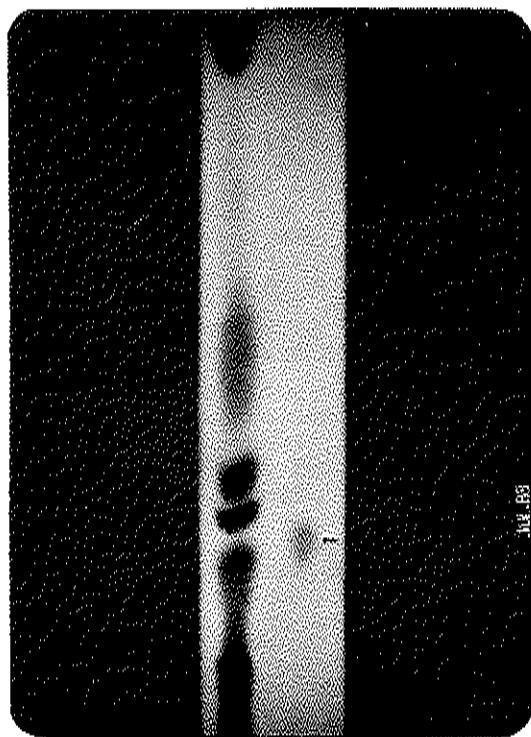
Experimento	Conc.§	Nº de U.T./ml	Absorbância a 280nm	A.c.-	Fração de maior atividade	Nº de U.T./ml	Absorbância a 280nm	Ativ. esp.*
Nº 31	53,4	2.136	20,8	102,6	20	320	0,8	400
Nº 32	42,17	6.747	40	168,7	16	1.280	1,8	710
Nº 40	71,9	5.752	67,2	95	16	1.280	2,53	506
Nº 43	62,88	5.030	47	107	20	640	1,22	525
Nº 44	53,8	8.608	49,4	174,2	20	640	1,38	462
Nº 47	41	6.560	24,8	138,5	19	640	1,0	640

§ Dados que indicam o número de vezes que a amostra está concentrada em relação à toxina bruta

* Atividade específica.

Realizando-se, com esta toxina cluída, nova cromatografia, no mesmo sistema de solventes, obtivemos apenas uma mancha, revelada pela ninhidrina, cujo Rf foi de aproximadamente 0,11 (Figura 1). Porém, a recuperação da toxina, detectável pelo teste do camundongo recém-nascido, foi de apenas 5,6%. Buscando-se condições mais adequadas para a conservação da atividade tóxica de ST, o solvente etanol-butanol-água (3:3:4) foi também utilizado para cromatografia descendente em papel. Pesquisando-se a atividade de ST nas diversas manchas obtidas (Figura 2), conseguiu-se encontrá-la na última mancha obtida, em relação ao ponto de aplicação da amostra. Entretanto, a recuperação de U.T. foi novamente baixa, de apenas 11,6%.

Figura 1 - Cromatografia descendente em papel Whatman nº 3, da preparação da enterotoxina ST



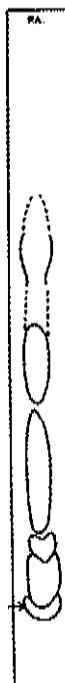
Solvente: ácido acético-butanol-água (1:4:5). A atividade de ST foi caracterizada na 3ª mancha obtida após o ponto de aplicação da amostra (lado direito). Recromatografada, obtivemos a mancha isolada, indicada pela seta.

Discussão

A elaboração e desenvolvimento de sequência de purificação para a enterotoxina ST foi extremamente dificultada pela complexidade do meio de CAYE, que contribuiu, com grande número de contaminantes, de peso molecular bastante semelhante ao da toxina, abaixo de 10.000d, como mostraram resultados anteriores obtidos em ultrafiltração (trabalho submetido a publicação).

A sequência permutador aniónico, diálise e filtração em Sephadex G-15, permitiu aumento na atividade específica de até 51 vezes. O primeiro passo, constituído por cromatografia na resina permutador aniónico, apresentou, em uma série de 12 experimentos, resultados bastante homogêneos. Em contraste, nos obtidos com a diálise, onde as condições eram modificadas durante o processo, por razões não esclarecidas, foi grande a heterogeneidade, resultando amostras com características diferentes quanto à atividade tóxica e absorbância a 280nm.

Figura 2 - Representação gráfica da cromatografia descendente em papel Whatman nº 3, da preparação da enterotoxina ST



Solvente: etanol-butanol-água (3:3:4). Atividade de ST foi encontrada na mancha indicada pela seta.

As filtrações em Sephadex G-15 apresentaram, em relação à toxina ST, o fenômeno de adsorção, frequente entre moléculas de baixo peso molecular (14, 27, 29), uma vez que o pico de atividade variou entre as frações 16, 19, 20, nos diferentes experimentos. Este problema poderá, talvez, ser posteriormente contornado, por um aumento na força iônica do tampão.

A tentativa de se introduzir a cromatografia em papel, na sequência de purificação, deveu-se ao fato de a toxina ST poder ser eluída do papel sem perda de atividade (11). Entretanto, apesar de termos conseguido eluir a toxina com atividade de ST e, em nova cromatografia, no mesmo sistema de solventes ácido-acético - butanol-água (1:4:5) termos verificado apenas uma mancha, o baixo rendimento do processo impede que o método seja recomendável para uma sequência de purificação.

Por outro lado, a boa separação de manchas e a facilidade de desenvolvimento e material necessários à técnica, permitem que a técnica seja recomendada, como método de análise de enterotoxina ST.

Embora não tivéssemos completado o processo de purificação da enterotoxina ST de *E. coli*, conseguimos, por métodos simples e econômicos, aumento significativo na atividade específica de até 51 vezes. Repetindo-se, posteriormente, o processo, com introdução de modificações no preparo dos sacos de dialise, que não devem ser reutilizados e na filtração em Sephadex G-15, mudando-se o tampão para fosfato de Na 0,05M pH7, esse aumento foi de até 165 vezes (dados não publicados). Com este preparado, semi-purificado, esperamos obter análises mais conclusivas e homogêneas no estudo de efeitos biológicos e características da molécula da enterotoxina ST.

Agradecimentos

Ao Prof. Jorge A. Guimarães, nossos agradecimentos pelas sugestões apresentadas no desenvolvimento deste trabalho ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através do Programa de Saúde Animal e a FINEP - Financiadora de Estudos e Projetos.

Referências Bibliográficas

1. Alderete, J.F. & Robertson, D.C. - Purification and chemical characterization of the heat-stable enterotoxin produced by porcine strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 19: 1021-1030, 1978.
2. Castro, A.F.P.; Serafim, M.B.; Rangel, H.A. & Guerrant, R.L. - Swiss and inbred mice in the infant mouse test for the assay of *Escherichia coli* thermostable enterotoxin. *Infect. Immun.*, 22: 972-974, 1978.
3. Clements, J.D. & Finkelstein, R.A. - Isolation and characterization of homogeneous heat-labile enterotoxin with high specific activity from *Escherichia coli* cultures. *Infect. Immun.*, 24:760-769, 1979.
4. Dean, A.G.; Ching, Y.C.; Williams, R.G. & Hardem, L.B. - Test for *Escherichia coli* enterotoxin of diarrhea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.*, 125:407-411, 1973.
5. Donta, S.T.; Moon, H.W. & Whipp, S.C. - Detection of heat-labile

- Escherichia coli* enterotoxin with the use of adrenal cell in tissue culture. *Science*, 183:334-336, 1974.
6. Dorner, F.; Jaksche, H. & Stockl, W. - *Escherichia coli* enterotoxin: purification, partial characterization and immunological observations. *J. Infect. Dis.*, 133(Suppl):S142-S156, 1976.
 7. Evans, D.G.; Evans Jr., D.J. & Pierce, N.F. - Differences in the response of rabbit small intestine to heat-labile and heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 7:873-880, 1973.
 8. Finkelstein, R.A.; La Rue, M.K.; Johnston, D.W.; Vasil, M.L.; Cho, G.L. & Jones, J.R. - Isolation and properties of heat-labile enterotoxin(s) from enterotoxicogenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*, 133(Suppl):s120-s137, 1976.
 9. Franceschi, A.P.; Castro, A.F.P.; Serafim, M.B. & Pustiglione Netto, L. - Estudos comparativos entre o teste de alça ligada do intestino de coelho e do camundongo recém-nascido na detecção da enterotoxina termo-estável (ST) produzida por *Escherichia coli*. *Rev. Microbiol. (São Paulo)*, 8:123-128, 1977.
 10. Gianella, R.A. - Suckling mouse model for detection of heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin: characteristics of the model. *Infect. Immun.*, 14:95-99, 1976.
 11. Gomes, J.A.; Rodrigues, A.C.; Simões, M.; Serafim, M.B. & Castro, A.F.P. - Simplification of methods for the production and storage of specimen to be tested for heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, 10:786-790, 1979.
 12. Graig, L.C. - Fractionation and characterization by dialysis. In: - Alexander, B. & Broock, R.J., eds. - *Analitical methods of protein chemistry*. Bergamon Press, p.103, 1960.
 13. Guerfrant, R.L.; Brunton, L.L.; Schnaitman, T.C.; Rebhun, L.I. & Gilman, A.G. - Cyclic adenosine monophosphate and alteration of Chinese hamster ovary cells morphology: a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 10:320-337, 1974.
 14. Janson, J.C. - Adsorption phenomena of Sephadex. *J. Chromatogr.*, 28:12-20, 1967.
 15. Moon, H.W. & Whipp, S.C. - Development resistance with age by swine intestine to effects of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*, 122:220-223, 1970.
 16. Olsson, E. & Soderlind, O. - Comparison of different assays for definition of heat-stable enterotoxicogenicity of *Escherichia coli* porcine strains. *J. Clin. Microbiol.*, 11:6-15, 1980.
 17. Pierce, M.F. & Wallace, C.K. - Stimulations of jejunal secretion by a crude *Escherichia coli* enterotoxin. *Gastroenterology*, 63: 439-448, 1977.
 18. Reis, M.H.L.; Castro, A.F.P.; Toledo, M.R.F. & Trabulsi, L.R. - Production of heat-stable enterotoxin by 0128 serogroups of *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Microbiol.*, 29:333-353, 1975.
 19. Sack, R.B. - Human diarrheal disease caused by enterotoxicogenic *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Microbiol.*, 29:333-353, 1975.

20. Schenkein, I.; Green, R.F.; Santos, D.S. & Maas, W.K. - Partial purification and characterization of a heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 13:1710-1720, 1976.
21. Serafim, M.B.; Castro, A.F.P.; Rangel, H.A. & Pustiglione Netto, L. - Isolation of heat-stable enterotoxin producing strains of *Escherichia coli* isolated from cases of diarrhea in Campinas, S.P., Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 19:144-147, 1977.
22. Smith, H.W. & Hall, S. - Studies on *Escherichia coli* enterotoxins. *J. Path. Bact.*, 93:531-543, 1967.
23. Speirs, J.I.; Stavric, S. & Konowalchuk, J. - Assay of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin with Vero cells. *Infect. Immun.*, 16:617-622, 1977.
24. Staples, S.J. & Gianella, R.A. - Production and purification of human *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. In: - Proceedings of the 15th Joint Conference of Cholera, Bethesda, National Institutes of Health, p.127-141, 1979.
25. Takeda, Y.; Takeda, T.; Yano, T.; Yamamoto, K. & Miwatani, T. - Purification and partial characterization of heat-stable enterotoxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 25:978-985, 1979.
26. Takeda, Y.; Taga, S. & Miwatani, T. - Purification of heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 5:181-186, 1979.
27. Wasternack, C. - Gel chromatography of low molecular weight compounds. *Pharmazie*, 27:67-79, 1972.
28. Whipp, S.C.; Moon, H.W. & Lyon, N.C. - Heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin produced in vivo. *Infect. Immun.*, 12:240-244, 1975.
29. Williams, K.W. - Solute gel interactions in gel filtration. *Lab. Practice*, 21:67-670, 1972.

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA ENTEROTOXINA TERMOESTÁVEL (ST) DE *ESCHERICHIA COLI*

Lucilla Costallat Ricci
Antonio Fernando Pestana de Castro
& Humberto de Araújo Rangel
Deptº de Microbiologia e Imunologia
Instituto de Biologia UNICAMP.
13100 Campinas SP, Brasil

Resumo

Diferenças foram encontradas por diversos autores, em relação a propriedades da enterotoxina termo-estável (ST) de *E. coli*. Através de métodos de purificação dependentes da solubilidade, propriedades hidrodinâmicas e de carga elétrica, foi realizada a análise das características físico-químicas de uma toxina ST, produzida em meio complexo a partir de uma amostra de *E. coli* humana. Através de métodos clássicos de precipitação por ácido tricloroacético (TCA) acetona e sulfato de amônio, houve apenas um arraste da toxina pelo precipitado. Ultrafiltração e cromatografias em gel filtração, sugerem um peso molecular da toxina analisada, abaixo de 10.000 d. Na faixa de pH de 5,0 a 10,0, não foi observada inativação da enterotoxina ST. Cromatografia em resinas permutador catiônico e DEAE-cellulose, poderão ser utilizadas na purificação da toxina ST, uma vez resolvidas, respectivamente, as condições de eluição e dialise. Cromatografia em permutador aniónico, equilibrado em pH 9,0, forneceu melhor resultado, com aumento de oito vezes na atividade específica e rendimento do processo de aproximadamente 70%.

Summary

Physical and chemical characteristics of thermostable enterotoxin (ST) of Escherichia coli

Several differences have been reported by many authors in regard to physical and chemical properties of thermostable (ST) enterotoxin of *Escherichia coli*. Using methods of purification based on solubility, hydrodynamic properties and electric charge a study of the physicalchemical properties of ST enterotoxin produced by a human strain of *E. coli* isolated in Campinas was carried out. Standard methods of precipitation by trichloroacetic acid (TCA), acetone and ammonium sulphate were not very efficient as to the concentration of active ST. Ultrafiltration and gel chromatography suggested that the enterotoxin under study had a molecular weight lower than 10,000 daltons. Enterotoxin activity as assayed by the infant mouse test was not inactivated by pH in the range 5.0 to 10.0. Chromatography through cationic exchanger and DEAE-cellulose showed that the resins may be useful steps for ST purification. Chromatography through anionic exchanger equilibrated with 0.01M ammonium acetate buffer pH 9.0 provided best results since specific activity of ST enterotoxin increased eight-fold and the recovery was approximately 70%.

Introdução

Em amostras de *Escherichia coli* enterotoxigênicas, são encontrados, pelo menos, dois tipos de enterotoxinas que, por suas propriedades de resistência ao calor, foram denominadas termo-lábil (LT) e termo-estável (ST) (24), sendo a produção de ambas, controlada por plasmídeos (17, 25, 26). A enterotoxina LT, graças a características muito semelhantes às de cólera (16), foi exaustivamente estudada e caracterizada através de diferentes testes biológicos (2, 10, 15, 30, 32), embora só recentemente tenham surgido alguns trabalhos sobre sua purificação (5, 7, 8, 27).

Recentemente, Clements & col. (6), trabalhando com enterotoxina LT purificada, estabeleceram que é imunológica estrutural e biologicamente semelhante ao "choleragen". Entretanto, tais estudos só foram possíveis depois da purificação da enterotoxina, fornecida, fundamentalmente, pelas características de peso molecular elevado e propriedades imunogênicas, que permitiram a utilização de testes sorológicos, no estudo dos métodos empregados (7).

Por outro lado, a dificuldade para se obter imunesoros contra a enterotoxina ST, aliada a outros fatores como escassez de métodos biológicos sensíveis para sua caracterização e baixo peso molecular, fizeram com que os trabalhos de purificação desta enterotoxina, embora tentados por vários autores (12, 18, 21), encontrassem grandes dificuldades.

Além disso, diferenças observadas na atividade da enterotoxina ST, quanto à termolabilidade (13) e susceptividade de diversas raças isogênicas à mesma (4), levaram-nos a suspeitar que diferentes toxinas termo-estáveis deveriam existir.

Com uma enterotoxina ST, produzida por amostra de *E. coli*, isolada no nosso meio, desenvolvemos a análise de algumas de suas propriedades físico-químicas, visando a posterior purificação.

Material e Métodos

Amostra - Trabalhou-se com amostra de *Escherichia coli* 3 (28), exclusivamente produtora de ST, sorotipo 0128 ac:H21(23), de origem humana, cedida por Dra. Marlene Braide Serafim, Universidade Estadual de Campinas.

Preparo da toxina bruta - Para o preparo de toxina, a amostra foi inicialmente semeada em tubos, contendo 2ml de caldo simples, mantidos a 37°C por 6h. A partir dessa cultura, 0,05ml foram inoculados em Erlenmeyers de 125ml, contendo 12,5ml do meio de CAYE - Casamino-Acid-Yeast-Extract (11). Em seguida, os frascos foram incubados a 37°C, em estufas com agitação (150-200rpm), durante 18 horas. As culturas foram então centrifugadas a 3.079g, durante 30 minutos e os 3/4 superiores dos sobrenadantes obtidos, separados e conservados a -20°C. Foi preparado o total de cinco litros, pela mistura de sobrenadantes de diversos lotes, adicionando-se então, mertiolato, na proporção 1/10.000, como preservativo.

Ensaio para a detecção da enterotoxina ST - O ensaio usado para a caracterização da toxina ST, constituiu-se do teste do camundongo recém-nascido (9, 14), específico para esta toxina.

Unidade tóxica - No estudo da proporcionalidade entre dose/efeito da toxina, foi verificado que o teste do camundongo recém-nascido não

deve ser usado quantitativamente, com base exclusiva na relação peso do intestino/peso da carcaça. Esta impossibilidade deve-se ao fato de existir um limite nas alterações desta relação, de até 0,15 (18), acima do qual ocorre morte de um ou mais animais, dos quatro camundongos do grupo. Como, para a análise dos resultados, era fundamental quantificar a toxina ST nas frações obtidas, padronizou-se como uma unidade tóxica (U.T.), a maior diluição de enterotoxina, numa série com razão de dois que produzisse a relação peso do intestino/peso da carcaça, maior ou igual a 0,085 (14).

Dosagem de proteínas - Algumas dosagens de proteínas foram realizadas pelo método de Lowry (20). Para facilidade de análise, a determinação das proteínas presentes na amostra, foi avaliada em muitos testes, pela absorção a 280nm, em espectrofotômetro ZEISS, PMQ III.

Análise de características físico-químicas - *Precipitação por sulfato de amônio* - A 300ml de toxina bruta, foram adicionados 198,6g de sulfato de amônio (MERCK) correspondendo a uma saturação de 90%. O precipitado obtido foi então dialisado contra água destilada, durante 24 horas.

Precipitação por acetona - A aliquotas de 5ml de toxina bruta, foi adicionada acetona P.A., até serem alcançadas as concentrações finais de 30, 66, 80, 94 e 96% nas diversas frações. Procedeu-se a precipitação a 4°C sob agitação constante, tendo sido a acetona, adicionada lentamente. Após 18 horas em repouso na mesma temperatura, as amostras foram centrifugadas a 12.100g por 30 minutos, e os precipitados separados e ressuspensos em 5ml de água destilada.

Precipitação por ácido tricloroacético e acetona - O ácido tricloroacético (TCA) foi adicionado à toxina bruta, na concentração final de 10% e após 30 minutos ou 18 horas, neutralizado com NaOH 5M. Paralelamente, analisou-se o efeito simultâneo de TCA a 10%, neutralizado após 30 minutos ou 18 horas, e acetona a 50%, ambos adicionados à toxina bruta com o objetivo de se aumentar o volume de precipitado.

Ultrafiltração - A toxina bruta foi ultrafiltrada em membrana Diaflo PM10 da Amicon e em um aparelho DC-2, "hollow fibers", com capacidade para 2 litros HIP-10.

Filtração em gel - A toxina bruta, concentrada dez vezes, foi aplicada a colunas de Sephadex G-15 (1,3 por 83cm) e Sephadex G-25 (1,3 por 91cm), padronizadas com azul de Dexfran 0,25g e NaCl 1,5M.

Efeito do pH - As frações de toxina bruta tiveram seus pHs acertados com NaOH 0,1M e HCl 0,1M para os valores 5, 6, 7, 8, 9 e 10. Após serem mantidos a 4°C, durante 24 horas, os pHs foram acertados para 7 e em cada uma das frações, a atividade de ST foi examinada.

Cromatografia em permutador catiônico - A uma coluna de 0,7 por 5cm de permutador catiônico da MERCK, equilibrada com tampão acetato de amônio 0,05M, pH 5, foram aplicados 5ml de toxina bruta. A coluna foi eluída com o mesmo tampão, num fluxo de 1ml por minuto, aplicando-se em seguida, um gradiente de pH de 6 a 9.

Cromatografia em DEAE - celulose - Separadamente, colunas contendo 4ml da resina DEAE-celulose, foram equilibradas com tampão fosfato de potássio 0,05M, nos pHs 7, 8 e 9. Não se encontrando a enterotoxina ST, nas frações não retidas pelas colunas, tentou-se a eluição com um gradiente salino constituído de fosfato de sódio 0,01M, pH7 e NaCl até 0,5M.

Cromatografia em permutador aniónico - A fixação da enterotoxina ST, na resina permutadora aniónica da MERCK, foi analisada em "batch" e em colunas de 5ml, com a resina equilibrada em tampão acetato de amônio 0,01M, nos pHs 6, 7, 8, 9 e 10. Nos casos em que a toxina se adsorveu à resina, tentou-se a eluição com ácido acético 0,1N. Por ter papel relevante na adsorção à resina, o tempo de contato desta com a enterotoxina ST foi avaliado. Todas as amostras obtidas, nos referidos experimentos, após terem seus pHs neutralizados, foram analisadas pelo teste do camundongo recém-nascido.

Resultados

Estudos dos métodos dependentes das características de solubilidade - Após precipitação da toxina bruta, com 90% de saturação em sulfato de amônio, encontramos atividade de ST no precipitado. Entretanto, o processo forneceu rendimento baixo, de apenas 6,3%. Em todas as concentrações de acetona analisadas, observou-se atividade de ST nos precipitados obtidos. Porém, mesmo quando a precipitação foi repetida com 66% de acetona, a -20°C, o rendimento, em termos de recuperação de U.T., foi apenas 3,1%. Na tentativa de aumentar a atividade de ST nos precipitados, através de tratamento simultâneo com TCA e acetona, obtivemos rendimento de 6,8%, nos casos em que o ácido foi neutralizado após 30 minutos de tratamento e perda total de atividade quando era mantido por 18 horas (Tabela 1).

Estudo dos métodos dependentes de propriedades hidrodinâmicas - Ultrafiltração em membranas que permitam a separação de moléculas, com peso molecular de até 10.000d, não teve utilidade no fracionamento de ST, uma vez que ela e a maioria dos constituintes do meio de CAYE, apresentam peso molecular inferior a este limite, em vista de a concentração proteica da toxina ser bastante semelhante à do ultrafiltrado (Tabela 2).

Os padrões cromatográficos, observados nas filtrações em colunas de Sephadex G-25 e G-15, encontram-se, respectivamente, nas Figuras 1 e 2, juntamente com a dosagem da atividade tóxica de ST nos diversos picos. A maior atividade específica, obtida nas frações coletadas

Tabela 1 - Precipitação da toxina bruta por TCA e acetona

Tratamento	Nº de U.T./ml	Percentagem de recuperação de U.T. ^a
Toxina bruta	16	100
TCA 10%, 30 minutos	0,1	0,625
TCA 10%, 18 horas	0,2	1,25
TCA 10%, 30 minutos + acetona 50%	1,1	6,825
TCA 10%, 18 horas + acetona 50%	0	0

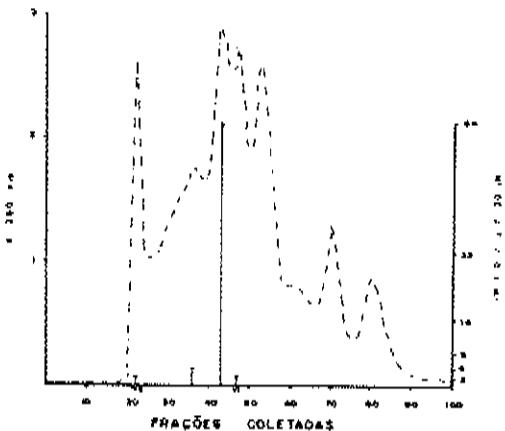
Tabela 2 - Ultrafiltração de toxina bruta em um aparelho Amicon DC-2 "hollow fibers"

Amonstras	Nº de U.T./0,1ml	Concentração de proteinas
Toxina bruta	16	2,36mg/ml
Ultrafiltrado	16	2,18mg/ml

^a O cálculo da porcentagem de recuperação foi realizado com base na relação entre a quantidade de U.T. presentes no material inicial e no purificado.

das, foi de 220,7 na filtração em G-25 e de 84,2 em G-15, enquanto que a toxina bruta possui uma atividade específica de 13,8.

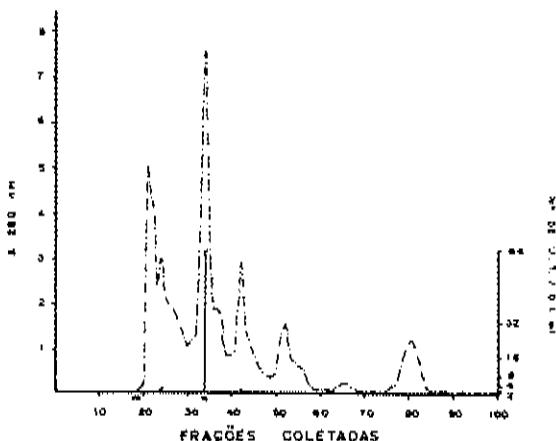
Figura 1 - Gel filtração da toxina bruta em Sephadex G-25, medium



Coluna de 1,3 por 91cm; eluente: fosfato de sódio 0,05M pH7; frações de 2,2ml. Símbolos - - absorbância a 280nm; — n° de U.T./0,1ml encontradas na fração examinada. V.E. - volume de exclusão; V.I. - volume interno.

Estudo de métodos dependentes da carga elétrica - De acordo com os resultados expressos na Tabela 3, na zona de pH analisada, de 5 a 10, não houve inativação detectável de ST. Nas condições utilizadas na cromatografia em permutador catiônico, a toxina ST foi encontrada na fração não retida pela coluna, com aumento na atividade específica de 13,8 para 34. O gradiente de pH, feito com acetato de amônio de pH 6 a 9, aplicado à coluna para eluir a toxina que permaneceu adsorvida à resina permutadora catiônica, foi insuficiente para eluir qualquer material com atividade de ST, detectável pelo teste do camundongo recém-nascido.

Figura 2 - Gel filtração da toxina bruta em Sephadex G-15



Coluna de 1,3 por 83cm; eluente: acetato de amônio 0,05M pH7; frações de 2ml. Símbolos - - absorbância a 280nm; — n° de U.T./0,1ml encontradas na fração examinada. V.E. - volume de exclusão; V.I. - volume interno.

Nas cromatografias em DEAE-cellulose, equilibrada com tampão fosfato nos pHs 7, 8, 9, não se encontrou atividade de ST nas frações não retidas pela resina. Repetindo-se a cromatografia em coluna de DEAE-cellulose, equilibrada com tampão fosfato de Na 0,01M, pH 7, verificou-se a eluição parcial da toxina no mesmo tampão, acrescido de NaCl 0,3M. A atividade específica nas frações eluidas aumentou cerca de 12 vezes em relação à toxina bruta e a recuperação de unidades tóxicas foi de aproximadamente 55%.

Analizando-se o sobrenadante, obtido após mistura em "batch" da toxina bruta com a resina permutadora aniónica, encontrou-se atividade de ST igual à inicial, nos pHs examinados. Nas cromatografias em colunas de 5ml de permutador aniónico, equilibrado em acetato de amônio nos pHs 9 e 10, observou-se em ambos os casos, atividade de ST na fração não retida pela resina. A aplicação de ácido acético 0,1M às colunas, eluiu material sem atividade tóxica de ST (Tabela 4).

Tabela 3 - Influência do pH sobre a atividade da toxina bruta

pH final	Nº de U.T./0,1ml após tratamento
8,5*	16
5,0	16
6,0	16
7,0	16
8,0	16
9,0	16
10,0	16

* pH da toxina bruta.

Tabela 4 - Cromatografia de toxina bruta em colunas de permutador aniónico equilibrado nos pHs 9 e 10

Amostra	Absorbância a 280nm	Nº de U.T./ml	Atividade específica
Toxina bruta	11,57	160	13,8
Fração não adsorvida à resina em pH 9	0,62	80	129
Fração adsorvida à resina em pH 9	0,475	0	-
Fração não adsorvida à resina em pH 10	1,0	80	80
Fração adsorvida à resina em pH 10	0,82	0	-

Uma vez que, por esses experimentos, ficou demonstrado que a entero toxina ST não se fixava à resina permutadora aniónica, equilibrada com tampão acetato de amônio, na faixa de pH de 6 a 10, foi escolhido, para posteriores cromatografias, o pH 9.

Desta forma, a toxina bruta foi cromatografada em coluna de permutador aniónico (2,2 por 39cm), equilibrada com acetato de amônio 0,01M, pH9, num fluxo de 1,5ml por minuto. Entretanto, ao contrário do que se esperava, segundo os resultados anteriores, não se detectou atividade de ST, na fração não retida pela coluna. O tempo de contacto, entre toxina e resina, deveria ser fundamental para sua adsorção, favorecendo ou não a competição com outras moléculas pelos sítios da resina. Para que isso fosse analisado, testes, onde se va-

riou o tempo de contacto entre toxina bruta e resina, foram desenvolvidos. Os experimentos em "batch", onde foram misturados toxina e resina em condições diferentes, durante 30 minutos, evidenciaram que o tempo de contacto deveria ser reduzido ao mínimo possível, uma vez que, sob agitação constante, praticamente não se encontrou atividade de ST no sobrenadante (Tabela 5).

Com base nos experimentos de contacto entre toxina e resina, o fluxo da cromatografia em uma coluna de permutador aniónico, de mesma dimensão da anterior, foi aumentado para 10ml por minuto. Desta forma, a atividade de ST foi encontrada na fração não retida pela coluna, obtendo-se um rendimento no processo de 71,4% e um aumento na atividade específica de 13,8 para 128.

Tabela 5 - Influência do tempo de contacto toxina/resina na adsorção

Amostras	Contacto	Nº de
	toxina/resina	U.T./ml
Toxina bruta		160
Sobrenadante	Agitações leves	40
"1ª lavagem"		10
Sobrenadante	Agitação constante	10
"1ª lavagem"		0

Discussão

Nossos estudos, iniciados com métodos tradicionais de precipitação e extração, mostraram que a enterotoxina ST não é precipitável pelos reagentes analisados. A atividade residual, detectada no precipitado, após tratamento por sulfato de amônio, TCA e acetona é, provavelmente, produto de arraste da enterotoxina por outros constituintes do meio.

Staples & Gianella (31) relataram, recentemente, uma sequência de purificação onde a extração por acetona foi utilizada durante o processo, para eliminação de contaminantes, ao contrário de Smith & Halls (29) que, em 1967, utilizaram precipitados de cultura obtidos após tratamento com acetona, como um material mais purificado da toxina ST, para testes de alça ligada de porcos.

No tratamento simultâneo de TCA e acetona a 50%, apenas atividade residual de ST foi detectada no precipitado obtido, talvez pela exposição demasiadamente longa da toxina ao ácido, somada às condições desnaturalizantes de acetona na concentração utilizada.

Os experimentos de ultrafiltração estão de acordo com os dados já relatados por outros autores (3, 18), de que o peso molecular da toxina ST estaria abaixo de 10.000d. Através da filtração em gel da toxina bruta, pelas resinas de Sephadex G-25 e G-15, verificou-se grande número de contaminantes. Muitos deles demonstraram adsorção à coluna, uma vez que foram eluídos após o volume interno.

Estas substâncias que, fugindo ao padrão normal de eluição, saem antes ou depois do volume correspondente ao seu peso molecular, são, frequentemente, moléculas de pequeno peso molecular, interagindo geralmente com os géis Sephadex G-10 e G-15, por ligações iônicas e aromáticas, que têm sido extensivamente estudadas por alguns autores (19, 34, 35). Com relação à própria toxina ST, o fato de ter apresentado pico de atividade muito próximo do volume interno nas cromatografias em G-10 e G-15, também evidencia uma adsorção à resina.

O estudo dos métodos dependentes de carga elétrica, exigiram que alguns fatores, tais como pH e força iônica do tampão, fossem analisados. Na faixa de pH de 5 a 10, testada para verificação da inativação da enterotoxina ST, a recuperação de U.T. foi de praticamente 100%. Desta forma, nesta mesma faixa foram realizados os experimentos de fixação da toxina às resinas de troca iônica. Nas chromatografias em permutador cationônico, onde a maior parte da toxina ficou retida, a alteração de pH aplicada à coluna não conseguiu eluir nenhuma fração com atividade de ST detectável pelo teste do camundongo recém-nascido. De maneira semelhante, a eluição da enterotoxina ST da resina DEAE-cellulose só foi alcançada na concentração de 0,3M de NaCl e este excesso de sal poderia interferir no teste do camundongo recém-nascido, único recurso possível no desenvolvimento deste trabalho, para a caracterização de ST. A diálise em sacos convencionais, para a eliminação do sal, eliminaria também a toxina ST, por causa do seu baixo peso molecular (3, 18).

Os melhores resultados em testes dependentes de carga elétrica foram alcançados com a resina permutadora aniónica, equilibrada em pH 9, onde o aumento na atividade específica, de cerca de 8 vezes, permite sugerir este método como primeiro passo no processo de purificação enterotoxina ST. Nas condições padronizadas, observou-se que, praticamente, apenas os contaminantes foram fixados à resina. Além disso, no processo de chromatografia, tivemos a vantagem de poder substituir ânions de sais minerais, encontrados na toxina bruta, por ânions voláteis do tampão acetato de amônio.

A padronização da chromatografia em permutador aniónico, estando a resina equilibrada em pH 9, sem que nenhuma inativação da enterotoxina ST tivesse sido observada, difere dos dados obtidos por Aldrete & Robertson (1). Esses autores determinaram, com toxina purificada de *E. coli* de origem suína, que o tratamento durante 30' a 37°C em pH 1 não causava dano à molécula, enquanto que, em condições semelhantes, em pH 9, a toxina era totalmente inativada.

Além dessa observação, outras características bioquímicas diferentes foram encontradas entre as enterotoxinas ST já purificadas (1, 31, 33), além de efeitos biológicos distintos verificados entre toxinas ST, de origem diversa (22).

Tudo isso, somado ao ensejo de desenvolver nossa própria tecnologia, leva-nos a relevar a importância do estudo desenvolvido por este trabalho, quanto às propriedades físico-químicas da toxina ST humana analisada, para que, com base nesses dados, possamos chegar a uma purificação ou semi-purificação da mesma.

Agradecimentos

Ao Prof. Jorge A. Guimarães, nossos agradecimentos pelas sugestões apresentadas no desenvolvimento deste trabalho, ao Conselho Nacional

de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, através do Programa de Saúde Animal e à FINEP - Financiadora de Estudos e Projetos.

Referências Bibliográficas

1. Alderete, J.F. & Robertson, D.C. - Purification and chemical characterization of the heat-stable enterotoxin produced by porcine strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 19: 1021-1030, 1978.
2. Banwell, J.G. & Sherry, H. - Effect of bacterial enterotoxins on the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, 65:467-497, 1973.
3. Bywater, R.J. - Dialysis and ultrafiltration of a heat-stable enterotoxin from *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.*, 5:337-343, 1971.
4. Castro, A.F.P.; Serafim, M.B.; Rangel, H.A. & Guerrant, R.L. - Swiss and inbred mice in the infant mouse test for the assay of *Escherichia coli* thermostable enterotoxin. *Infect. Immun.*, 22: 972-974, 1978.
5. Clements, J.D. & Finkelstein, R.A. - Isolation and characterization of homogeneous heat-labile enterotoxin with high specific activity from *Escherichia coli* cultures. *Infect. Immun.*, 24: 760-769, 1979.
6. Clements, J.D.; Yancey, R.J. & Filkelstein, R.A. - Pure heat-labile enterotoxin (LT) from *Escherichia coli* is similar to choleragen immunologically, structurally and in specific activity. In: - Proceedings of the 15th Joint Conference on Cholera, Bethesda, National Institutes of Health, p.127-141, 1979.
7. Dafni, Z. & Robbins, J.B. - Purification of heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli* O78:H11 by affinity chromatography with antiserum to *Vibrio cholerae* toxin. *J. Infect. Dis.*, 133: 5138-5141, 1976.
8. Dafni, Z.; Sack, R.B. & Graig, J.D. - Purification of heat-labile enterotoxin from four *Escherichia coli* strains by affinity immunoabsorbente: evidence for similar subunit structure. *Infect. Immun.*, 22:852-860, 1978.
9. Dean, A.G.; Ching, Y.C.; Williams, R.G. & Harden, L.B. - Test for *Escherichia coli* enterotoxin of diarrhea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.*, 125:407-411, 1973.
10. 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.
11. Evans, D.J.; Evans, D.G. & Gorbach, S.L. - Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man. *Infect. Immun.*, 8:725-730, 1973.
12. Field, D.M.; Graf Jr., L.H.; Latro, W.J. & Smith, D.L. - Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: in vitro effects: on guanylate cyclase activity, cyclic GMP concentration and ion transport in small intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 25: 2800-2804, 1978.

13. Franceschi, A.P.; Castro, A.F.P.; Serafim, M.B. & Pustiglione Netto, L. - Estudos comparativos entre o teste de alça ligada do intestino de coelho e do camundongo recém-nascido na detecção da enterotoxina termo-estável (ST) produzida por *Escherichia coli*. Rev. Microbiol. (São Paulo), 8:123-128, 1977.
14. Gianella, R.A. - Suckling mouse model for detection of heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin: characteristics of the model. Infect. Immun., 14:95-99, 1976.
15. Guerrant, R.L.; Brunton, L.L.; Schnattman, T.C.; Rebhun, L.I. & Gilman, A.G. - Cyclic adenosine monophosphate and alteration of Chinese hamster ovary cells morphology: a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. Infect. Immun., 10:320-327, 1974.
16. Gyles, C.L. - Immunological study of the heat-labile enterotoxins of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. Infect. Immun., 9:564-570, 1974.
17. Gyles, J.M.; SO, M. & Falkow, S. - The enterotoxin plasmids of *Escherichia coli*. J. Infect. Dis., 130:40-49, 1974.
18. Jacks, T.M. & WU, B.J. - Biochemical properties of *Escherichia coli* low-molecular weight heat-stable enterotoxin. Infect. Immun., 9:342-347, 1974.
19. Janson, J.C. - Adsorption phenomena of Sephadex. J. Chromatogr., 28:12-20, 1967.
20. Lowry, O.H.; Brough, R.N.J.; Farr, A.L. & Randall, R.J. - Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193:265-275, 1951.
21. Mitchell, I.G.; Tame, M.J. & Kenworthy, R. - Separation and purification of enterotoxins from a strain *Escherichia coli* pathogenic for pigs. J. Med. Microbiol., 7:439-450, 1974.
22. Olsson, E. & Soderlind, O. - Comparison of different assays for definition of heat-stable enterotoxigenicity of *Escherichia coli* porcine strains. J. Clin. Microbiol., 11:6-15, 1980.
23. Reis, M.H.L.; Castro, A.F.P.; Toledo, M.R.F. & Trabulsi, L.R. - Production of heat-stable enterotoxin by 0128 sorogroups of *Escherichia coli*. Infect. Immun., 24:289-290, 1979.
24. Sack, R.B. - Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. Ann. Rev. of Microbiol., 29:333-353, 1975.
25. Sack, D.A.; Kaminski, D.C.; Sack, R.S.; Wambla, T.O.; Ørskov, F.; Ørskov, I.; Slack, R.C.B.; Arthur, P.P. & Kapikian, A.Z. - Enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea of travellers: a prospective study of American peace corps volunteers. John Hopkins Med. J., 141:63-70, 1977.
26. Santos, D.; Palchaudhuri, S. & Maas, W.K. - Genetic and physical characteristics of an enterotoxin plasmid. J. Bacteriol., 124: 1240-1247, 1975.
27. Schenkein, I.; Green, R.F.; Santos, D.S. & Mass, W.K. - Partial purification and characterization of a heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. Infect. Immun., 13:1710-1720, 1976.

28. Serafim, M.B.; Castro, A.F.P.; Rangel, H.A. & Pustiglione Netto, L. - Isolation of heat-stable enterotoxins producing strains of *Escherichia coli* isolated from cases of diarrhea in Campinas, S.P., Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. (São Paulo), 19:141-212, 1977.
29. Smith, H.W. & Halss, S. - Studies on *Escherichia coli* enterotoxins. J. Path. Bact., 93:531-543, 1967.
30. Speirs, J.I.; Stavric, S. & Konowalchuk, J. - Assay of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin with Vero Cells. Infect. Immun., 16:617-622, 1977.
31. Staples, S.J. & Gianella, R.A. - Production and purification of human *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. In: - Proceedings of the 15th Joint Conference of Cholera, Bethesda, National Institutes of Health, p.127-141, 1979.
32. Svennerholm, A.M. & Holmgren, J. - Identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin by means of a ganglioside immunosorbent assay (Gml-ELISA) procedure. Curr. Microbiol., 1:19-23, 1978.
33. Takeda, Y.; Takeda, T.; Yano, T.; Yamamoto, K. & Miwatani, T. - Purification and partial characterization of heat-stable enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect. Immun., 25: 978-985, 1979.
34. Wasternack, C. - Gel chromatography of low molecular weight compounds. Pharmazie, 27:67-79, 1972.
35. Williams, K.W. - Solute gel interactions in gel filtration. Lab. Practice, 21:667-670, 1972.

TRATAMENTO DE EFLUENTES DA INDÚSTRIA DE CHAPAS DE FIBRAS DA MADEIRA COM FUNGOS MICELIANOS. I - SELEÇÃO DAS LINHAGENS E DETERMINAÇÃO DAS TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO*

Augusto Ferreira da Eira

Deptº de Defesa Fitossanitária
 Área de Biotecnologia Agrícola
 Faculdade de Ciências Agronômicas UNESP
 Campus de Botucatu
 18600 Botucatu SP, Brasil

Resumo

Os fundamentos e perspectivas da utilização de fungos micelianos, para tratamento aeróbico de efluentes da indústria de chapas de fibras da madeira, são discutidos. Foram selecionadas linhagens isoladas de acumulações limosas, ocorrentes na indústria, teoricamente mais adaptadas à biodegradação do substrato em estudo. A temperatura média ótima, para crescimento das linhagens selecionadas, foi de 27,8°C, implicando na necessidade de resfriamento dos efluentes industriais, descartados à temperatura média de 45°C, antes de submetê-los ao tratamento biológico proposto.

Summary

Mycelial fungi for fiberboard wastewater treatment. I - Selection of strains and determination of incubation temperatures

The basis and potential for utilization of mycelial fungi in aerobic fiberboard wastewater treatment are discussed. The optimal growth temperatures determined for strains, isolated from occurring slime accumulations, theoretically more adapted to the biodegradation of the substratum under study, averaged 27.8°C, which suggest that it is necessary to reduce the temperature of the effluent, usually at 45°C, before subjecting it to the proposed biological treatment.

Introdução

Numerosos trabalhos atestam os sérios problemas de poluição do ambiente, causados pelo despejo de resíduos industriais nos rios, solo e ar, em diferentes regiões do globo.

No Brasil, já em 1934 (32), alertava-se sobre a poluição de rios com restílo de usinas de açúcar e sua consequência na mortalidade de várias espécies de peixes. Tais problemas, como esperado, têm-se agravado acentuadamente com o crescimento e diversificação da indústria brasileira de transformação de matérias primas. Dentre as áreas de tecnologia bem desenvolvidas no Brasil, destacam-se os complexos industriais de transformação da madeira, onde são obtidos produtos de alto valor econômico, inclusive para exportação, como a

* Pesquisa subvencionada pela Duratex S.A. Ind. e Com.; parte da Tese de Livre-Docência do autor.

celulose, papel e chapas de madeira prensada. Além desses produtos principais, são gerados resíduos orgânicos que, se liberados no ambiente, podem causar desequilíbrios ecológicos de grande proporção. Ressalte-se que os resíduos de indústrias de chapas de fibras da madeira são menos poluentes do que, por exemplo, os resíduos gerados na produção de açúcar e álcool. Entretanto, o "equivalente populacional" desse tipo de indústria, apenas em Botucatu, com vazão contínua de 245m³/hora, chega às proporções do efeito poluidor de uma cidade de 1.100.000 habitantes.

No tocante ao manejo de águas residuárias para reciclagem no ambiente, é citado, na literatura, grande número de processos de tratamento, utilizados isoladamente ou formando conjuntos. A maioria desses processos refere-se ao tratamento de esgotos sanitários (7, 11, 13, 16, 18, 19, 20, 28, 42, 47, 48, 52, 54, 55, 59, 61, 62, 68, 70). Entretanto, também são frequentes os relatos de processos de tratamento biológico de águas residuárias industriais (8, 9, 21, 33, 37, 40, 41, 44, 67, 75, 76). Encontram-se também citações da mistura de efluentes industriais aos esgotos domésticos, entretanto, estas misturas afetam o desempenho dos sistemas de tratamento, de tal forma que uma série de pré-tratamentos dos resíduos industriais faz-se necessária, para minimizar os efeitos acima referidos (15).

As estações de tratamento de esgotos domésticos e de alguns efluentes industriais incluem, geralmente, tratamentos primários, secundários e terciários (15, 16, 21, 42, 65, 74).

Os tratamentos primários são normalmente empregados para remoção de areia e resíduos orgânicos, constituídos de partículas grandes facilmente sedimentáveis. Os processos de tratamento secundário (ou biológicos) envolvem sistemas extensivos como: lagoas de estabilização, lagoas aeradas, lagoas anaeróbicas, irrigação (tratamento de resíduos no solo ou "land treatment"), e sistemas intensivos em reatores (frequente e impropriamente referidos como "fermentadores"), tais como: "filtros biológicos", "lodo-ativado", valas de oxidação, tanques sépticos e digestores (3, 65). A maior parte desses processos envolve a biodegradação dos resíduos, através de sistemas metabólicos aeróbicos. Segundo Branco & Hess (3), o tratamento biológico anaeróbico é impraticável para grandes volumes de águas residuárias, face ao baixo rendimento na estabilização de compostos orgânicos.

O tratamento biológico envolve a transformação de substratos orgânicos e minerais, através do metabolismo microbiano de síntese celular e obtenção de energia. Dessa forma, os resíduos devem ser, necessariamente, biodegradáveis ou bioassimiláveis. Nos sistemas que envolvem o metabolismo de microrganismos quimiorganotróficos, uma fração da conversão da carga orgânica é destinada à obtenção de energia gerando, como sub-produto, o CO₂ que é normalmente descartado na atmosfera e, a outra fração, permanece no sistema, na forma de biomassa microbiana à qual deve ser dado um destino (11, 18, 19, 28, 47, 48, 62, 65). Os sistemas biológicos geram, ainda, outros subprodutos solúveis, referidos como produtos do metabolismo intermedio, principalmente ácidos orgânicos (1, 10, 57, 63, 66, 69).

Os sistemas convencionais de tratamento biológico de resíduos envolvem uma população extremamente variada de microrganismos, estabelecendo-se complexas relações sinergéticas e antagônicas entre vírus, bactérias, fungos, protozoários e algas (36, 49, 65, 67, 72).

Segundo Schroeder (65), estes sistemas complexos apresentam, como vantagem, o fato de que as culturas mistas adaptam-se às variações das condições do ambiente. Variações na constituição da água resíduária, temperatura e pH, alteram os biocomponentes da população. Espécies que elevam sua taxa de crescimento, tornam-se mais competitivas e, portanto, predominarão no sistema. Os materiais do resíduo continuam a ser metabolizados e o sistema mantém-se estável. Por outro lado, qualquer tipo de tratamento biológico requer estudos cuidadosos das condições do ambiente e parâmetros operacionais (18, 67). Os processos de "lodo-ativado", por exemplo, são particularmente sensíveis ao ambiente e condições de operação uma vez que, o tempo de contato do resíduo com os microrganismos é muito reduzido, compensando-se a eficiência do sistema com uma elevada concentração celular, obtida pela reciclagem do lodo biológico dos sedimentadores ao tanque de cultivo. Quanto menor o tempo de contato (residência hidráulica), maior será a velocidade de utilização do substrato e a sensibilidade do processo às variações do pH, temperatura, carga orgânica (concentração do substrato), fluxo e materiais tóxicos.

Um dos princípios, utilizados para melhorar a estabilidade desses processos, é a obtenção e adaptação do inóculo a processos de "lodo-ativado", através da coleta de "sementes" em estações de tratamento de resíduos sanitários, estações de tratamento do resíduo específico ou nos locais onde são gerados os resíduos industriais (67). Este princípio tem como base o estabelecimento de populações microbianas predominantes e adaptadas para decompor os compostos orgânicos específicos de cada água resíduária, cuja complexidade, em função do tipo de resíduo, tem sido extensivamente abordada na literatura (23, 26, 27, 29, 30, 36, 72).

Alguns autores, entretanto, vêm se dedicando ao estudo de processos de tratamento biológico de resíduos industriais, com a utilização de microrganismos pré-selecionados (5, 8, 9, 40, 41, 44, 50, 53, 64, 71, 75, 76). Alguns destes autores (8, 9, 53, 71, 75) têm estudado a utilização de fungos micelianos no tratamento biológico de resíduos industriais, enquanto que os demais têm utilizado leveduras e bactérias isoladamente (40, 41, 44, 50, 76), ou associações desses microrganismos para obtenção de efeitos sintrôficos (5, 64, 71).

Uma série de características específicas de certos resíduos industriais, bem como a necessidade de minimização dos custos de operação e manutenção de estações de tratamento, têm sido os propulsores para a seleção e utilização de microrganismos específicos para sistemas de tratamento biológico de resíduos industriais. Como exemplos, a exotermia incrrente a processos de biodegradação de hidrocarbonetos, estimularam a seleção de microrganismos termófilos, minimizando os custos de refrigeração dos reatores (14); para resíduos de difícil biodegradação, tais como os derivados de celulose e outros polímeros, são utilizados microrganismos altamente produtores das hidrolases específicas (5, 64, 71). A demanda crescente de fontes de proteína não convencionais, levou muitos pesquisadores a encarar os resíduos agrícolas e industriais como matéria prima para produção de "proteína microbiana monocelular", do inglês "single cell protein" ou SCP (43, 73), de uso imediato na alimentação humana ou animal, tais como: as leveduras *Candida utilis* e *Saccharomyces fibuliger*, no tratamento de águas resíduárias do processamento de batata (44); *C. utilis*, em vinhotto de cana-de-açúcar (50); *C. utilis*, associada a fungos micelianos e actinomicetos em resíduos de suínos (64, 71); associações de bactérias e leveduras em resíduos celulósicos (5) e *Torula* (*Candida*) *utilis*, em hidrolizados da madeira (40, 41).

Por outro lado, a minimização dos custos de colheita da biomassa, visando a produção de proteína microbiana, tem estimulado a utilização de fungos micelianos no tratamento de resíduos industriais, cujo crescimento, na forma de "pellets", permite a separação em meios filtrantes rápidos (telas), tais como filtros rotativos a vácuo (8, 9, 43, 46, 53, 75).

Na literatura, são relatados muitos gêneros e espécies de microrganismos micelianos utilizados ou potencialmente utilizáveis no tratamento de águas residuais, tais como: *Trichoderma viride* e *Gliocladium deliquescens*, para resíduos do processamento de cereais (8, 9); *Fusarium moniliforme*, em extratos de cenoura (46); *Morchella*, *Aspergillus niger*, *Myrothecium verrucaria*, *Penicillium chrysogenum*, *A. nidulans* em vários substratos (51); *Aspergillus oryzae*, *Paecilomyces elegans*, *Trichoderma viride*, *Myrothecium verrucaria*, *Gliocladium deliquescens* e *Penicillium* sp.- isolado B-71, para resíduos de destilarias e processamento do café (75); os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, em vários substratos (43); os gêneros *Absidia*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cephalosporium*, *Chaetomium*, *Chloridium*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Cunninghamella*, *Dematioides*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Graphium*, *Heliscostylum*, *Helminthosporium*, *Monilia*, *Mucor*, *Oidiodendron*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Scolecobasidium*, *Spicaria*, *Syncephalastrum* e *Trichoderma*, em alcanos (66); *Trichoderma viride*, QM-9123, *Coriolus versicolor*, *C. hirsutus*, *Poria subacida*, *Myrothecium verrucaria* e *Streptomyces* spp., em resíduos de suínos (64); *Geotrichum candidum*, *Morchella*, *Agaricus* spp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus oryzae*, *Mucor* sp. e *Rhizopus* sp., em vários resíduos agrícolas (53); *Aspergillus niger*, em resíduos de suínos (71), e, *Penicillium* spp. (tipos culturais T9, T10, T17, T51, T55, T66, T84, T91, T92, T94, T121, T139, T146, T160, T162, e T169), *Trichoderma viride* (T11 e T36), *Paecilomyces* sp. (T39), *Aspergillus niger* (T43), *Trichosporon pullulans* (T44), *T. cutaneum* (T137 e T157) e, *Sporotrichum* (T186), em "águas-servidas" de indústrias de chapas de fibras da madeira (23, 27).

O principal atrativo desses estudos é o aproveitamento de resíduos agro-industriais na produção de proteína microbiana ou utilização da biomassa fúngica como fertilizante agrícola. Entretanto, linhagens de *Aspergillus flavus*, *Fusarium tricinctum*, *Gibberella zeae*, (*F. graminearum* sin. *F. roseum*), *F. moniliforme*, *F. nivale*, *F. lateritium*, *Trichoderma lignorum* (35) e *Fusarium sporotrichioides*, *F. poae*, *Cladosporium epiphyllum*, *C. fagi*, *Penicillium islandicum*, *P. rugulosum*, *P. toxicarium*, *P. citreoviride*, *P. citrinum*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. ruber*, *A. oryzae*, *A. wentii*, *A. ostianus*, *P. puberulum*, *P. variabile* são relatadas na literatura como produtoras ou potencialmente produtoras de micotoxinas (34) e, como fitopatógenos, causando principalmente podridões em órgãos armazenados (35). Dados experimentais sobre os danos do consumo de alimentos contaminados com aflatoxinas são relatados na literatura (36).

Deve-se ressaltar que nos sistemas convencionais de tratamento biológico com culturas mistas, tais como os processos de "lodo-atimulado", a matéria orgânica utilizada para síntese permanece no sistema na forma de uma suspensão de complexos compostos orgânicos (constituídos principalmente por microrganismos e produtos microbianos). Esses materiais raramente são encarados como sendo de valor (18) ou,

ao contrário, o descarte do lodo biológico gerado nesses sistemas é a mais difícil e onerosa operação (67), compreendendo 25 a 50% dos custos anuais do tratamento de águas residuárias municipais (18), além dos riscos potenciais à saúde (11, 12, 17, 22, 39, 47).

Outro aspecto importante para o tratamento biológico de águas residuais, tanto nos sistemas convencionais como naqueles que utilizam microrganismos específicos, refere-se à determinação das condições ótimas de biodegradação. Dentre estas, a temperatura de incubação interfere, diretamente, na velocidade das reações intracelulares (10).

Segundo Cochrane (10), a temperatura afeta todas as atividades dos microrganismos. A análise de curvas típicas de crescimento microbiano, em função da temperatura, mostra uma fase linear de crescimento com o aumento da temperatura, uma região de ótimo crescimento seguida de um rápido declínio do crescimento, em função de um pequeno aumento da temperatura acima do ótimo. Quanto mais elevada a temperatura ótima de crescimento (p. ex. próxima a 40°C), mais abrupto será esse declínio ou, em outras palavras, a curva de crescimento em função da temperatura, torna-se mais assimétrica.

Nos estudos envolvendo o tratamento biológico de águas residuárias, a equação mais aceita, para o efeito da temperatura no crescimento, é uma forma modificada da equação de Arrhenius (65),

$$Rg = Rg_{(20)} \cdot (\psi^{T-20}),$$

onde $Rg_{(20)}$ é a razão de crescimento ou velocidade de crescimento ou velocidade a 20°C; T é a temperatura em °C; e ψ é uma constante, variando entre 1,00 e 1,15, na dependência do processo em estudo e da faixa de temperatura utilizada. Uma regra geralmente aceita é que as taxas de reação biológica dobram a cada 10°C, correspondendo a $\psi = 1,072$. Entretanto, na maioria dos processos de tratamento biológico, $\psi = 1,05$ (65).

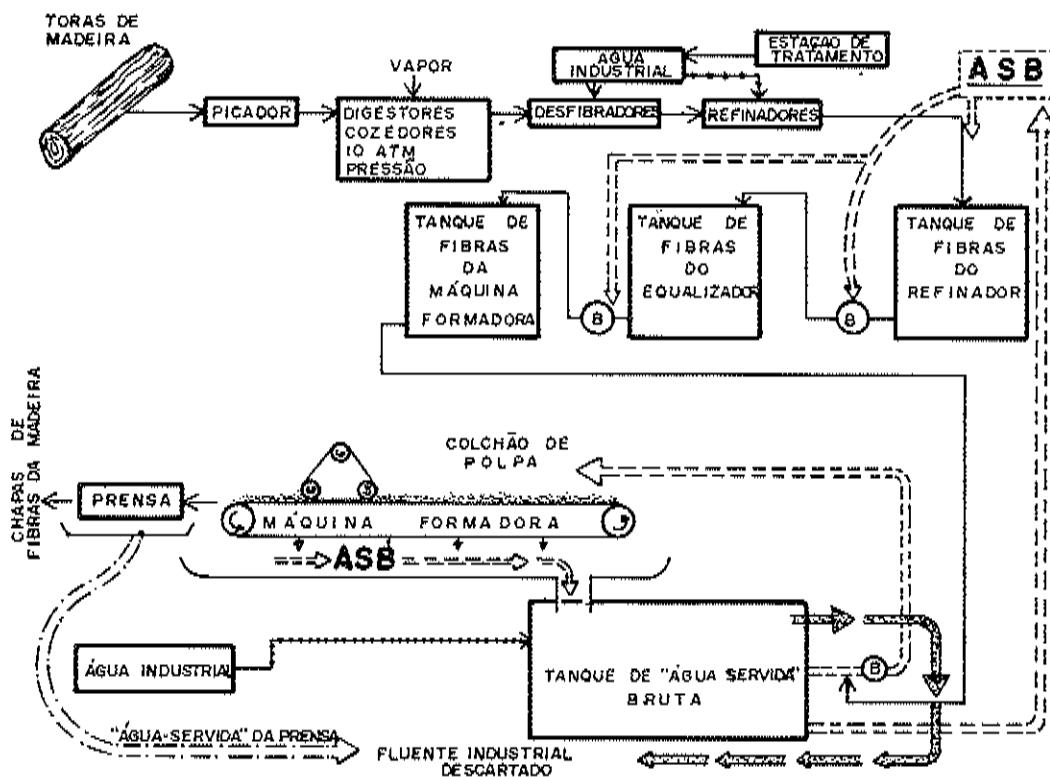
Neste trabalho, relata-se a primeira etapa de estudos visando o tratamento aeróbico de efluentes da indústria de chapas de fibras da madeira de eucalipto. São discutidos os fundamentos e perspectivas da utilização de fungos micelianos como reagentes e produtos do sistema de tratamento bem como, o efeito da temperatura de incubação no crescimento das linhagens selecionadas.

Material e Métodos

Os efluentes das indústrias de chapas de fibras da madeira, denominados "água-servida", caracterizam-se por elevada demanda química de oxigênio (DQO de 12.000mg de O₂/l, em média), originada de hidrolises parciais da celulose, hemicelulose e outros componentes da madeira, contendo em média 1,1% de carboidratos totais; apresenta ainda, teores muito baixos de nitrogênio (0,04%) e fósforo (0,006%) elevada acidez (pH em torno de 4,1) e, elevada turbidez (11.000mg sólidos totais/l, em média). A origem dos efluentes da indústria, constituídos principalmente pelas "água-servidas" bruta e da prensa, encontra-se esquematizada na Figura 1.

(*) Valor estimado com base na composição da madeira de *Eucalyptus* spp. (38) e, considerando a geração de "água-servida" à razão de 6m³/t de madeira.

Figura 1 - Esquema geral da origem das águas residuárias de indústrias de chapas de fibras de madeira prensada



(B) - Bomba hidráulica; (ASB) - "água-servida" - bruta.

Utilizou-se microrganismos micelianos, isolados de acumulações limosas de indústrias de chapas de fibras da madeira, selecionando-se 24 tipos culturais mais adaptados à "água-servida" (23, 26, 27) conforme identificação constante da Tabela 1.

Os microrganismos relacionados na Tabela 1, provieram da micoteca do Departamento de Defesa Fitossanitária da Faculdade de Ciências Agronômicas "Campus" de Botucatu, UNESP, conservados desde 1975 em meio de "água-servida"-agar (23, 26, 27) contido em ampolas hermeticamente fechadas.

No período da realização deste trabalho, iniciado em janeiro de 1977, os microrganismos foram previamente readaptados em meio de "água-servida" - agar, modificado de acordo com a constituição abaixo: "Água-servida" bruta, filtrada ($DQO \leq 12.000 \text{mgO}_2/l$), 1.000ml; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,1000g; KH_2PO_4 , 0,2177g; Agar Merck em pó, 15,00g; pH, 5,5.

Na obtenção do referido meio, a "água-servida" foi previamente filtrada, através de velas de gesso e com auxílio de uma bomba de vácuo. A correção do pH, efetuada através da adição de NaOH - 1N, visou evitar a hidrólise do agar frequentemente observada durante a auto-

Tabela 1 - Microrganismos pré-selecionados para biodegradação da "água-servida"

Identificação	Identificação	Tipo cultural	Tipo cultural
T9 Penicillium sp.	T91 Penicillium sp.	T9	Penicillium sp.
T10 Penicillium sp.	T92 Penicillium sp.	T10	Penicillium sp.
T11 Trichoderma viride Pers	T94 Penicillium sp.	T11	Trichoderma viride Pers
T17 Penicillium sp.	T121 Penicillium sp.	T17	Penicillium sp.
T36 Trichoderma viride	T127 Trichosporon cutaneum (de Beurk, Gougerot et Vuicher) Ota	T36	Trichoderma viride
T39 Paecilomyces sp.	T139 Penicillium sp.	T39	Paecilomyces sp.
T43 Aspergillus niger van Tiegh	T146 Penicillium sp.	T43	Aspergillus niger van Tiegh
T44 Trichosporon pullulans (Linder) Diddens et Loddor	T157 Trichosporon cutaneum	T44	Trichosporon pullulans (Linder) Diddens et Loddor
T51 Penicillium sp.	T160 Penicillium sp.	T51	Penicillium sp.
T58 Penicillium sp.	T162 Penicillium sp.	T58	Penicillium sp.
T66 Penicillium sp.	T169 Penicillium sp.	T66	Penicillium sp.
T84 Penicillium sp.	T186 Sporotrichum sp.	T84	Penicillium sp.

clavagem (1 atmosfera 120°C, durante 20 minutos).

A manutenção e manipulação das culturas foi sempre realizada através da transferência de populações, elaborando-se suspensões de esporos a partir de culturas em meio de "água-servida" - agar (conforme modificação anteriormente descrita) incubadas entre 7 e 30 dias, a 27°C. Os esporos foram suspensos em 10ml de água estéril com 0,25% de espalhante (Sandovit) quebrando-se a tensão superficial inerente aos esporos (testes preliminares demonstraram inocuidade do espalhante na germinação de esporos, à referida concentração). A contagem de esporos, para padronização das concentrações desejadas, foi realizada através de câmaras de Neubauer.

As faixas de temperatura para crescimento máximo de 24 culturas, pré-selecionadas para tratamento de "água-servidas", relatadas na Tabela 1, foram determinadas "in vitro" mediante incubação às temperaturas de 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 e 33°C. Após o período de readaptação, descrito anteriormente, uma suspensão concentrada de esporos de cada cultura foi transferida ao centro de placas de Petri, contendo meio de "água-servida" - agar (modificado), através de uma alça de platina em forma de aro (2mm de diâmetro). Como critério de homogeneidade, o meio foi preparado para todo o conjunto de testes e as estufas foram mantidas em sala climatizada à temperatura de 22°C ($\pm 2^\circ\text{C}$).

Face às diferentes características, no crescimento radial das culturas testadas, foram realizadas duas leituras do diâmetro médio das colônias (em cm): às 48 e 96 horas de incubação. Os dados não foram submetidos à análise estatística e consistiram na média de duas repetições por tratamento.

Resultados e Discussão

O tratamento biológico aeróbico de "água-servidas" da indústria

de chapas de fibras da madeira, envolvendo a utilização de fungos micelianos, hipótese central desta pesquisa, foi aventado com base em resultados anteriormente relatados para este tipo de efluente (23, 26, 27) e nos fundamentos dos sistemas de tratamento biológico, profusamente discorridos na literatura (8, 9, 40, 41, 42, 43, 44, 49, 50, 51, 52, 53, 63, 64, 65, 67, 72, 75).

Um aspecto que será inicialmente discutido refere-se, portanto, à escolha da alternativa de utilização de microrganismos selecionados, relativamente aos processos convencionais de tratamento.

Os processos de tratamento aeróbico de águas resíduárias mais comumente utilizados incluem "lagoas de estabilização", "filtros biológicos" e "lodo-ativado", tendo como base a biodegradação por populações microbianas naturais adaptadas aos efluentes (3). Ainda que a eficiência de biodegradação por populações seja superior à obtida com microrganismos isolados, existindo uma sintrofia entre os elementos dessa população (29, 30, 31, 36, 49, 58, 65, 69), diminui-se a possibilidade do aproveitamento econômico de subprodutos do processo biológico, além da eficiência muito dependente das condições ambientais (18, 30, 31, 36, 67).

Todo trabalho envolvendo a fisiologia de microrganismos, em processos de biodegradação de resíduos orgânicos, deve começar pela seleção de microrganismos genéticamente adaptadas ao consumo desses resíduos, uma vez que suas elevadas taxas de crescimento, nesse substrato, podem favorecer-las nas comunidades naturais de acordo com o princípio darwiniano de seleção natural. Este princípio fundamental já era usado nos primórdios da microbiologia, por Pasteur, em várias fermentações alcoólicas que, até então, não surtiam resultados repetitivos (69) pois envolviam populações microbianas complexas. Pasteur, utilizando o método de transferências sucessivas do inóculo no mesmo substrato, conseguira culturas microbianas praticamente puras ainda que empiricamente.

O mesmo princípio, também abordado por outros autores (8, 9, 67, 75), serviu de base para estudar o tratamento dos resíduos de indústrias de chapas de madeira, uma vez que os microrganismos selecionados foram isolados de acumulações limosas microbianas ocorrentes nessas indústrias (23, 26, 27).

Por outro lado, a natureza das "água-servidas" de indústrias de chapas de fibras da madeira, tomado-se por base a composição da madeira de *Eucaliptus spp.*, inclui compostos carbonados, tais como: polissacáideos insolúveis (celulose, hemicelulose e substâncias pecticas), polímeros naturais complexos (ligninas, taninos e resinas) e uma fração constituída de açúcares mais simples, tais como as hexoses e, principalmente, as pentoses xilose e arabinose (2, 4). As madeiras de *Eucaliptus spp.*, apresentam, ainda, baixos teores de nitrogênio e fósforo (38). Considerando o conceito de biodegradabilidade (3), bem como, as exigências nutricionais da maioria dos microrganismos heterotróficos em fontes de carbono e energia mais prominentemente assimiláveis (10, 69), pode-se inferir a menor biodegradabilidade das "água-servidas" utilizadas em relação a efluentes do processamento de alimentos e, principalmente, de usinas de açúcar e álcool. Esta característica da "água-servida", entretanto, pode ser encarada como uma vantagem para o tratamento biológico envolvendo microrganismos selecionados, uma vez que um menor número de espécies componentes da população terão capacidade de competir. No caso de á-

guas resíduárias ricas em hexoses, de fácil utilização pela maioria dos microrganismos, a probabilidade de que um componente da população predomine no sistema torna-se sensivelmente maior, principalmente se o organismo específico para o tratamento não tiver sido escolhido pelo princípio de seleção natural. Deve ser ressaltado, no entanto, que o sistema proposto é apenas uma variante do processo convencional por "lodo-ativado", uma vez que, sob condições naturais, uma população microbiana deverá estabelecer-se em sintrofia com a linhagem miceliana predominante.

Dentre as perspectivas, relacionadas ao sistema de tratamento biológico proposto, podem ser enfatizadas as possibilidades do aproveitamento da biomassa fúngica, gerada na biodegradação, como fertilizante agrícola e/ou suplemento proteico de rações. A última alternativa, apesar de economicamente mais convidativa (43), será provavelmente menos exequível uma vez que, os fungos selecionados para esta pesquisa, são relatados na literatura como produtores ou potencialmente produtores de micotoxinas (34, 35) embora algumas espécies, tais como *Trichoderma viride* (8, 9) e *Aspergillus niger* (53), não tenham apresentado efeitos tóxicos ou anomalias internas em ratos, para dietas de até 40% de micélio incorporado à ração.

A perspectiva de utilização da biomassa fúngica como fertilizante agrícola, entretanto, apresenta-se mais promissora não apenas pela possibilidade de sua incorporação direta no solo (como matéria orgânica parcialmente estabilizada), mas também pelo fato de que linhagens de *Aspergillus niger*, *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e outros fungos micelianos têm sido relatados como solubilizadores de fosfatos naturais (6, 25, 60), podendo representar um atrativo na utilização da biomassa fúngica "in natura", para incrementar o valor fertilizante de fosfatos naturais.

Em contraposição (tratamento de resíduos municipais), o processo de tratamento biológico por "lodo-ativado" é, frequentemente, operado com baixas concentrações de nitrogênio, fósforo e outros nutrientes minerais, com a finalidade de diminuir o rendimento celular (65). Alguns autores (18, 65, 67), ressaltam que o lodo biológico, gerado nesses processos, deve ser retirado do sistema através de tratamentos adicionais de decantação e posterior concentração. Por outro lado, esses sub-produtos são de utilização perigosa à saúde pública podendo veicular viroses, enterobactérias, amebas e outros patógenos, tornando indesejável um elevado rendimento celular (11, 12, 17, 22, 39, 47).

Outro aspecto de caráter geral, mas não menos importante, refere-se à conduta na manutenção das culturas "in vitro". Conforme enfatizado na literatura (23, 24, 26) e no presente trabalho, os microrganismos foram mantidos e manipulados sempre em meio natural de "água-servida", suplementado com nitrogênio e fósforo em função dos objetivos específicos. Este procedimento, aliado aos subcultivos através de transferências sucessivas de populações de esporos, visou manter os microrganismos sob constante pressão de seleção do meio específico, bem como, evitar que mutações indesejáveis viessem descharacterizar as referidas linhagens.

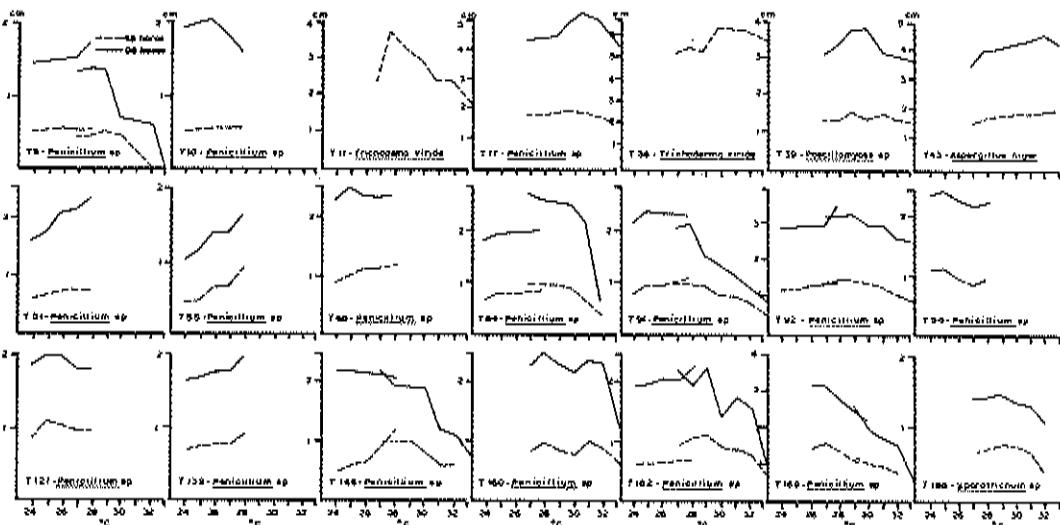
As repicagens sucessivas a partir de esporos, normalmente, evitam a perda da capacidade de esporulação, uma vez que esta característica, ligada principalmente a fatores genéticos, está associada a substâncias estimulantes normalmente transportadas pelos esporos (45). Frequentemente, há necessidade de se efetuar culturas monospóricas para eventual purificação da linhagem em estudo. Entretanto, os ris-

cos da obtenção de uma linhagem geneticamente diferente aumentam, uma vez que sempre há a possibilidade da cultura monospórica originar-se de um esporo mutante. Neste caso, uma série de biotestes deve ser efetuada para ratificar as características originais da cultura (63).

Estes princípios têm sido esquecidos por vários autores, em estudos de tratamento biológico de resíduos, onde a manutenção das culturas é realizada em meios artificiais completamente diferentes do substrato em estudo e os métodos de manipulação das culturas, normalmente, são omitidos (8, 50, 64, 71, 75).

Os resultados apresentados na Figura 2, referentes à determinação das temperaturas ótimas de crescimento para 21 tipos culturais(*) de microrganismos micelianos denotam, conforme relatado na literatura (10), que os referidos microrganismos podem ser enquadrados no grupo mesofílico. Por outro lado, a validade dos estudos de crescimento, em função da temperatura, é dependente do meio e do método de medida do crescimento.

Figura 2 - Crescimento radial de 21 culturas de microrganismos micelianos, em meio de "água-servida"-agar, em função da temperatura de incubação



Nas ordenadas, crescimento radial em cm e, nas abscissas, temperatura de incubação em °C. Dados médios de 2 repetições, obtidos às 48 e 96 horas de incubação.

(*) O ensaio envolveu 24 culturas, entretanto, não foram obtidos dados para as culturas T44, T137 e T157, face à ocorrência de contaminações.

Desta forma, alguns autores citados na literatura (10), relataram que as diferenças no crescimento radial, de microrganismos micelia- nos, nem sempre correlacionam-se com os valores obtidos através do peso seco em cultivo submerso. Entretanto, para o caso específico de uma linhagem de *Aspergillus niger* (53), o crescimento radial corre- lacionou-se com o peso seco em cultivo submerso, utilizado na deter- minação do tempo de geração dessa cultura. Cochrane (10), analisando os trabalhos conflitantes, concluiu que o crescimento radial é um método adequado para estudo de algumas variáveis do ambiente, inclu- sive a temperatura.

Por outro lado, as linhagens selecionadas para o tratamento de "água-servidas" apresentaram, em média, uma temperatura ótima de crescimento a 28°C, implicando na necessidade de um pré-tratamento para resfriar o efluente industrial, descartado à temperatura média de 45°C, na dependência do tipo cultural utilizado. Deve-se ressal- tar que pré-tratamentos de substratos para facilitar a ação biode- gradadora de microrganismos, inclusive esterilização do substrato para produção de proteína microbiana, mesmo demandando custos adi- cionais, têm sido propostos por alguns autores (40, 41, 64, 71, 73).

Agradecimentos

Aos Doutores João Batista de Moura, Cesar Augusto Traldi e Francisco de Assis Guimarães, elos indispensáveis entre a Duratex S.A. In- dústria e Comércio e a realização deste trabalho.

Referências Bibliográficas

1. Alexander, A. - Introduction to soil microbiology. 4.ed. New York, John Wiley & Sons, 1961.
2. Andrade, E.N. - O Eucalipto. São Paulo, Companhia Paulista de Es- tradas de Ferro, 1961.
3. Branco, S.M. & Hess, M.L. - Tratamento de resíduos. In:-Aquarone, E.; Borzani, W. & Lima, U.A. - Biotecnologia: tópicos de micro- biologia industrial. São Paulo, Ed. Edgard Blücher & Ed. Univ. São Paulo, 1975.
4. Brown, H.P.; Panshin, A.J. & Forsaith, C.C. - Textbook of wood technology. Vol. II - The physical mechanical and chemical pro- perties of the commercial woods of the United States. N.Y., To- ronto, London, McGraw-Hill, 1952.
5. Callihan, C.D.; Dunlap, C.E. & Irwin, G.H. - Recycle of cellulosic waste by conversion to protein. IV Global Impacts appl. Microbiol. (São Paulo), 2:899-919, 1973.
6. Carvalho, P.C.T.; Eira, A.F. & Pellegrino, D. - Solubilização quantitativa de fosfatos insolúveis, por algumas espécies dos gé- neros *Aspergillus* e *Penicillium*. Anais Esc. Sup. Agric. "Luiz de Queirós" (Piracicaba), 26:173-185, 1969.
7. Cashion, B.S.; Keinath, T.M. & Schuk, W.W. - Control strategies for the activated sludge process. Wat. Pollut. Control Fed., 50th Annual Conf. (Clemson, SC), 27p., 1977.
8. Church, B.D. - Application of fungi imperfecti for treatment of

- cereal processing wastes. USDA, N. Star Res. Dev. Inst. (Washington), 4th Quartely Rep., 32 fls. 1973 (mimeo).
9. Church, B.D.; Erickson, E.E. & Widmer, C.M. - Fungal digestion of food processing wastes. *Fd. Technol.* (Champaign), 27:36-42, 1973.
 10. Cochrane, V.W. - Physiology of fungi. New York, John Wiley & Sons, 1958.
 11. Clark, C.S.; Bjornson, H.S.; Holland, J.W.; Elia, V.J.; Majeti, V.A.; Meyer, C.R.; Balistreri, W.F.; Van Meer, G.L.; Gartside, P.S.; Specker, B.L.; Linnemann Jr., C.C.; Jaffa, R.; Scarpino, P.V.; Brenner, K.; Davis-Hoover, W.J.; Barrett, G.W.; Anderson, T.S. & Alexander, D.L. - Evaluation of the health risks associated with the treatment and disposal of municipal wastewater and sludge. United St. Env. Protection Ag. - 600/Sl-81-030, 6p., 1981.
 12. Clark, C.S.; Linnemann Jr., C.C.; Van Meer, G.L.; Schiff, G.M.; Gartside, P.S.; Bjornson, A.B.; Cleary, E.J.; Phair, J.P.; Buncher, C.R.; Alexander, D.L.; Trinble, S.E. & Barnett, B.C. - Healt risks of human exposure to wastewater. United St. Env. Protection Ag.-600/Sl-81-002, 4p., 1981.
 13. Collins,* C.E.; Incropera, F.P. & Grady Jr., C.P.L. - Effect of temperature control on biological wastewater treatment process. *Wat. Res.* (Oxford), 12:547-554, 1978.
 14. Cooney, C.L. & Wang, D.I.C. - Engineering problems in hydrocarbon fermentation. IV Global Impacts appl. Microbiol. (São Paulo), 2:873-898, 1973.
 15. Culp, R.L.; Wesner, G.M. & Culp, C.L. - Handbook of advanced wastewater treatment. 2. ed. New York, Van Nostrand Reinhold Company, 1978.
 16. Davanzo, A.C. - Staff training at a large treatment plant. Part II: 1 - Development & implementation. 2 - Benifits. *Wat. Pollut. Control Fed.*, 51th Annual Conf. (Anaheim, Ca), Session no 21, 12p., 1978.
 17. Dawson, J.F.; Hain, E.; McClure, B.; Sheridan, R.E. & Yeager, J. G. - Sewage sludge pathogen transport model project. United St. Env. Protection Ag.-600/Sl-81-049, 4p., 1981.
 18. Dick, R.I. - Activated sludge treatment, generation and disposal. In:- Bennet, G.F. - Water. II- Biological wastewater treatment. A.I.Ch.E., Symposium Series (N.Y.), 73:66-77, 1977.
 19. Dick, R.I. - Sludge treatment, utilization, and disposal. *J.Wat. Poll. Control Fed.* (Washington), 50:1096-1131, 1978.
 20. Dick, R.I. - Underflow rate and control of an activated sludge process (Discussion). *J. Wat. Poll. Control Fed.* (Washington), 50:2604-2606, 1978.
 21. Eckenfelder Jr., W.W. - Technical considerations of biological physical and chemical treatment combinations for improved effluent quality from industrial wastewaters. *Prog. Wat. Tech.* (N. Y.), 10:431-446, 1978.
 22. Edds, G.T. & Davidson, J.M. - Sewage sludge viral and pathogenic agents in soil-plant-animal systems. United St. Protection Ag.- 600/Sl-81-026, 3p.,1981.

23. Eira, A.F. - O problema de acumulações limosas de origem microbiana em indústrias de chapas de fibras da madeira. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz", mimeografado, 1975. (Dissertação de Mestrado).
24. Eira, A.F. - Utilização de fungos micelianos no tratamento de efluentes da indústria de chapas de fibras da madeira de eucalipto. Botucatu, Faculdade de Ciências Agronômicas - UNESP, 1981. (mimeografado). (Tese de Livre-Docência).
25. Eira, A.F. & Carvalho, P.C.T. - Levantamento de microrganismos solubilizadores de fosfatos. *Rickia* (São Paulo), 5:114-124, 1970.
26. Eira, A.F.; Carvalho, P.C.T.; Goldoni, J.S. & Assumpção, Eneida-Acumulações limosas na indústria de chapas de fibras de madeira. I- Natureza da flora microbiana. *Rev. Microbiol.* (São Paulo), 8: 31-35, 1977.
27. Eira, A.F.; Carvalho, P.C.T. & Ruano, O. - Acumulações limosas na indústria de chapas de fibras de madeira. II- Caracterização e reprodução "in vitro" das acumulações limosas. *Rev. Microbiol.* (S.Paulo), 8:64-73, 1977.
28. Ekama, G.A. & Marais, Gv.R. - The activated sludge process. Part II- Dynamic behaviour. *Wat. SA* (Pretoria), 3:18-50, 1977.
29. Eveleigh, D.E. & Brewer, D. - Ecological observations on the fungi and bacteria in slime accumulations in a paper mill. *Can. J. Bot.* (Ottawa), 42:35-43, 1964.
30. Eveleigh, D.E. & Brewer, D. - Nutritional requirements of the microflora of a slime accumulation in a paper mill. *Can. J. Bot.* (Ottawa), 42:341-350, 1964.
31. Eveleigh, D.E. & Brewer, D. - Interrelationships between microorganisms in a accumulation of slime in a paper mill. *Can. J. Bot.* (Ottawa), 43:519-526, 1965.
32. Faria, A. - Os resíduos industriais e a contaminação das águas interiores. Ministério da Agricultura, Departamento Nacional da Produção Animal, Serviço de Caça e Pesca, 15p., 1934.
33. Filgueiras, G. - Vinhoto como matéria-prima para produção de biogás. *Saccharum*, 2:12-15, 1979.
34. Fonseca, H. - Micotoxinas em alimentos. IV Global Impacts appl. *Microbiol.* (São Paulo), 2:615-622, 1973.
35. Ford, R.E.; Jacobsen, B.J. & White, D.C. - Mycotoxins environmental contaminants in nature. *Illinoian Res.* (Urbana), 20:10-11, 1978.
36. Gaudy Jr., A.F. & Gaudy, E.T. - Microbiology of waste waters. A. *Rev. Microbiol.* (Palo Alto), 20:319-336, 1966.
37. Gove, G.W. - Pulp and paper industry wastewater management. *J. Wat. Pollut. Control Fed.* (Washington), 51:1330-1360, 1979.
38. Haag, H.P.; Mello, F.A.F.; Brasil Sobrinho, M.O.C.; Acorsi, W.R.; Malavolta, E. & Arzolla, S. - Estudos sobre a alimentação mineral do eucalipto. Sintomas das deficiências dos macronutrientes e composição mineral. Segunda Conf. Mundial do Eucalipto, 2:926-932, 1961.

39. Harding, H.J.; Thomas, R.E.; Johnson, D.E. & Sorber, C.A. - Aerosols generated by liquid sludge application to land. United St. Env. Protection Ag.-600/SI-81-018, 2p., 1981.
40. Harris, E.E.; Hannan, M.L.; Marquardt, R.R. & Bubl, J.J. - Fermentation of wood hydrolyzates by *Torula utilis*. Ind. Engng. Chem. analyt. Edn. (Easton, Pa), 40:1216-1220, 1948.
41. Harris, E.E.; Saeman, J.F.; Marquardt, R.R.; Hannan, M.L. & Rogers, S.C. - Fodder yeast from wood hydrolyzates and still residues. Ind. Engng. Chem. analyt. Edn. (Easton, Pa), 40:1220-1223, 1948.
42. Imhoff, K. - Manual de tratamento de águas residuárias. 21. ed. São Paulo, Ed. Edgard Blücher & Ed. Univ. São Paulo, 1966.
43. Kihlberg, R. - The microbe as a source of food. A. Rev. Microbiol. (Palo Alto), 26:427-466, 1972.
44. Lemmel, S.A.; Heimsch, R.C. & Edwards, L.L. - Optimizing the continuous production of *Candida utilis* and *Saccharomyces fibuliger* on potato processing wastewater. Appl. Environ. Microbiol. (Baltimore), 37:227-232, 1979.
45. Lilly, V.G. & Barnet, H.L. - Physiology of the fungi. N.Y., MacGraw-Hill, 1951.
46. Macris, B.J. & Kokke, R. - Continuous fermentation to produce fungal protein. Effect of growth rate on the biomass yield and chemical composition of *Fusarium moniliforme*. Biotechnol & Bioeng. (N.Y.), 20:1027-1035, 1978.
47. Maejti, V.A. & Clark, C.S. - Potential health effects from viable emissions and toxins associated with wastewater treatment plants and land applications sites. United St. Env. Protection Ag.-600/SI-81-006, 4p., 1981.
48. Marais, Gv.R. & Ekama, G.A. - The activated sludge process. Part I- Steady state behaviour. Wat. Sa. (Pretoria), 2:164-200, 1976.
49. Marshall, C.E. - Microbial associations. Science (N.Y.), 41:306-312, 1915.
50. Martelli, H.L. & Souza, N.O. - Obtenção de biomassa de *Candida utilis* crescendo em vinhotto de cana. Rev. Bras. Tecnol.. (São Paulo), 9:157-164, 1978.
51. Metz, B. & Kossen, N.W.F. - Biotechnology review: the growth of molds in the from of pellets: a literature review. Biotechnol. & Bioeng. (N.Y.), 19:781-799, 1977.
52. Moo-Young, M. & Van Dedem, G.-Process criteria for aerobic microbiological degradation of wastes. IV Global Impacts appl. Microbiol. (São Paulo), 2:945-966, 1973.
53. Morris, G.G.; Imrie, F.K.E. & Phillips, K.C. - The production of animal feedstuffs by the submerged culture of fungi on agricultural wastes. IV Global Impacts appl. Microbiol. (São Paulo), 2: 979-996, 1973.
54. Olsson, G. & Andrews, J.F. - The dissolved oxygen profile: a valuable tool for control of the activated sludge process. Wat. Res. (Oxford), 12:985-1004, 1978.

55. Painter, H.A. & King, E.F. - The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants. *Wat. Res.* (Oxford), 12:909-915, 1978.
56. Parpia, H.A.B. & Sreenivasamurthy, V. - The aflotoxin problem in trade. IV Global Impacts appl. Microbiol. (São Paulo), 2:623-632, 1973.
57. Pelczar Jr., M.J. & Reid, R.D. - *Microbiology*. 2. ed. New York, McGraw-Hill, 1965.
58. Pochon, J. & Barjac, H. - *Traté de microbiologie des sols: applications agronomiques*. Paris, Dunod Ed., 1958.
59. Prescan, N.L. - Design and construction of an activated sludge plant. In:- Bennet, C.F. - *Water. II - Biological wastewater treatment*. A.I.Ch.E., Symposium Series (N.Y.), 73:78-85, 1977.
60. Ramos, A.; Callao, V. & Carvalho, P.C.T. - La solubilizacion de fosfatos per hongos del suelo. *Microbiologia esp.* (Madrid), 21: 1-15, 1968.
61. Rao, C.U.; Tyteca, D. & Nyns, Edmond-Jacques - Total organic carbon-calibrated mathematical model for a completely mixed activated sludge wastewater treatment process. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* (N.Y.), 6:1-12, 1978.
62. Reece, C.S.; Roper, R.E. & Leslie Grady Jr., C.P. - Aerobic digestion of waste activated sludge. *J. Environ. Engng. Div.* (Ann Arbor, Mich.), 105:261-272, 1979.
63. Rhodes, A. & Fletcher, D.L. - *Principios de microbiología industrial*. Zaragoza, Típo-Linea, 1969.
64. Savage, J.; Maxwell, W.A.; Chase, T. & Macmillan, J.D.-Microbiological conversion os swine waste to single-cell protein. IV Global Impacts appl. Microbiol. (São Paulo), 2:967-977, 1973.
65. Schroeder, E.D. - *Water and wastewater treatment*. New York, McGraw-Hill, 1977.
66. Senez, J.C. - Voies métaboliques de dégradation des hydrocarbures paraffiniques par les micro-organismes. IV Global Impacts appl. Microbiol. (São Paulo), 2:861-871, 1973.
67. Shell, G. - Activated sludge process development for treating industrial wastewaters. In:- Bennet, G.F. - *Water. II- Biological wastewater treatment*. A.I.Ch.E., Symposium Series (N.Y.), 73: 86-94, 1977.
68. Stall, T.R. - Evaluation of control parameters for the activated sludge process. *J.Wat. Pollut. Control Fed.* (Washington), 50: 450-457, 1978.
69. Stanier, R.Y.; Duodoroff, M. & Adelberg, E.A. - *Mundo dos micrōbios*. São Paulo, Edargd Blücher & USP, 1969.
70. Stenstrom, M.K. & Andrews, J.F. - Real-time of activated sludge process. *J. Environ. Engng. Div.* (Ann Arbor, Mich.), 105:245-260, 1979.
71. Stessel, H.; Savage, J.; Maxwell, W.A. & Gentry, N. - Kinetic studies on mixed culture fermentation of swine waste. IV Global Impacts appl. Microbiol. (São Paulo), 2:997-1004, 1973.

72. Taber, W.A. - Wastewater microbiology. An. Rev. Microbiol. (Palo Alto), 30:263-277, 1976.
73. Taylor, T.J. & Senior, P.J. - Single cell proteins: a new source of animal feeds. Endeavour (Oxford), 2:31-34, 1978.
74. Thompson, W.B. - Staff training at a large wastewater treatment plant. Part I- Consultant's comments. Wat. Pollut. Control Fed., 51th Annual Conf. (Anaheim, Ca), Session 21, 11p., 1978.
75. Updegraff, D.M.; Espinosa, R.; Griffin, L.; King, Jeannette; Schneider, S. & Rolz, C. - The production of animal feed by the growth of fungi on wastes from the coffee and rum-distilling industries. Devs. Ind. Microbiol. (N.Y.), 14:317-324, 1973.
76. Yoshizawa, K. - Treatment of wastewater discharged from a saké brewery using yeast. J. Ferment. Technol. (Osaka), 56:389-395, 1978.

ATIVIDADE DE SUBSTÂNCIAS DE ORIGEM VEGETAL NA INIBIÇÃO DO
CRESCIMENTO E NA PRODUÇÃO DE AFLATOXINAS POR *ASPERGILLUS FLAVUS* E *A.*
PARASITICUS

Rita de Cassia Salomão
& Adhemar Purchio

Deptº de Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas USP
Caixa Postal 4365
01000 São Paulo SP, Brasil

Resumo

Investigou-se a atividade de substâncias isoladas de extratos, obtidos de estruturas vegetais, na inibição do crescimento e na produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. A fração mais ativa foi obtida do suco da folha de *Agave sisalana* (sisal), a qual demonstrou efeito impediente acentuado no crescimento fúngico, bem como na inibição da produção de aflatoxina por *A. parasiticus* (100%) e *A. flavus* (23%). Atividades menores foram observadas com os extratos de *Bidens pilosa* (fruto), *Xylopia aromatica* (fruto), *Stryphnodendron barbadetiman* (casca) e *Dimorphandra mollis* (casca).

Summary

Activity of extract of plants in the inhibition of growth and aflatoxin production of Aspergillus flavus and A. parasiticus

It has been studied the activity of some extracts obtained from parts of plants in the inhibition of growth and aflatoxin production of *A. flavus* and *A. parasiticus*. The most active fraction was obtained from the juice of the leaf of *Agave sisalana* (sisal) which presented a remarkable effect on fungal growth as well as in the inhibition of aflatoxin production of *A. parasiticus* (100%) and *A. flavus* (23%). Slight activities were observed with the extract of *Bidens pilosa* (fruit), *Xylopia aromatica* (fruit), *Stryphnodendron barbadetiman* (bark), *Dimorphandra mollis* (bark).

Introdução

A partir do momento em que se constatou, há 20 anos passados, a atividade tóxica das aflatoxinas, formou-se verdadeira frente de especulação científica em torno do problema. Em pouco tempo, foram estudados diversos aspectos relacionados aos fungos produtores, aos animais afetados e às aflatoxinas, propriamente ditas.

Todavia, ainda existem algumas indagações a serem esclarecidas, relativas a aspectos de controle ou prevenção da contaminação por fungos e consequente produção de micotoxinas, bem como à sua atividade, em bases concretas, na patologia humana.

Com relação ao primeiro aspecto, destacam-se, certos compostos que inibiram a produção das micotoxinas, como, por exemplo, fluoretos, sulfito de potássio, ácido antranílico, ácido para-aminobenzóico e

sulfanilamida (5), aldeído cinâmico e eugenol (4), óleos cítricos (1), etanol a 2% e tiamina (3), por terem ação estimulante.

Sabe-se, que a degradação das aflatoxinas é levada a efeito pela adição de álcalis, por temperaturas acima de 268°C e por alguns microrganismos, como *Tetrahymena pyriformis*, *Macrophomina phaseoli*, *Aspergillus niger*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium roseum*.

Já foram estudados diversos aspectos preventivos, de ordem geral, ressaltando-se a importância da temperatura e do teor de umidade ambiental e da própria semente de plantas afetadas, além de métodos ideais de colheita e de armazenagem (7).

Este trabalho tem os seguintes objetivos: relatar a atividade de substâncias anti-fúngicas, isoladas do extrato de partes de plantas, sobre linhagens toxigênicas de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* tidas como principais produtoras de aflatoxinas, em nosso meio, e o efeito das mesmas, em doses sub-inibitórias, na produção de aflatoxina.

Material e Métodos

As plantas utilizadas foram fornecidas pela Seção de Plantas Tóxicas e Medicinais, Departamento de Botânica, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Sucos das folhas de *Agave sisalana* (sisal) e extratos aquosos dos frutos de *Bidens pilosa* (picão), sementes de *Annona squamosa* (pinha-do-norte), frutos de *Xylopia aromatica* (pimenta-de-macaco), casca de *Dimorphandra mollis* (barbatimão-de-folha-miúda) e casca de *Stryphnodendron barbadetiman* (barbatimão), foram testados sobre as cepas toxigênicas de *Aspergillus flavus* (ICB-137) e *A. parasiticus* (ICB-136), provenientes da micoteca da Seção de Micologia, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Obtenção dos extratos - Os extratos aquosos de *Dimorphandra mollis* (casca), *Stryphnodendron barbadetiman* (casca), *Bidens pilosa* (fruto) e *Xylopia aromatica* (fruto) foram obtidos a partir de 1g do pó seco, obtido por secagem, em estufa a 37°C, durante sete dias, e posterior moagem, da parte da planta em estudo, através da cocção em 80ml de água destilada fervente por aproximadamente duas horas, em banho-maria. Filtrou-se em papel de filtro, reservando-se o filtrado e repetindo-se a operação no resíduo, com cerca de 40ml de água destilada. Os filtrados foram combinados e concentrados, ao volume de 100ml, em banho-maria de água fervente, a fim de obter-se concentração final de 1g por cento.

O extrato de *Agave sisalana* foi obtido pela passagem de uma folha da planta por moenda comum, resultando em, aproximadamente, 700ml de suco natural que apresentou coloração verde escura, odor bastante ácido e pH igual a 3,5. Após 24 horas de repouso, em funil de decantação, separou-se o sedimento que foi desprezado, conservando-se o sobrenadante em geladeira a 4°C, a fim de evitar-se processo de fermentação.

Para obtenção do extrato de *Annona squamosa*, a semente foi subdividida em duas partes: o tegumento externo e o endosperma ruminado ou alubme. Secos e moidos, separadamente, como já descrito, os materiais foram extraídos em aparelho Soxhlet, utilizando-se clorofórmio como solvente, devido à grande quantidade de gordura presente nas partes

da semente, o que impediria a extração de princípios ativos pela água. Em seguida, obteve-se extrato aquoso do tegumento externo e do endosperma em concentrações finais de 1g por cento.

Com exceção do extrato obtido de *Annona squamosa*, os demais foram purificados com solução de acetato de chumbo neutro, na proporção de 1:4 (5ml de acetato de chumbo neutro para cada 20ml do extrato) por apresentarem pigmentos interferentes.

Os testes foram realizados com extratos brutos e purificados, isoladamente.

Seleção dos solventes - A seleção dos solventes, para a cromatografia dos extratos em camada delgada (CCD) foi realizada, numa primeira fase, através método de CCD em lâminas de vidro para microscopia, de 7,5 x 2,5cm cobertas com sílica-gel G, como método rápido e experimental, sem levar em conta a espessura do substrato.

A revelação das substâncias foi feita sob luz ultra-violeta de ondas longas ou atmosfera saturada de iodo. De acordo com a melhor resolução das manchas isoladas, foram selecionados, como solventes mais adequados: clorofórmio-metanol 95:5 (I); clorofórmio-dietilamina 9:1 (II); clorofórmio-acetato de etila-ácido fórmico 5:4:1 (III); éter de petróleo-acetona 3:1 (IV); metanol-água 8:2 (V); butanol-ácido acético - água (VI), ou seja, solução saturada de butanol e solução saturada de ácido acético, misturadas no momento do uso.

Isolamento das frações ativas - Os extratos foram depositados em placas de vidro de 20 x 20 cm, recobertas com sílica-gel G, com 500µm de espessura e desenvolvidos nos solventes selecionados (8). Após secagem, o cromatograma resultante foi pulverizado com suspensão de esporos do fungo, em solução contendo mistura de sais minerais e glicose, no momento do uso. O fungo colonizava a região, onde não havia substância ativa, após período de incubação de cinco dias, em temperatura de 25°C, em câmara úmida.

A região da substância ativa foi removida da placa de sílica-gel, procedendo-se à sua eluição com o solvente adequado e a suspensão resultante filtrada através de papel de filtro, repetindo-se, por três vezes o processo, tendo se obtido ao final, eluato composto pela mistura dos filtrados.

Para a eluição da substância, revelada no suco da folha de *A. sisalana*, utilizou-se metanol-água (8:2), havendo necessidade de se evaporar o álcool, em banho-maria a 65°C, para aplicação na placa cromatográfica, pois este solvente apresentou interferência no ensaio.

A determinação da dose sub-inibitória foi obtida com o uso de duas séries de diluições duplas de cada eluato (1ml) em caldo-Sabouraud (até 1:1024) e respectivos controles de crescimento de *A. flavus* e *A. parasiticus*.

Para avaliação da atividade fungicida ou fungistática, repicou-se o inóculo do tubo em que ocorreu a inibição, para tubo contendo ágar-Sabouraud com cloranfenicol (100µg/ml), incubando-se à temperatura ambiente (20-25°C) por cinco dias, para verificação de crescimento fúngico ou vice-versa.

Evidenciação da atividade do(s) princípio(s) ativo(s) sobre a produção de aflatoxina - Em frascos de Roux, contendo meio de extrato de levedura-sacarose (YES) (6) mais o princípio ativo em dose sub-inibi-

tória, as amostras de *A. flavus* e *A. parasiticus*, foram cultivadas a 25°C, durante 10 a 14 dias. O controle foi feito em meios de cultura semeados com os fungos citados.

Após o crescimento, filtrou-se o líquido de cultivo, através de algodão, com sulfato de sódio anidro.

O filtrado foi recolhido em funil de separação e, em seguida, extraídas três porções, com 25ml de clorofórmio. Os extratos clorofôrmicos, reunidos, foram concentrados em aquecedor elétrico, a volumes de 10 ou 20ml.

Análise qualitativa e quantitativa da aflatoxina B₁ - Aliquotas de 60µl, dos extratos a serem analisados, dos extratos controle e do padrão de aflatoxinas, cedido pelo Dr. Walter A. Pons Jr. do "Agricultural Research Service", de New Orleans, Louisiana, foram transferidas para placas de silica-gel.

Desenvolveu-se o cromatograma em câmara saturada com vapores de benzeno-acetato de etila-álcool etílico (60:38:2), por duas vezes consecutivas e, após secagem, desenvolveu-se com éter dietílico. A leitura foi procedida sob luz ultra-violeta de ondas longas.

Para análise quantitativa utilizou-se a mesma técnica descrita, diferindo apenas na aliquota inicial de 100µl.

Sob luz ultra-violeta, foram localizadas as manchas fluorescentes de Rf, próximas às do padrão e que correspondiam à aflatoxina B₁. Em seguida, removeu-se as áreas de silica correspondentes às manchas, eluindo-as em 2ml de metanol frio, por contacto, durante 30 minutos.

Após a filtração, lavou-se o resíduo com 2ml de metanol frio, recolhendo-se a solução metanólica filtrada para análise espectrofotométrica, em volume final igual a 4ml.

O cálculo da concentração de aflatoxina B₁, foi feito pela fórmula de Nabney & Nesbitt (9).

Resultados

A Tabela 1 contém os principais dados relativos ao isolamento de substâncias inibidoras do crescimento de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*.

Com exceção do extrato proveniente das sementes de *Annona squamosa*, os demais apresentaram substâncias inibidoras, no ponto de partida do cromatograma. Nesse particular, apenas alguns sistemas de solventes deixaram de revelar substâncias inibidoras nos extratos de *Xylopia aromatica* como, por exemplo, clorofórmio-dietilamina e éter de petróleo-acetona, para *A. flavus* e clorofórmio-metanol, para *A. parasiticus*.

Alguns extratos, além das substâncias inibidoras, evidenciadas no ponto de partida, revelaram manchas de inibição em Rf diversos. São exemplos os extratos purificados, provenientes de *S. barbadetiman* e de *D. mollis*, cujas manchas foram reveladas nos mesmos sistemas de solventes IV e VI (Tabela 1), tendo atuado apenas em *A. flavus*.

Tanto no extrato bruto, como no purificado da folha de *Agave sisalana*, foi isolada substância ativa, inibidora do crescimento das duas espécies fúngicas, quando se utilizou metanol-água, na base de 8:2, como sistema de solventes.

Tabela 1 - Atividade anti-fúngica dos extratos de partes de plantas, verificada através do método de Romans & Fuchs (8)

Extratos		Aspergillus flavus						Aspergillus parasiticus					
		Sistemas de solventes						Sistemas de solventes					
		I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI
<i>Annona squamosa</i>	Endosperma	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	Tejimento	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Bidens pilosa</i>	Bruto	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
	Purificado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Xilopia aromaticus</i>	Bruto	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
	Purificado	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Stryphnodendron barbadetiman</i>	Bruto	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
	Purificado	-	-	-	+	-	**	-	-	-	-	-	-
<i>Dimorphandra mollis</i>	Bruto	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
	Purificado	-	-	-	***	-	****	-	-	-	-	-	-
<i>Agave sisalana</i>	Bruto	-	-	-	-	§	-	-	-	-	-	§	-
	Purificado	-	-	-	-	§	-	-	-	-	-	§	-

* (0,16) ** (0,24) *** (0,14) **** (0,25) § (0,7) %f da mancha de inibição

- Inibição do crescimento do fungo no ponto de partida do cromatograma

+ Ausência de inibição fúngica.

Determinação das doses sub-inibidoras - Constatou-se, através da técnica de diluição em tubos, que os extratos de *X. aromaticus*, *B. pilosa*, *S. barbadetiman* e *D. mollis* não inibiram o crescimento dos fungos.

A dose sub-inibitória da substância isolada de *A. sisalana* foi definida na diluição 1:3 com a qual pesquisou-se interferência eventual na produção de aflatoxina B_1 .

Analise qualitativa e quantitativa da aflatoxina B_1 - A Tabela 2 revela que, para *Aspergillus parasiticus*, o princípio ativo na diluição de 1:3 inibiu totalmente a produção de aflatoxinas.

Tabela 2 - Efeito de substância ativa isolada de *Agave sisalana* na produção de aflatoxina por *A. flavus* e *A. parasiticus*

Aflatoxinas	RFs	Extratos (*)				
		1	2	3	4	5
B_1	0,65	++ (**)	+(**)	++ (**)	+(**)	- (**) -
B_2	0,59	+	ND	ND	ND	-
G_1	0,53	++	++	++	+	-
G_2	0,45	+	ND	++	ND	-

(*) Extrato: 1. Padrão de aflatoxinas; 2. Cultura de *A. flavus* (ICB-137); 3. Cultura de *A. parasiticus* (ICB-136); 4. Cultura de *A. flavus* tratada com substância ativa em diluição 1:3; 5. Cultura de *A. parasiticus* tratada com substância ativa em diluição 1:3

(**) Intensidade de fluorescência expressa por sinais "+", o sinal "-" indica ausência de fluorescência

ND - Não detectada.

Para *A. flavus*, apenas por comparação visual, sob luz ultra-violeta, não foi possível concluir se houve ou não inibição, uma vez que a intensidade de fluorescência das manchas foi semelhante às do controle.

O extrato controle de *A. flavus* revelou, à análise espectrofotométrica, na região ultra-violeta (360nm), concentração de 0,92 μ g/ml de aflatoxina B₁ e aquele que continha o princípio ativo, um teor de 0,71 μ g/4ml.

Portanto, o princípio ativo, na diluição de 1:3, proporcionou inibição de cerca de 23% na produção de aflatoxina B₁ por *Aspergillus flavus*.

Discussão

Diversos sistemas de solventes foram experimentados, de maneira isolada ou em combinações, variando-se as concentrações e respectivas polaridades. Através da cromatografia em camada delgada, realizada em lâminas de microscopia, foram experimentados mais de 20 sistemas de solventes. Tal procedimento foi, à primeira vista, o mais adequado, pois, com a revelação de manchas em diferentes Rf, selecionavam-se aqueles mais apropriados. Para essa triagem supõe-se que a técnica de Homans & Fuchs (8), adaptada às lâminas de microscopia recobertas por silíca-gel G, foi útil para a triagem e escolha de solventes, podendo-se economizar tempo de análise e material.

Com relação a *X. aromaticum*, em apenas três sistemas de solventes, o extrato deixou de atuar sobre os fungos. À primeira vista, pareceria que alguns solventes pudesse exercer atividade sobre a substância inibidora, como é o caso, por exemplo, da dietilamina, da acetona e do metanol. Pelo fato de não haver inibição de *A. flavus*, com o uso de sistemas de solventes II e IV, e de *A. parasiticus*, com o sistema I, parece haver outro fator de interferência, intrínseco aos fungos em estudo, pois talvez os solventes pudesse modificar a sensibilidade dos mesmos em relação à substância ativa.

O princípio, para obtenção do eluato da mancha revelada do extrato de *Agave sisalana*, utilizou-se os mesmos solventes (metanol-água 8:2) utilizados na CCD. Como os testes de diluição em tubos, tanto do eluato como da série controle, revelavam inibição do crescimento fúngico, até a diluição 1:8, tornou-se evidente que estava ocorrendo interferência do metanol. Na fase em que se utilizou a técnica de Homans & Fuchs (8), onde se obteve revelação da mancha inibidora, a interferência não ocorreu porque o solvente foi totalmente evaporado da cromatoplaca antes da aspersão fúngica.

Após diversas tentativas infrutíferas, utilizando-se concentrações menores de metanol bem como utilização apenas de água, optou-se pela diluição inicial com metanol-água 8:2, evaporando-se o álcool em banho-maria a 65°C. A partir desse eluato, obteve-se inibição total na diluição 1:2 e início de crescimento fúngico na diluição 1:4. Esse teste de tubos testemunhos, em paralelo, revelou crescimento fúngico em todos eles assegurando, portanto, a eliminação do fator de interferência.

Por ocasião dos testes de diluição seriada do suco, obtido da folha de sisal (extrato bruto), verificou-se inibição do crescimento fúngico até diluição 1:8.

Como tentativa para se conseguir maior rendimento, na recuperação da substância ativa, utilizou-se, para obtenção dos eluatos, solução tampão de fosfato-citrato, com pH próximo ao do suco (pH = 3,5). Po-rem, os resultados obtidos não revelaram qualquer inibição de crescimento fúngico, o que faz supor a incapacidade extrativa da referida solução.

Em todos os testes realizados com *Agave sisalana*, utilizou-se o extrato bruto que revelou maior dispersão da área de inibição, em relação a do extrato purificado, facilitando, assim, a obtenção do eluato.

A diferença de comportamento fúngico, em relação à síntese de aflatoxina B₁ tornou-se bem evidente sob a ação da substância isolada do suco de *A. sisalana*.

A dose sub-inibitória não permitiu a produção da micotoxina pela cepa de *Aspergillus parasiticus* (ICB-136). Como este fato não se reproduziu com *Aspergillus flavus* (ICB-137), pois houve produção de 77% de aflatoxina B₁ em relação ao testemunho, estudos posteriores deverão esclarecer o mecanismo de bloqueio total ou parcial ocorrido nas espécies citadas.

A metodologia de obtenção da substância ativa apresentou-se simples, de baixo custo, e de grande interesse industrial pois o suco da folha foi obtido por expressão em moenda comum. Ressalte-se o fato de que o referido material é comumente desprezado quando do processamento e obtenção das fibras do sisal.

Torna-se evidente que os resultados obtidos constituem a primeira etapa para se obter substância eficaz e economicamente utilizável na prevenção e controle da produção de aflatoxina B₁ em substratos alimentares. Impõe-se, portanto, novos estudos para sua caracterização química e ensaios toxicológicos em relação ao homem e animais, entre outros.

Agradecimentos

Os autores desejam expressar sua gratidão pelo apoio recebido do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq e aos professores, Dr. Sylvio Panizza e Dra. Astréa Gisbrecht pelo auxílio e sugestões recebidas.

Referências Bibliográficas

1. Alderman, G.G. & Marth, E.H. - Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* by citrus oils. *Lebensm. Unters. Forsch.*, 160:353-360, 1976.
2. Ashworth Jr., L.J.; Schroeder, H.W. & Langley, B.C. - Aflatoxins: environmental factors governing occurrence in Spanish peanut. *Science*, 148:1228-1299, 1965.
3. Basappa, S.C. - Effect of B-group vitamins and ethyl alcohol on aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. *Indian J. Exp. Biol.*, 5:262-263, 1967.
4. Bullerman, L.B.; Lieu, F.Y. & Seier, S.A. - Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils: cinnamic aldehyde and eugenol. *J. Food Sci.*, 42:1107-1109, 1977.

5. Davis, N.D. & Diener, U.L. - Inhibition of aflatoxin synthesis by p-aminobenzoic acid, potassium sulfite and potassium fluoride. *Appl. Microbiol.*, 15:1517-1518, 1967.
6. Davis, N.D.; Diener, U.L. & Filbridge, D.W. - Production of aflatoxin B₁ and G₁ by *Aspergillus flavus* in a semisynthetic medium. *Appl. Microbiol.*, 14:378-380, 1966.
7. Fonseca, H. - Contribuição ao estudo da ocorrência de aflatoxina em tortas, farelos e farinhas de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) do Estado de São Paulo. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1968. (Tese de doutoramento).
8. Homans, A.L. & Fuchs, A. - Direct bioautography on thinlayer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *J. Chromatog.*, 51:327-329, 1970.
9. Nabney, J. & Nesbitt, B.F. - A spectrophotometric method for determining the aflatoxins. *Analyst*, 90:155-160, 1965.
10. Teunissen, D.J. & Robertson, J.A. - Degradation of pure aflatoxins by *Tetrahymena pyriformis*. *Appl. Microbiol.*, 15:1099-1100, 1967.

RESISTÊNCIA A DROGAS EM ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS DE ALIMENTOS

Deise Pasetto Falcão

Betty Maria de Lima

Elizeth Marini

& Mário Tsunezi Shimizu

Disciplina de Microbiologia e Imunologia
Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP
Campus de Araraquara
Caixa Postal 331
14800 Araraquara SP, Brasil

Resumo

Determinação da resistência de 68 amostras de enterobactérias (*E. coli*, *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp., *Klebsiella* sp., e *Salmonella* sp. a 11 drogas: estreptomicina (E), canamicina (K), cefalotina (Ce), cloranfenicol (Cl), hetacilina (H), tetraciclina (T), neomicina (Ne), carbenicilina (Ca), gentamicina (G), ácido nalidíxico (AN) e sulfonamida (Su) pela técnica da diluição seriada em meio sólido, usando-se as concentrações de 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 e 1000 microgramas da droga por mililitro do meio básico. 100% das amostras de *E. coli* foram sensíveis à Cl, Ne, G e AN; a sensibilidade ou resistência foi variável com relação à E, K, Ce, H, T, Ca e Su. *Enterobacter* apresentou população de 100% das amostras sensíveis à E, K, Cl, T, Ca, G e AN; desenvolveu uma população sensível e outra resistente à Ce, H, Ca e Su. Todas as amostras de *Proteus* foram sensíveis a K e AN; foram sensíveis ou resistentes a todas as outras drogas testadas. A totalidade das amostras de *Citrobacter* foram sensíveis à K, Cl, T, Ne, Ca, G e Su e sensíveis ou resistentes à E, Ce, H e AN. As amostras de *Klebsiella* foram sensíveis à K, Ne, G e AN e resistentes à H; e foram sensíveis ou resistentes à E, Ce, Cl, T, Ca e Su. As amostras de *Salmonella* foram sensíveis às 11 drogas. Observou-se de modo geral, baixa porcentagem de resistência múltipla entre as amostras estudadas.

Summary

Resistance to drugs of Enterobacteriia isolated from food products

Strains of enterobacteriia (68 in all) isolated from raw meat products (*E. coli*, *Enterobacter* sp., *Proteus* sp., *Citrobacter* sp., *Klebsiella* sp., and *Salmonella* sp.) were tested in relation to 11 drugs as follows: streptomycin (E); kanamycin (K); cephalotine (Ce); chloranfenicol (Cl); hetacilin (H); tetracyclin (T); neomicine (Ne), carbenicilin (Ca); gentamycin (G); nalidixic acid (AN) and sulphonamide (Su). The plate dilution method was used with drugs diluted with a final concentration of 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 and 1000 μ g/ml of basic medium. *E. coli* showed only population sensitive to Cl, Ne, G and AN; the sensitivity was variable in relation to E, K, Ce, H, T, Ca and Su. Two different populations were characterized for *Enterobacter*: in relation to Ce, H, Ca and Su, one was sensitive and the other was resistant; one sensitive population was characterized to E, K, Cl, T, Ne, G and AN. Two different populations were characterized for *Proteus* in relation to E, Ce, Cl,

H, T, Ne, Ca, G, and Su; one was sensitive and one resistant; one sensitive population was characterized to K and AN. *Citrobacter* were sensitive to K, Cl, T, Ne, Ca, G and presented varying sensitivity in relation to E, Ce, H and AN. *Klebsiella* were sensitive to K, Ne, G, AN and resistant to H, showing population sensitive and resistant to E, Ce, Cl, T, Ca and Su. *Salmonella* were sensitive to all drugs. There proved to be a low percentage of multiple resistance among almost all the strains studied.

Introdução

O uso abusivo de antibióticos tem ocasionado sérios problemas, sobretudo no aumento da resistência de certos grupos de microrganismos, com reflexo profundo na terapêutica humana, principalmente no que diz respeito à bactérias gram negativas, devido à seleção de cepas apresentando resistência múltipla.

No Brasil, vários trabalhos revelam o isolamento de bactérias resistentes à vários antibióticos (2, 6, 12, 19). Em investigação realizada na cidade de Araraquara em 1976 (4), observou-se alta incidência de resistência múltipla entre bactérias gram negativas isoladas de fezes humanas diarreicas.

Sabe-se que uma das principais fontes de disseminação de entero-bactérias para o homem são os alimentos, tendo papel de destaque carnes e derivados (18). Em vários países, inclusive no Brasil, os antibióticos são empregados como aditivo em rações para promover o crescimento dos animais. Muitas vezes esses mesmos antibióticos são utilizados no tratamento de doenças humanas e animais. Smith & Smith & col. (9, 10, 11) mostram o aparecimento de bactérias resistentes, seguido à inclusão de antibióticos na ração. Por outro lado, o uso também indiscriminado de antibióticos na profilaxia e tratamento de doenças veterinárias, seleciona cepas de bactérias resistentes, portadoras de fator R e que ao serem ingeridas junto a alimentos carnosos, podem transferir seus fatores R às enterobactérias humanas (17).

Goyal & Hoadley (5), nos Estados Unidos, relatam alta incidência de amostras de vários sorotipos de *Salmonella* com resistência a uma ou várias drogas, isoladas de água de despejo de abatedouro de aves. Poláková & col. (7), na Checoslováquia, ao isolarem *E. coli* de produtos cárneos, leite e produtos de laticínio, verificaram que cerca de 67% delas eram resistentes a um ou mais antibióticos e que algumas possuíam fatores R, sendo capazes de transferir seus marcadores de resistência. Walton (16), estudando coliformes isolados de carcaças de bovinos e suíños na Inglaterra, verificou que cerca de 38,8% das amostras isoladas de bovinos e 79,7% das de suíños, apresentavam resistência a um ou mais antibióticos, sendo alta a porcentagem das quais cuja resistência era transferível, inclusive no que diz respeito ao cloranfenicol. Vance & Magalhães (14), em Pernambuco, mostram o isolamento de cepas de *E. coli* de ceco bovino, com resistência múltipla a drogas, sendo que algumas foram capazes de se auto transferirem. Vasconcelos (15), em São Paulo, ao pesquisar *E. coli* enterotoxigênica em alimentos processados de origem animal, isolou cepas apresentando resistência múltipla à tetraciclina e eritromicina. Scaletsky (8), estudando estas mesmas amostras, observou que, em algumas, a resistência era transferível.

O objetivo do presente trabalho é verificar o comportamento frente a diferentes drogas e os padrões de resistência de amostras de enterobactérias isoladas de alimentos cárneos em Araraquara, S.P. e tentar correlacioná-las aos observados com outros germes gram negativos, isolados anteriormente de fezes humanas diarréicas (4) a fim de avaliar o potencial desses microrganismos, no que diz respeito ao carentamento de resistência múltipla a drogas e sua implicação em patogênio humana, e, deste modo, trazer uma contribuição num campo onde as informações sobre resistência a drogas, em bactérias gram negativas, isoladas de alimentos, não são comuns.

Material e Métodos

1. *Amostras* - Foram estudadas 68 amostras de enterobactérias, isoladas a partir de produtos cárneos crus (linguiças), comercializados na cidade de Araraquara, S.P. Após caracterização bioquímica e soro-lógica, as amostras foram assim classificadas: *E. coli* (17 amostras); *Enterobacter* sp. (20 amostras); *Proteus* sp. (17 amostras); *Citrobacter* sp. (6 amostras); *Klebsiella* sp. (4 amostras); *Salmonella agona* (2 amostras) e *Salmonella anatum* (2 amostras).

2. *Determinação da Resistência a drogas* - O método foi o da diluição em placas, tendo sido testadas 11 drogas: estreptomicina (E), canamicina (K), cefalotina (Ce), cloranfenicol (Cl), hetacilina (H), tetraciclina (T), neomicina (Ne), carbenicilina (Ca), gentamicina (G) ácido nalidíxico (AN) e sulfonamida (Su).

As drogas foram diluídas de modo que a concentração final fosse de 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 e 1000 microgramas por mililitro de meio básico. Todas as drogas foram diluídas no momento de serem incorporadas ao meio de cultura. Empregou-se, como meio básico, o Agar Mueller-Hinton (Difco), o qual, depois de esterilizado era resfriado a mais ou menos 40°C, quando era incorporada a droga. As placas, depois de solidificadas, permaneciam na estufa por uma noite, para secagem e prova de esterilidade. As amostras eram semeadas em caldo nutritivo (Difco). Após incubação, por 24 horas a 37°C, eram diluídas a 1:1000 no mesmo meio e semeadas. Foram realizados controles de viabilidade, semeando-se as amostras em Agar Mueller-Hinton sem antibiótico e controles, empregando-se amostras padrão, sensíveis e resistentes a cada uma das drogas testadas. Após semeadura, as placas eram incubadas a 37°C por 24 horas. Considerou-se como concentração inibitória aquela que impedia o crescimento do germe. O critério para classificar a amostra, como resistente ou sensível, foi o utilizado por Trabulsi & col. (12) que, estudando a distribuição dos níveis de resistência de amostras de *Shigella* a diferentes drogas, dividiram-nas em população sensível e população resistente. Utilizando-se esse critério, foram consideradas resistentes as amostras que cresceram em 100ug/ml de sulfa, em 10ug/ml de estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol, canamicina, gentamicina, ampicilina, ácido nalidíxico e hetacilina; em 20ug/ml de cefalotina e carbenicilina.

Resultados e Discussão

Os números e as porcentagens das amostras sensíveis e resistentes da população gram negativa total, podem ser observados na Tabela 1.

As Tabelas 2 a 7 mostram os números e percentagens das amostras sensíveis e resistentes, dentro de cada população.

Tabela 1 - População sensível e resistente entre as 68 amostras de Enterobactérias

Droga	População			
	Sensível	Resistente	nº	%
Estreptomicina	15	88,24	2	11,76
Canamicina	16	94,11	1	5,88
Cefalotina	16	94,11	1	5,88
Cloranfenicol	17	100,00	-	-
Metacilina	16	94,11	1	5,88
Tetraciclina	12	70,59	5	29,41
Neomicina	17	100,00	-	-
Carbenicilina	16	94,11	1	5,88
Gentamicina	17	100,00	-	-
Ácido nalidíxico	17	100,00	-	-
Sulfonamida	16	94,11	1	5,88

Tabela 2 - População sensível e resistente entre as 17 amostras de *E. coli*

Droga	População			
	Sensível	Resistente	nº	%
Estreptomicina	63	92,64	5	7,34
Canamicina	67	98,52	1	1,47
Cefalotina	34	50,0	34	50,0
Cloranfenicol	65	95,58	3	4,41
Metacilina	32	47,05	36	52,94
Tetraciclina	54	79,41	14	20,58
Neomicina	64	94,08	4	5,88
Carbenicilina	54	79,41	14	20,58
Gentamicina	62	91,17	6	8,80
Ácido nalidíxico	66	97,05	2	2,94
Sulfonamida	51	75,00	17	25,0

As amostras dos dois sorotipos de *Salmonella* apresentaram o mesmo padrão de sensibilidade, portanto os resultados foram computados em conjunto.

Tabela 3 - População sensível e resistente entre as 20 amostras de *Enterobacter*

Droga	População			
	Sensível	Resistente	nº	%
Estreptomicina	20	100,0	-	-
Canamicina	20	100,0	-	-
Cefalotina	6	30,0	14	70,0
Cloranfenicol	20	100,0	-	-
Metacilina	4	20,0	16	80,0
Tetraciclina	20	100,0	-	-
Neomicina	20	100,0	-	-
Carbenicilina	13	65,0	7	35,0
Gentamicina	20	100,0	-	-
Ácido nalidíxico	20	100,0	-	-
Sulfonamida	19	95,0	1	5,0

Tabela 4 - População sensível e resistente entre as 17 amostras de *Proteus*

Droga	População			
	Sensível	Resistente	nº	%
Estreptomicina	4	100,0	-	-
Canamicina	4	100,0	-	-
Cefalotina	4	100,0	-	-
Cloranfenicol	4	100,0	-	-
Metacilina	4	100,0	-	-
Tetraciclina	4	100,0	-	-
Neomicina	4	100,0	-	-
Carbenicilina	4	100,0	-	-
Gentamicina	4	100,0	-	-
Ácido nalidíxico	4	100,0	-	-
Sulfonamida	4	100,0	-	-

Os diferentes modelos de resistência, apresentados pelas amostras de *E. coli*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, são apresentados nas Tabelas 8 a 12.

Os dados existentes em relação ao comportamento de bactérias gram negativas, isoladas de alimentos, frente à drogas, não são abundantes. Burzynska & Stec (1), na Polônia, determinaram a sensibilidade à penicilina, ampicilina, estreptomicina, cloranfenicol, oxitetraciclina, eritromicina, neomicina, gentamicina e nitrofurantoína, de 381 bactérias, sendo 225 enterobactérias diversas (*E. coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella* e *Serratia*) e as demais (*P. aeruginosa*, *S. aureus* e *Bacillus cereus*), isoladas de diferentes alimentos (derivados do leite, produtos cárneos, vegetais, ovos, macarrão, peixe, cereais e gelo). Os autores verificaram que os antibióticos, com maiores proporcões de amostras sensíveis, foram penicilina (76,0%), eritromicina (65,6%), ampicilina (38,8%) e oxitetraciclina (12%) e pouca ou nenhuma sensibilidade em relação às outras drogas.

Tabela 5 - População sensível e resistente entre as 6 amostras de *Citrobacter*

Droga	População			
	Sensível nº	Sensível %	Resistente nº	Resistente %
estreptomicina	5	83,33	1	16,66
Canamicina	6	100,0	-	-
Cefalotina	4	66,66	2	33,33
cloranfenicol	6	100,0	-	-
Hetacilina	5	83,33	-	16,66
Tetraciclina	6	100,0	-	-
Neomicina	6	100,0	-	-
Carbenicilina	6	100,0	-	-
Gentamicina	6	100,0	-	-
Ácido nalidixico	4	66,66	2	33,33
Sulfonamida	6	100,0	-	-

Tabela 6 - População sensível e resistente entre as 4 amostras de *Klebsiella*

Droga	População			
	Sensível nº	Sensível %	Resistente nº	Resistente %
estreptomicina	3	75,0	1	25,0
Canamicina	4	100,0	-	-
Cefalotina	3	75,0	1	25,0
cloranfenicol	3	75,0	1	25,0
Hetacilina	-	-	4	100,0
Tetraciclina	3	75,0	1	25,0
Neomicina	4	100,0	-	-
Carbenicilina	1	25,0	3	75,0
Gentamicina	4	100,0	-	-
Ácido nalidixico	4	100,0	-	-
Sulfonamida	3	75,0	1	25,0

Entretanto, esses dados referem-se a bactérias gram negativas e gram positivas em conjunto, sendo portanto difícil discuti-los comparativamente aos observados na presente pesquisa, quando trabalhou-se apenas com enterobactérias.

Comparando-se os dados do presente trabalho com os da pesquisa anteriormente realizada (4), quando foi testado o mesmo grupo de microrganismos, isolados na mesma região, mas de origem diversa, observam-se porcentagens de resistência bem maiores a uma ou várias drogas quando trabalhou-se com gram negativos de origem humana. Com gram negativos, isolados de alimentos, a resistência múltipla foi bem menos expressiva.

Analisando-se os resultados globais de sensibilidade ou resistên-

cia às 11 drogas (Tabela 1), observa-se que nenhuma amostra foi resistente a todas as drogas, mas várias foram sensíveis a todas. As mais baixas porcentagens de resistência foram verificadas com a canamicina (1,4%) seguida da resistência ao ácido nalidíxico (2,94%). Chama-se a atenção para a resistência de 8,8% das amostras à gentamicina, que consideramos elevada, tendo em vista a sensibilidade que as gram negativas normalmente apresentam a essa droga.

A Tabela 2 mostra que todas as amostras de *E. coli* foram sensíveis ao cloranfenicol, neomicina, gentamicina e carbenicilina, enquanto que entre as isoladas de fezes humanas (4), houve 100% de sensibilidade somente frente à gentamicina. Cabe aqui uma ressalva, qual seja, as amostras de *E. coli* isoladas de fezes diarréicas pertenciam aos sorotipos enteropatogênicos (GEI), enquanto que as isoladas de alimentos não foram sorotipadas. Assinala-se também a diferença significativa no que diz respeito ao comportamento dos dois grupos de *E. coli* frente à sulfonamida: as isoladas de alimentos foram acima

Tabela 7 - População sensível e resistente entre as 4 amostras de *Salmonella*

Droga	População			
	Sensível		Resistente	
	nº	%	nº	%
Estreptomicina	16	94,17	1	5,88
Canamicina	17	100,0	-	-
Cefalotina	1	5,88	16	94,17
Cloranfenicol	15	88,29	2	11,70
Metacilina	3	17,64	14	82,35
Tetraciclina	9	52,94	8	47,05
Neomicina	13	76,47	4	23,52
Carbenicilina	14	82,35	3	17,64
Gentamicina	11	64,70	6	35,29
Ácido nalidíxico	17	100,0	-	-
Sulfonamida	2	11,76	15	88,23

Tabela 8 - Modelos de resistência das amostras de *E. coli*

Modelo	Número	%
ET	1	5,88
ESu	1	5,88
HCa	1	5,88
T	4	23,5
K	1	5,88
CE	1	5,88
sensibilidade à todas as drogas	8	47,0

de 90% sensíveis à droga e as isoladas de fezes foram 90% resistentes.

Os dados do presente trabalho estão mais de acordo aos de Vasconcelos (15), que também trabalhou com amostras de *E. coli* isoladas de alimentos, quando obteve 100% de sensibilidade frente à polimixina, cloranfenicol, canamicina, ampicilina, ácido nalidíxico, cefalotina, gentamicina, nitrofurantoína e sulfonamida; obteve sensibilidade variável frente à estreptomicina e tetraciclina.

As amostras de *E. coli*, isoladas de alimentos, apresentaram seis modelos diferentes de resistência, sendo que a resistência a dois antibióticos foi de 17,64% (Tabela 8). A tetraciclina foi o antibiótico com maior porcentagem de resistentes (23,5%). Dados semelhantes

Tabela 9 - Modelos de resistência das amostras de *Enterobacter*

Modelo	Número	%
CeHSu	1	5,0
CeHCa	3	15,0
HCa	2	10,0
CeH	8	40,0
Ca	2	10,0
Ce	2	10,0
H	2	10,0
Sensibilidade a todas as drogas	0	-

Tabela 10 - Modelos de resistência das amostras de *Proteus*

Modelo	Número	%
CeHTNeCaGSu	1	5,88
CeHNeCaGSu	1	5,88
CeHTNeGSu	1	5,88
CeHNeGSu	1	5,88
CeHTGSu	1	5,88
CeClHTGSu	1	5,88
ECecITSu	1	5,88
CeHTSu	1	5,88
CeHGSu	1	5,88
CeTSu	2	11,76
CeHSu	4	23,52
CeH	1	5,88
HCa	1	5,88
Sensibilidade a todas as drogas	0	-

foram obtidos por Poláková & col. (7), na Checoslovaquia, em relação a maiores porcentagens de resistência à tetraciclina de amostras de *E. coli* isoladas de produtos cárneos. A Tabela 8 mostra que 47% das amostras de *E. coli* foram sensíveis a todas as drogas.

Procurou-se verificar se as marcas de resistência à tetraciclina e estreptomicina, nas amostras de *E. coli*, poderiam ser transferidas por conjugação. Para tal empregou-se, como receptora, amostra de *E. coli* K12, ácido nalidíxico resistente, com a técnica habitualmente utilizada nos processos de conjugação de *E. coli* (8). Não se conseguiu transferir as marcas de resistência. Novos experimentos serão realizados e os resultados oportunamente relatados.

As amostras de *Enterobacter* foram totalmente sensíveis à estreptomicina, canamicina, cloranfenicol, tetraciclina, neomicina, gentamicina e ácido nalidíxico. Chama-se a atenção para a elevada porcentagem de resistência à hetacilina (80,0%) e cefalotina (70,0%) (Tabela 3). A Tabela 9 mostra que 70,0% das amostras de *Enterobacter* foram resistentes a 2 ou mais drogas e que o modelo mais comum foi CeH; nenhuma amostra foi sensível a todas as drogas.

Analizando a Tabela 4, observa-se que todas as amostras de *Proteus* apresentaram sensibilidade à canamicina e ácido nalidíxico e altas porcentagens de resistência à cefalotina, tetraciclina e sulfonamida. Esse gênero foi o que apresentou amostras com mais altas porcentagens de resistência múltipla: 52,9% das cepas foram simultaneamente resistentes a quatro ou mais drogas e 100% a duas ou mais drogas e o modelo de resistência mais comum foi: CeHSu (Tabela 10). Ainda em relação a *Proteus*, verifica-se porcentagem relativamente elevada de resistência à gentamicina (35,2%) e que nenhuma amostra foi simultaneamente sensível a todas as drogas.

Tabela_11 - Modelos de resistência das amostras de *Citrobacter*

Modelo	Número	%
ECON	1	16,66
AN	2	33,33
Ce	1	16,66
Sensibilidade à todas as drogas	2	33,33

Tabela_12 - Modelos de resistência das amostras de *Klebsiella*

Modelo	Número	%
ECLNTCaSu	1	25,0
uCa	2	50,0
CeR	1	25,0
Sensibilidade à todas as drogas	0	-

As amostras de *Citrobacter* foram bastante sensíveis às drogas testadas, conforme mostra a Tabela 5. Esse grupo de microrganismos apresentou resistência relativamente elevada ao ácido nalidíxico (33,3%); 66,6% das amostras de *Citrobacter* foram resistentes a uma ou duas drogas (Tabela 11).

Todas as amostras de *Klebsiella* foram sensíveis à canamicina, neomicina, gentamicina e ácido nalidíxico e resistentes à hetacilina. Entre os gêneros bacterianos estudados, foi o único que apresentou 100% de resistência a uma droga (Tabela 6), tendo apresentado 4 modelos de resistência (Tabela 12).

Os resultados apresentados pelas amostras de *Salmonella* foram os que mais surpreenderam: as quatro amostras testadas foram sensíveis a todas as drogas (Tabela 7). Entretanto, em trabalho anteriormente realizado (4) foram incluídas, entre as amostras isoladas de fezes diarréicas, cinco amostras de *Salmonella* isoladas de viscera e fezes de animais que também foram altamente sensíveis às drogas, sendo resistentes somente à sulfonamida, enquanto as isoladas de fezes apresentaram resistência múltipla (4). Esses resultados aproximam-se bastante dos observados na presente pesquisa. Duck & col. (3), ao determinarem a sensibilidade a antibióticos, de 2609 amostras de *Salmonella* de origem humana e não humana, verificaram que a resistência é limitada a pequeno número de sorotipos e que nenhuma das amostras isoladas de ração animal apresentava resistência múltipla mas, aquelas isoladas de aves mostravam esse tipo de resistência.

Levando-se em conta os baixos níveis de resistência apresentados de modo geral pelas 68 amostras de enterobactérias estudadas, conclui-se que essas amostras de alimentos, particularmente *Salmonella*, não são potencialmente difusoras de fatores de resistência para as enterobactérias habitantes do trato intestinal do homem.

Referências Bibliográficas

- Burzynska, H. & Stec, E. - Preliminary investigations on antibiotic-

- tic-sensitivity of bactérias isolated from food products. Roczn. Pantn. Zalk. Hig., 31:167-192, 1980.
2. Câmara, F.P. & Cardoso, M.A. - Epidemiologia da resistência plasmidial a drogas em Salmonelas isoladas de esgotos da cidade do Rio de Janeiro. Rev. Microbiol., 12:14-16, 1981.
 3. Duck, D.P.; Dellon, J.R.; Lia, H. & Eidus, L. - Antibiotic resistance among predominant *Salmonella* serovars and phagovars in Canada. Can. J. Microbiol., 24:1358-1365, 1978.
 4. Falcão, D.P.; Shimizu, M.T.; De Angeli, M.H.B.; Landgraf, M.; Lopes, M.E.A. & Pimenta, S.A. - Estudo da resistência "in vitro" a drogas em bactéria gram negativas. Rev. Bras. Anal. Clin., 8:1-18, 1976.
 5. Goyal, S.M. & Hoadley, A.W. - *Salmonellae* and their associated R-plasmids in poultry processing wastes. Rev. Microbiol., 10:50-58, 1979.
 6. Montelli, A.C. - Diarréias por enterobactérias: estudo bacteriológico, clínico epidemiológico. Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, 1972. (Tese).
 7. Poláková, O.; Janousková, J.; Hustanová, H.; Stankousky, I. & Kromery, V. - Occurrence of *Escherichia coli* with strains multi-resistance and transferable resistance to antibiotics in foodstuffs. J. Hygiene Epidemiol. Microbiol. Immunol., 16:467-472, 1972.
 8. Scaletsky, I.C.A. - Estudo da natureza plasmidal de algumas características apresentadas por amostras de *Escherichia coli* enterotoxigenica. São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1981. (Tese).
 9. Smith, H.W. - Antimicrobial drugs in animal feeds. Nature (London), 218:728-731, 1968.
 10. Smith, H.W. - The effect of continuous administration of diets containing tetracyclines and penicillin on the number of drug-resistant and drug-sensitive *Clostridium welchii* on the faeces of pigs and chickens. J. Pathol. Bacteriol., 77:79-93, 1959.
 11. Smith, H.W. & Crabb, W.E. - The effect of the continuous administration of diets containing low levels of tetracyclines on the incidence of drug-resistant *Bacterium coli* in the faeces of pigs and chickens: the sensitivity of *B. coli* to other therapeutic agents. Vet. Rec., 69:24, 1957.
 12. Trabulsi, L.R. & Zuliani, M.E. - Estudos sobre *E. coli* 0111: B4-Sensibilidade "in vitro" à sulfadiazina e seis antibióticos. Rev. Inst. Med. Trop., 11:323-324, 1969.
 13. 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., 2:71-77, 1970.
 14. Vance, M.H. & Magalhães, M. - Distribuição de fatores de resistências entre cultura de *E. coli* isoladas de ceco de bovino. Rev. Microbiol., 6:14-15, 1975.
 15. Vasconcelos, J.C. - Colibacilos enterotogênicos em alimentos semiprocessados de origem animal. São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1979. (Tese).

16. Walton, J.R. - Contamination of meat carcasses by antibiotic resistance coliform bacteria. Lancet, 2:561-563, 1970.
17. WHO. Technical Report Series nº 598. - Microbiological aspects of food Hygiene. 1976.
18. WHO. Technical Report Series nº 624. - Surveillance for the prevention and control of health hazards due to antibiotic resistant enterobacteria. 1978.
19. Zuliani, M.E. & Trabulsi, L.R. - Sensibilidade "in vitro" à sulfadiazina e à 5 antibióticos de 166 amostras de *Shigella* isoladas em São Paulo. Rev. Inst. Med. Trop., 10:70-77, 1968.

CARACTERÍSTICA DE CRESCIMENTO DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS S50 PIGMENTADO E SUAS VARIANTES NÃO PIGMENTADAS

Sonia P. Salzberg
& Fumio Yokoya

Laboratório de Microbiologia
Deptº de Ciência dos Alimentos
FEAA - UNICAMP
13100 Campinas SP, Brasil

Resumo

A influência da presença de pigmentos nas temperaturas máxima e ótima de crescimento foi estudada, utilizando-se uma linhagem pigmentada de *Staphylococcus aureus* e suas variantes não pigmentadas. Alguns meios foram formulados, para a observação de pigmento. A maior intensidade de pigmentação e o contraste, entre os diferentes graus de pigmentação, foram obtidos no meio contendo infusão de cérebro e coração (BHI) agar, adicionado de 10% de leite integral e 3% de cloreto de sódio. A linhagem pigmentada S50 e variantes não pigmentadas foram selecionadas nesse meio. As variantes não pigmentadas de S50 foram obtidas através de variação espontânea e pela ação da nitrosoguanidina. A cinética de crescimento da linhagem S50 e de seis variantes não pigmentadas foi estudada em caldo BHI, no intervalo de temperaturas 24-55°C e um incubador de gradiente de temperatura. Os seis derivados não pigmentados apresentaram valores de temperaturas máxima e ótima de 8 a 10°C inferiores aos valores correspondentes na linhagem original. Os valores máximos das constantes específicas de crescimento (k_m) foram muito próximas para a linhagem S50 e as variantes coagulase positivas, compreendidos entre $18,9 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ e $17,0 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$. No entanto, para as variantes coagulase negativo, houve uma redução entre 25 e 50% nos valores de k_m , que ficaram compreendidos entre $11,1 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ e $8,2 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$. O fagotipo mostra um fago a mais, o nº 77, nas três variantes coagulase e nuclease positivas.

Summary

Growth characteristics of the pigmented strain Staphylococcus aureus S50 and its non pigmented derivatives

The influence of pigmentation on the maximal and optimal growth temperatures was studied using a pigmented *Staphylococcus aureus* strain and its non pigmented derivatives. Several media were formulated for the observation of pigment in the strain *Staphylococcus* S50. The highest pigmentation intensity and maximal differentiation among the several pigmentation shades was obtained in a medium containing Brain Heart Infusion (BHI) agar plus 10% whole milk and 3% sodium chloride. Strain S50 and non pigmented derivatives were selected in this medium. The non pigmented derivatives were obtained by spontaneous mutation and by the mutagenic agent nitrosoguanidine. The kinetics of growth of strain S50 and six non pigmented derivatives was studied in BHI broth in the temperature range 25 to 55°C, with a gradient temperature incubator. The

maximal and optimal growth temperatures in BHI broth for the non pigmented derivatives were 8 to 10% lower than the corresponding values for the parent strain. The values for the specific growth constants at the optimal temperatures, k_m , were similar for the parent strain and its coagulase positive derivatives, between $18,9 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ and $17,0 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ while the coagulase negative derivatives showed a reduction in the k_m values from 25 to 50% that were in the range $8,2 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ to $11,1 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$. The phagetype shows the extra phage, nº 77 in all the three coagulase and nuclease positive variants.

Introdução

Algumas propriedades apresentadas pelos estafilococos são associadas à presença de pigmento, entre estas a resistência ao efeito foto-oxidativo da luz visível (4) e a resistência à secagem e ao ácido linolénico (3). Embora haja estafilococos patogênicos não pigmentados, a maior parte dos estafilococos patogênicos de origem humana e bovina é pigmentada (1). Apresentando-se o pigmento como um fator de proteção para o microrganismo (3, 4), é de interesse verificar se existe relação entre a presença de pigmento e as temperaturas de crescimento, especificamente no que diz respeito às temperaturas ótima e máxima.

Com o intuito de verificar esta relação, independentemente de possíveis variações inerentes à espécie, utilizou-se uma linhagem pigmentada e suas variantes não pigmentadas, obtidas espontaneamente ou por indução com o agente mutagênico nitrosoguanidina.

A fim de facilitar a observação da presença ou ausência de pigmento para a seleção de variantes não pigmentadas, foi formulado um meio de cultura sólido, contendo como ingredientes, infusão de cérebro e coração, cloreto de sódio e leite integral.

A determinação da cinética de crescimento e das temperaturas máxima e ótima foi realizada em meio de caldo de infusão de cérebro e coração, utilizando-se incubador de gradiente de temperaturas, com as linhagens S50 e seis derivadas não pigmentadas, das quais três perderam, junto com o pigmento, a capacidade de produzir coagulase e termonuclease.

Material e Métodos

A linhagem original, *Staphylococcus* S50, foi isolada de leite em pó, no Laboratório de Microbiologia da FEAA/UNICAMP e armazenada durante dois anos a 4°C em agar inclinado de infusão de cérebro e coração (BHI), procedendo-se a sub-culturas a cada três meses.

Seleção de um meio para produção de pigmento - Vários meios foram formulados para produção de um pigmento tendo como base o meio de infusão de cérebro e coração (BHI): BHI agar + 5% NaCl; BHI agar + 10% leite integral; BHI agar + 3% NaCl; BHI agar + 3% NaCl + 10% leite integral. Como fonte de leite utilizou-se leite em lata integral. O leite foi adicionado ao resto do meio, imediatamente antes da preparação das placas.

Obtenção de variantes não pigmentadas a partir de S50 - Variantes espontâneas foram obtidas por diluição e semeadura em placas de uma

cultura em caldo BHI da linhagem S50 nos vários meios formulados para produção de pigmento. Foram selecionadas apenas variantes não pigmentadas.

Variantes induzidas foram obtidas pela ação da N-metil-N'nitro-N-nitroso guanidina (nitrosoguanidina), de acordo com a técnica de Altenbernd (2), modificada da seguinte forma: uma cultura densa, de 24 horas, em meio BHI agar inclinado, foi diluída em 50ml de caldo BHI. Aliquotas de 1/ml foram expostas a 3ml de solução de 4mg/ml de nitrosoguanidina em tampão de citrato 0,05N; pH 5,0. Os tempos de exposição corresponderam a 10, 20, 40, 60, 80 e 100 minutos. Imediatamente, após cada tempo de exposição, as culturas foram centrifugadas, lavadas duas vezes com solução salina e, posteriormente, resuspensoas nesta solução, diluídas e semeadas em placas contendo meio apropriado para produção de pigmento.

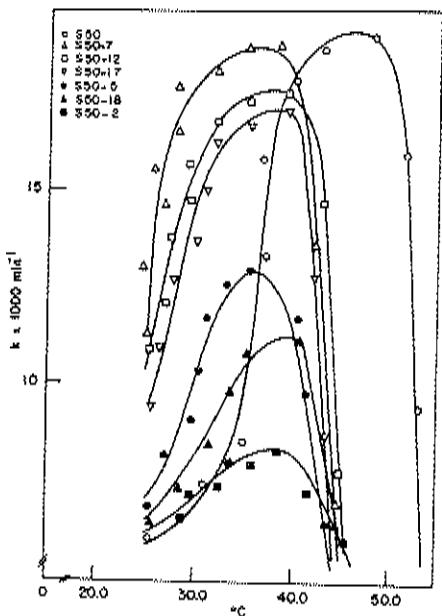
Reações de coagulase e termonuclease - As reações de coagulase e termonuclease foram realizadas após 18 horas de incubação das culturas em caldo BHI. A coagulase foi determinada pela reação em tubo adicionando 0,5ml de plasma reconstituído de coelho (Difco) a 0,5ml da cultura e os resultados analisados de acordo com o critério de Turnes & Schwartz (7), após 4 e 24 horas de incubação. Para determinação de termonuclease, foi seguido o procedimento recomendado por Lachica & col. (5); 1ml de cultura foi aquecido a 100°C, durante 15 minutos e uma gota colocada no orifício do meio de agar. As lâminas foram incubadas a 37°C e examinadas após 4 e 24 horas, sendo as leituras registradas em milímetros de raio do halo produzido.

Cinética de crescimento - Para o estudo da cinética de crescimento, foi utilizado um incubador de gradiente de temperatura (Scientific Industries Inc., N.Y.). Os tubos inseridos no bloco metálico foram acondicionados de 10ml de caldo BHI. Uma vez selecionadas as temperaturas dos extremos, 25 e 55°C, os tubos contendo meio de cultura foram colocados em diferentes posições ao longo do bloco metálico e mantidos por um período de tempo suficiente (geralmente 2 horas), até estabilização do gradiente. Após este período, os tubos foram inoculados com 0,05ml de inóculo padronizado correspondente a 5×10^6 microrganismos, provenientes de uma cultura estática de 18 horas em BHI, adicionados com pipeta sorológica calibrada. A variação de temperatura, entre dois tubos contíguos, foi de 0,4 a 1,5°C, dependendo da posição dos tubos no incubador, sendo a diferença menor para os tubos centrais e a maior para os tubos dos extremos. A incubação foi realizada sob agitação angular recíproca de 300°, com velocidade de 30 ciclos por minuto. O crescimento dos microrganismos foi determinado pelo método turbidimétrico, através de espectrofotômetro (Bausch & Lomb, Spectronic 20), especialmente adaptado para operar com tubos de 2,0cm de diâmetro. A leitura foi efetuada no comprimento de onda de 600nm, em intervalos regulares de tempo, geralmente 15 minutos.

As constantes específicas de crescimento, k, calculadas a partir das curvas de crescimento, foram utilizadas na construção das curvas de crescimento a diferentes temperaturas (Figura 1).

Tanto a linhagem original S50, como as derivadas não pigmentadas coagulase positivas foram tipificadas por bacteriófagos, no Laboratório de Carlos Solé-Vernin, na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

Figura 1 - Curvas de crescimento da linhagem *Staphylococcus aureus* S50 e linhagens derivadas



Resultados

A linhagem *Staphylococcus aureus* S50 pigmentada apresentou as reações típicas da espécie: produção de catalase, fermentação de glicose em anaerobiose, produção de coagulase e termonuclease.

O meio selecionado para a observação de produção do pigmento foi BHI agar + 10% de leite + 3% de NaCl, onde se obteve a maior intensidade de pigmentação, após dois dias de incubação a 4°C de colônicas previamente desenvolvidas a 37°C.

As variantes não pigmentadas induzidas foram selecionadas dentro do intervalo de tempo de exposição ao agente mutagênico, entre 10 a 20 minutos que correspondem a uma taxa de sobrevivência entre 1 e 0,1%.

Quatro variantes espontâneas foram selecionadas: S50-7 e S50-12, que conservaram a capacidade de produzir coagulase e termonuclease e S50-2 e S50-5, que perderam essa capacidade.

Entre as variantes induzidas com nitrosoguanidina, foram utilizadas duas: uma, que conservou a capacidade de produzir ambas exoenzimas S50-17 e outra, que perdeu ambas propriedades, S50-18 (Tabela 1).

Através da cinética de crescimento da linhagem S50 e suas variantes, observa-se que todas as variantes não pigmentadas apresentaram temperaturas máxima (T_m) e ótima (T_o) muito próximas, sendo os

Tabela 1 - Reações de coagulase e termonuclease, fagotipo, temperaturas máximas e ótima e constantes específicas de crescimento da linhagem pigmentada S50 e suas variantes não pigmentadas

Microrganismo	Coagulase 4h 24h	Nuclease ^a 4h 24h	Tmáxima ^b	Toptima ^c	k ^d na tempera- tura ótima km x 10 ³	Fagotipo
S50	+4	2,5 5,0	53,1±1,0	48,2±0,6	18,9±0,3	53/54/84/85/95
S50-7 (E) ^e	+4	2,0 4,5	45,5±0,6	38,3±0,3	18,6±0,4	53/54/77/84/85/95
S50-12 (E) ^e	+4	2,0 5,0	45,8±0,7	39,2±0,6	17,5±0,6	47/53/54/77/84/85/95
S50-17 (NTG) ^f	+4	2,0 4,5	45,3±0,5	39,6±0,5	17,0±0,7	47/53/54/77/84/85/95
S50-2 (E) ^e	-	-	46,0±0,8	39,6±0,8	8,2±0,2	
S50-5 (E) ^e	-	-	44,0±0,6	35,4±0,2	13,0±0,3	
S50-18 (NTG) ^f	-	-	44,8±0,7	40,7±0,9	11,1±0,5	

^a - resultados são a média de três determinações

^b - variantes obtidas espontaneamente

^c - variantes obtidas pela ação de nitrosoquinidina

^d - diâmetro da zona de hidrólise do DNA expressado em mm.

valores de Tm em torno de 44,0 - 45,8°C e os valores de To em torno de 35,4 - 40,7°C (Tabela 1 e Figura 1). Estes valores se afastam, em aproximadamente 8°C, dos respectivos valores de Tm, 53,1°C e To, 48,2°C da linhagem S50 pigmentada (Tabela 1 e Figura 1). Em relação aos valores das constantes de crescimento nas temperaturas ótimas, km, observa-se que os microrganismos coagulase e termonuclease positivos apresentaram valores de km compreendidos entre 18,9 x 10⁻³ min⁻¹ e 17,0 x 10⁻³ min⁻¹ (Tabela 1). As variantes coagulase e nuclease negativas, no entanto, apresentaram valores inferiores de km, compreendidos entre 8,2 x 10⁻³ min⁻¹ e 13,0 x 10⁻³ min⁻¹ (Tabela 1).

Os resultados da tipificação pelos fagos mostram que as variantes não pigmentadas apresentaram sensibilidade a um ou dois fagos a mais, independentemente do modo de obtenção destas variantes. A reação ao fago 77 aparece nas três variantes coagulase positivas, enquanto que ao fago 47 ocorre apenas em duas variantes (Tabela 1).

Discussão

Na formulação do meio, para produção de pigmento, foram consideradas observações realizadas por outros pesquisadores (6), de que o leite e, em especial, a gordura do leite, incrementam a formação de pigmento pelos microrganismos. A combinação leite-sal não tem sido encontrada na literatura. Provavelmente a maior produção de pigmento já observada no meio BHI agar com 3% NaCl, deva-se pelo menos em parte, ao desenvolvimento ótimo do microrganismo nesta concentração salina. Outra característica do meio foi a de favorecer a visualização do pigmento, devido ao contraste entre a cor amarelo-laranja, das colônias e o fundo branco opalino, do meio.

Os valores obtidos na cinética de crescimento apontam para o papel protetor do pigmento em relação à temperatura, sendo que, com a perda de pigmento houve diminuição entre 8 a 10°C nas temperaturas

ótimas e máximas. Esta diferença parece estar diretamente relacionada com a presença de pigmento, já que microrganismos derivados não pigmentados, porém coagulase e nuclease positivos, apresentaram um deslocamento similar nas temperaturas cardinais, não obstante apresentarem valores de km similares ao valor da linhagem pigmentada. Por outro lado, as variantes coagulase e nuclease negativas, além de sofrer o mesmo deslocamento nas temperaturas cardinais, apresentaram valores de km entre 50 e 30% inferiores ao valor de linhagem pigmentada. Este comportamento era previsível, já que a perda da capacidade de produzir exoenzimas, que são proteínas sem função para o desenvolvimento de microrganismos, estaria dentro das primeiras manifestações devidas a uma injúria genética de proporções variáveis, a nível da síntese de proteínas.

A reação a um e a dois fagos extras, nas variantes não pigmentadas, não representa uma alteração do fagotipo geral, indicando que não houve alterações profundas nestes derivados. Devido à dificuldade de tipificar microrganismos coagulase negativos, não temos dados relativos a estas variantes, o que, sem dúvida, esclareceria melhor acerca do papel do fagotipo 77 e daria indício de outras possíveis alterações ocorridas, manifestadas nas características destes microrganismos.

Referências Bibliográficas

1. Abo-Elnaga, I. & Kandler, D. - Zur charakterisierung der in milch verbreiteten staphylokokken. Zentr. Bakteriol. Parazitenk. Abt. I Orig., 196:438-451, 1965.
2. Altenbernd, R.O. - Genetic studies of pigmentation of *Staphylococcus aureus*. Can. J. Microbiol., 13:389-395, 1966.
3. Grinsted, J. & Lacey, R.W. - Ecological and genetic implications of pigmentation in *Staphylococcus aureus*. J. Gen. Microbiol., 75: 259-267, 1973.
4. Kumisawa, R. & Stanier, R.Y. - Studies on the role of carotenoid pigments in a chemoterotrophic bacterium, *Corynebacterium poinsettiae*. Archiv. für Mikrobiologie, 31:146-156, 1958.
5. Lachica, R.U.V.; Genigeorgis, C. & Hoeprich, P.D. - Metachromatic agar-diffusion methods for detecting Staphylococcal nuclease activity. Appl. Microbiol., 21:585-587, 1971.
6. O'Connors, J.J.; Willis, A.T. & Smith, J.A. - Pigmentation of *Staphylococcus aureus*. J. Pathol. Bacteriol., 92:585-588, 1966.
7. Turner, F.J. & Schwartz, B.S. - The use of a lyophilized human plasma standarized for blood coagulation and fibrinolitic tests. J. Lab. Clin. Med., 52:888-894, 1958.

ESTUDO MICROBIOLÓGICO DA FERMENTAÇÃO LÁTICA COM ALGUMAS HORTALIÇAS

José Santo Goldoni

Deptº de Tecnologia dos Produtos Agropecuários
Faculdade de Ciências Agronômicas UNESP
Campus de Botucatu
Caixa Postal 237
18600 Botucatu SP, Brasil

Urgel de Almeida Lima

Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
Caixa Postal 9
13400 Piracicaba SP, Brasil

& Ismael Antonio Bonassi

Deptº de Tecnologia dos Produtos Agropecuários
18600 Botucatu SP, Brasil

Resumo

Estudo microbiológico no decorrer da fermentação lática de seis hortaliças: cenoura, chuchu, couve-flor, pepino, repolho e vagem. Durante o processo de fermentação lática das hortaliças mencionadas, três grupos ativos de microrganismos foram isolados e classificados (bactérias produtoras de ácido lático, enterobactérias e leveduras), assim como culturas de bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Micrococcus*. Dentro as bactérias produtoras de ácido lático, *Lactobacillus plantarum* foi a mais ativa na fermentação de cenoura, couve-flor, pepino, repolho e vagem. Para a fermentação de chuchu, as espécies *Streptococcus faecalis* e *Lactobacillus plantarum* foram as de maior importância. Verificou-se também que *Lactobacillus leichmannii* esteve presente em todas as amostras de todas as fermentações. *Escherichia coli*, do grupo das enterobactérias, foi constatada ser predominante nas fermentações de chuchu, couve-flor e pepino; *Enterobacter aerogenes* predominou durante a fermentação de cenoura e vagem, enquanto que *Serratia marcescens* foi predominante na fermentação do repolho. Os estudos microbiológicos mostraram também que, entre as leveduras, *Debaryomyces hansennii* foi a espécie mais frequente na fermentação de todas as hortaliças estudadas. As leveduras mostraram baixa atividade na fermentação de vagem.

Summary

Microbiological study of lactic acid fermentation with some vegetables

During the lactic acid fermentation process of carrot, chayote, cauliflower, cucumber, cabbage and green bean, three groups of active microorganisms were detected and classified (lactic acid bacteria, enterobacter and yeasts) and also cultures of bacteria of the genus *Bacillus* and *Micrococcus*. *Lactobacillus plantarum* was the most active among the lactic acid bacteria in the fermentation of carrot, cauliflower, cucumber, cabbage and green bean. For the chayote fermentation *Streptococcus faecalis* and *Lactobacillus plantarum* were those of major importance. *Lactobacillus leichmannii* was detected in all samples from every fermentation. *Escherichia coli* of the enterobacter group, was found to be predominant in the fer-

mentation of chayote, cauliflower and cucumber; *Enterobacter aerogenes* was predominant during carrot and green bean fermentations, while *Serratia marcescens* was predominant in the cabbage's fermentation. The microbiological studies showed that among the yeasts, *Debaryomyces hansenii* was the most frequent species in all vegetables fermentation. Yeasts showed a low activity in the fermentation of green bean.

Introdução

A literatura estrangeira, sobre fermentação lática, é muito vasta e inúmeros são os trabalhos que se referem ao estudo microbiológico, principalmente, de azeitonas, pepinos e repolho. Dentre os microrganismos, são citadas as enterobactérias, bactérias produtoras de ácido lático e leveduras, como sendo os grupos mais ativos que ocorrem durante a fermentação (2, 22, 24, 26 e 53). Desses, o segundo grupo é considerado de maior importância, por ser produtor de ácido lático, que juntamente com o sal empregado na fermentação, são os responsáveis pela conservação do produto (3, 7, 16, 18, 28, 51, 54 e 58). Além de *Lactobacillus plantarum* que é mencionada como a principal espécie na produção de ácido (5, 6, 41 e 53), outras espécies também foram isoladas nos estudos realizados por diversos pesquisadores: *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus cerevisiae* e *Streptococcus faecalis* (40, 45, 46, 48, 49 e 63). As enterobactérias aparecem no início da fermentação e tendem a desaparecer no final do processo (7, 11, 22, 24, 26 e 32). As leveduras são mais comumente encontradas no término da fermentação e inúmeras espécies são citadas por diferentes autores (10, 14, 15, 16, 17, 22, 23, 24 e 36).

Considerando-se a escassez de pesquisas, pertinentes ao assunto em nosso país, objetivou-se, neste trabalho, coletar dados específicos, relacionados às nossas condições de clima e variedades de hortaliças encontradas no comércio local. Para se atingir o objetivo, foram realizadas fermentações com diferentes hortaliças, das quais foram obtidos os resultados do isolamento e identificação dos microrganismos envolvidos.

Material e Métodos

Matérias primas e preparo das fermentações - Foram utilizadas seis hortaliças: cenoura (*Daucus carota L.*) com 3,83% de carboidratos solúveis, chuchu (*Sechium edule Swartz*), com 2,95% de carboidratos solúveis, couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.), com 3,01% de carboidratos solúveis, pepino (*Cucumis sativus L.*), com 21,18% de carboidratos solúveis, vagem (*Phaseolus vulgaris L.*), com 2,54% de carboidratos solúveis e repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.), com 3,91% de carboidratos solúveis. As hortaliças foram adquiridas no comércio local e sempre da mesma fonte. Obedecendo às características de cada hortaliça, que foi fermentada em separado, o preparo das fermentações foi feito pelo método da salmoura com 10% de sal (cenoura, chuchu, couve-flor, pepino e vagem) e pelo método da salga seca, empregando-se 2,5% de sal em relação a massa da hortaliça (repolho), segundo metodologia adotada em trabalho anterior (21).

Determinação da acides e do pH - No decorrer e no final do processo

fermentativo, foram retiradas amostras de salmoura para a determinação do pH e da acidez total, nos intervalos de 0, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21, 28 e 35 dias. A acidez foi determinada através da titulação com solução de NaOH 0,1N, usando-se, como indicador, fenolftaleína a 1% solução alcoólica, expressando-se os resultados em porcentagem de ácido lático. Para a determinação do pH, empregou-se um potenciómetro medidor de pH com eletrodo de vidro, marca Corning, modelo 7. Os valores encontrados nessas análises, bem como o controle visual do aspecto das fermentações, serviram para avaliar o final do processo fermentativo (21).

Procedimento geral para o estudo microbiológico das fermentações - Para o estudo microbiológico das fermentações e verificação da sequência de microrganismos envolvidos, amostras de salmouras foram retiradas, com pipeta esterilizada do centro dos recipientes onde as hortaliças tinham sido colocadas para fermentar (13), nos intervalos de 0, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21, 28 e 35 dias, sendo as mesmas trabalhadas imediatamente após a coleta.

O estudo foi dirigido no sentido de isolar e identificar bactérias produtoras de ácido lático, leveduras e enterobactérias (4, 13, 33, 39).

Isolamento e caracterização das bactérias produtoras de ácido lático - Para isolamento do grupo das bactérias produtoras de ácido lático, foi utilizado o meio de cultura seletivo (9, 61). As culturas foram isoladas ao acaso, procurando-se sempre retirar, das placas onde se fez a semeadura, o maior número possível de colônias com aspecto morfológico diferente. Após a purificação, essas colônias foram estocadas em meio de cultura idêntico ao usado por Etchells & col. (18) para posterior identificação. A caracterização das bactérias das famílias *Lactobacillaceae* e *Streptococcaceae* foi feita em duas etapas. Na primeira, procurou-se separá-las em seus principais gêneros, a saber: *Lactobacillus* e *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Pediococcus*, através de meios seletivos específicos (34, 52, 59). Na segunda etapa, foram identificadas as várias espécies dos distintos gêneros de bactérias (4, 6, 30, 38, 43, 44).

Isolamento e caracterização das bactérias da família Enterobacteriaceae - As enterobactérias, representadas pelos gêneros *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* e *Serratia*, foram isoladas seguindo-se instruções contidas nos trabalhos de Izquierdo Tamayo (27), Fernandez Diez & col. (19) e Van Pee & Castelein (59). Para o isolamento das culturas, foram seguidas as mesmas normas descritas anteriormente; após a purificação, as colônias foram armazenadas em Nutriente Agar (31) para serem posteriormente identificadas através de provas bioquímicas (4) e recursos auxiliares (26, 39, 55).

Isolamento e identificação das leveduras - As leveduras foram isoladas e purificadas através da utilização de meios de cultura já descritos (13, 39). Para o isolamento e estocagem de culturas, foi usada a mesma técnica descrita para bactérias láticas (34). Para a identificação, foram seguidos os métodos correntes (33, 39).

Resultados e Discussão

A presença e a sequência dos microrganismos que ocorrem durante o processo fermentativo das hortaliças cenoura, chuchu, couve-flor, pepino, repolho e vagem, foram evidenciadas nos intervalos de tempo de

0, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de fermentação, conforme as condições pré-estabelecidas em material e métodos. Os resultados desses isolamentos, relacionados com a acidez titulável, expressa em ácido lático e com o pH das salmouras, no momento da coleta das amostras, são apresentados nas Tabelas 1 a 6.

Tabela 1 - Microrganismos isolados no decorrer da fermentação lática de cenoura

Microrganismos	Nº de isolamentos	0	24	48	72	96	1	2	3	4	5
		horas	horas	horas	horas	horas	segunda	segunda	segunda	segunda	segunda
		Mic. pH									
<hr/>											
Bactérias láticas											
<i>L. plantarum</i>	109	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. delbrueckii</i>	33	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. brevis</i>	16	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
Bactérias láticas											
<i>S. faecalis</i>	53	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>F. cerevisiae</i>	40	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lc. mesenteroides</i>	21	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>Lc. casei</i>	7	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>Lc. corynei</i>	2	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Enterobactérias											
<i>Ent. aureogenes</i>	14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>C. freundii</i>	10	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>E. coli</i>	8	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	8	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Ent. cloacae</i>	6	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>C. intermedius</i>	5	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Se. macesinensis</i>	7	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Leveduras											
<i>D. hansenii</i>	15	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sc. italicus</i>	7	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>End. burtonii</i>	6	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Ca. malibiosi</i>	5	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Tr. uckei</i>	5	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Br. lambicus</i>	4	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Ca. parapeltoclois</i>	4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>N. fuligineum</i>	4	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>To. dactylo</i>	4	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Rh. rubra</i>	3	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Pt. polymorpha</i>	2	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Sch. occidentalis</i>	2	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Sch. carniolica</i>	2	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-

Ac.: Acidez expressa em porcentagem de ácido lático; +: Isolado; -: Não isolado; L. Lactobacillus; S. Streptococcus; P. Pedioococcus; Lc. Leuconostoco; Ent. Enterobacter; C. Citrobacter; E. Escherichia; K. Klebsiella; Sc. Saccharomyces; Br. Brotula; Ca. Candida; To. Torulopsis; Br. Benthamomyces; N. Nudisporia; Rh. Rhodotorula; Pt. Pichia; Sch. Schizomyces.

Através dos isolamentos de bactérias produtoras de ácido lático e as enterobactérias, constatou-se que durante a fermentação de todas as hortaliças estudadas houve, esporadicamente, o aparecimento de outras espécies bacterianas. Essas culturas, identificadas seguindo as recomendações do "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (4), mostraram ser bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Micrococcus* (Tabela 7).

Os resultados revelaram três grupos de microrganismos ativos durante o processo fermentativo: bactérias produtoras de ácido lático, enterobactérias e leveduras (Tabelas 1 a 6). O grupo lático é o mais importante e, dentro desse determinadas espécies são responsáveis pela maior produção de ácido lático e pelas características do produto. Quanto aos microrganismos, embora encontradas em grande número, houve variação de uma hortaliça para outra, principalmente quando considerada a presença de leveduras. Encarados do ponto de vista geral, tais resultados parecem estar de acordo com a maioria dos autores, bibliografia consultada.

Tabela 2 - Microrganismos isolados no decorrer da fermentação lática de chuchu

Microrganismos	Nº de isola- mentos	0	24	48	72	96	1	2	3	4	5
		horas	horas	horas	horas	horas	semana	semanas	semanas	semanas	semanas
		Ac. pH	Ac. pH	Ac. pH	Ac. pH						
<hr/>											
Bactérias láticas		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i>	85	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. lactohamalii</i>	15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. brevis</i>	7	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Bactérias láticas		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. faecalis</i>	108	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. cerevisiae</i>	27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Le. crenario</i>	16	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Le. mesenteroides</i>	16	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
Enterobactérias		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	12	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Ent. aerogenes</i>	11	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i>	10	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
<i>C. freundii</i>	5	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>C. intermedia</i>	4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Lactobacilos		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>D. hansenii</i>	13	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>Br. intermedius</i>	11	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Sc. chevalieri</i>	9	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>T. curvatum</i>	8	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>D. phaffii</i>	7	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Scm. occidentalis</i>	7	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Ca. guilliermondii</i>	5	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Kl. lactic</i>	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>To. candida</i>	4	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Ca. tropicalis</i>	3	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Bi. polymorpha</i>	3	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Sc. rosei</i>	3	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>Sc. kluyveri</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Sc. rousii</i>	2	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>U. anomala</i> var.		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sc. italicus</i>	1	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>T. capricornutum</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ac.: ácidez expressa em porcentagem do leite lático; +: isolada; -: não isolada; *L. Lactobacillus*; *S. Streptococcus*; *P. Pedioococcus*; *La. Leuconostoc*; *E. Enterobacter*; *K. Klebsiella*; *C. Citrobacter*; *D. Debaryomyces*; *Br. Brettanomyces*; *Sc. Saccharomyces*; *T. Trichosporon*; *Scm. Schizomyces*; *Ca. Candida*; *Kl. Kluyveromyces*; *To. Torulopsis*; *Pt. Pichia*; *H. Hansenula*.

Para cenoura, couve-flor, pepino, repolho e vagem, apesar da presença de outras espécies de bactérias produtoras de ácido lático, *Lactobacillus plantarum* é o microrganismo mais importante, durante o processo fermentativo (Tabelas 1, 3, 4, 5 e 6). Isso está de acordo com a maior parte da bibliografia consultada, cujos pesquisadores trabalharam, principalmente, com fermentação lática de pepino, repolho e azeitona.

Contrariando o que foi exposto, Borg & col. (3), em estudos feitos com fermentação de pepino, empregando ácido sôrbico, encontraram, durante o processo fermentativo, maior número de culturas de *Pediococcus cerevisiae*, enquanto que Menezes & col. (35), que também trabalharam com pepino, constataram, nas fermentações, apenas as espécies do gênero *Streptococcus*, para o grupo das bactérias produtoras de ácido lático.

Para chuchu e em relação à principal espécie de microrganismo, isolada durante a fermentação lática, o resultado encontrado foi diferente. *Streptococcus faecalis* mostrou ser a espécie mais evidente, seguida por *Lactobacillus plantarum* (Tabela 2). Isso talvez explique o fato de que, para essa hortaliça, foi encontrado o menor valor para a máxima porcentagem de acidez. De acordo com Pederson & Albury (48), as bactérias dos gêneros *Streptococcus* e *Leuconostoc* são bacias produtoras de ácido.

Tabela 3 - Microrganismos isolados no decorrer da fermentação de couve-flor

Microrganismos	Nº de isolamento	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	1 semana	2 semanas	3 semanas	4 semanas	5 semanas
		% ac. lático	% ac. pH	% ac. pH	% ac. pH	% ac. pH					
Bactérias láticas											
<i>L. plantarum</i>	140	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. leichmannii</i>	22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. brevis</i>	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. curvatus</i>	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bactérias láticas											
<i>P. cerevinae</i>	18	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Le. mesenteroides</i>	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. faecalis</i>	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lu. armeniaca</i>	8	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Enterobacteriaceae											
<i>E. coli</i>	15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Kle. pneumoniae</i>	12	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. freundii</i>	4	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>C. intermedius</i>	1	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Leveduras											
<i>D. hansenii</i>	12	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Kl. sporogenes</i>	9	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Sc. cerevisiae</i>	4	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>End. burtonii</i>	2	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>H. uvarum</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sc. baillieti</i> var. baillieti	2	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>Sc. italicus</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Sc. uvarum</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Lyp. lycopifur</i>	1	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Fl. polymorpha</i>	1	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

Ac.: Acidose expressa em percentagem de ácido lático; +: Isolada; -: Não isolada; L. *Lactobacillus*; P. *Pediococcus*; Lu. *Lactococcus*; Sc. *Streptococcus*; E. *Enterobacter*; Kl. *Klebsiella*; C. *Citophageter*; D. *Cakargomyces*; Kl. *Kluuyeromyces*; Sc. *Saccharomyces*; End. *Endomycopsis*; H. *Hansenula*; Lyp. *Lycopomyces*; Fl. *Flisia*.

Sobre o grupo de bactérias produtoras de ácido lático, pode-se também observar que, para *Lactobacillus leichmannii*, embora não tenha sido a espécie predominante em nenhuma das fermentações com as diferentes hortaliças, o número de culturas isoladas foi relativamente alto (Tabelas 1 a 6). A espécie foi encontrada em todos os isolamentos, revelando papel definido durante a fermentação lática de todas as hortaliças estudadas. No confronto com a bibliografia, verifica-se que apenas Thompson & col. (57) fazem referência a *Lactobacillus leichmannii*, juntamente com *Lactobacillus plantarum*, nos estudos que fizeram sobre a formação de pústulas em picles de pepino e de tomate com aneto, preparados domesticamente. Há, no entanto, alguns trabalhos de fermentação lática (3, 12, 22, 27, 28) que mencionam que bactérias do gênero *Lactobacillus*, sem fazer especificações, e o que afirma ser a fermentação de vegetais, por salga seca ou em salmoura, conduzida por uma sequência de bactérias produtoras de ácido lático.

Especificamente para a fermentação lática de pepino (Tabela 4), os resultados obtidos revelaram os microrganismos ocorrentes são, em grande parte, coincidentes com as verificadas por diversos autores na bibliografia à fermentação lática, estudada com a mesma matéria prima, a saber: - *Lactobacillus plantarum* é citada nos trabalhos de Bell & col.; Borg & col.; Costilow & col.; Etchells & col.; Leitão & col.; Orillo; Pederson & col.; Rosen & col.; Strzelczyk; Thompson & col.; Vahtreich & col.; (3, 5, 6, 16, 18, 32, 40, 41, 45, 47, 48, 50, 53, 54, 57, 58) e, para a maioria desses autores, é o principal microrganismo da fermentação; - *Lactobacillus brevis* é citada por Bell & col.; Costilow & col.; Etchells & col.; Orillo; Pederson & col.; Strzelczyk (1, 6, 16, 18, 40, 45, 47, 48, 54) - *Leuconostoc mesenteroides* é citada nas referências de Costilow & col.; Orillo; Pederson & col.; (5, 6, 40, 45, 47, 58); - *Streptococcus faecalis* foi detec-

Tabela 4 - Microrganismos isolados no decorrer da fermentação lática de pepino

Microrganismos	Nº de isola- mentos	0	24	48	72	96	1	2	3	4	5
		Acid. pH									
Bactérias láticas											
<i>L. plantarum</i>	179	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>L. leichmannii</i>	15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. brevis</i>	12	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
Bactérias láticas											
<i>S. faecalis</i>	36	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
<i>P. curvatus</i>	23	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>S. mesenteroides</i>	9	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
<i>M. dissipans</i>	5	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
<i>C. crenulatus</i>	1	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Enterobactérias											
<i>E. coli</i>	15	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>C. freundii</i>	9	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Sul. aerogenes</i>	7	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	6	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Mnt. albus</i>	2	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Leveduras											
<i>D. hansenii</i>	20	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Cu. solani</i>	10	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>H. anomala</i> var. <i>anomala</i>	10	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Ts. curvata</i>	9	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>Ts. holmi</i>	8	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
<i>H. anomala</i> var. <i>rahmangutii</i>	7	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
<i>H. subtiliculosa</i>	7	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>Cu. tropicallis</i>	6	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Cu. neoflora</i>	4	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>Rh. rubra</i>	3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mst. pulcherrima</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ts. dantina</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ge. italicana</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ts. inamoenae</i>	1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ts. pîmo</i>	1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ac.: Acidez expetada em porcentagem de ácido láctico; +: Isolada; -: Não isolada; L. Lactobacillales; S. Streptococcales; P. Pediococcaceae; Cu. Leucostictaceae; E. Escherichia; C. Enterobacteriaceae; Ent. Enterobacter; K. Klebsiellaceae; D. Debaryomyces; Co. Candida; H. Hansenula; Ts. Torulopsis; Cry. Cryptosporonaceae; Rh. Rhodotorulales; Mst. Matsuohikosakia; Ge. Saccharomyces.

tado nos trabalhos de Mundt & col.; Orillo; Pederson & col. (37, 40, 45, 48); - *Pediococcus cerevisiae* é citada por Bell & col.; Borg & col.; Costilow & col.; Etchells & col.; Orillo; Pederson & col. (1, 3, 6, 16, 18, 40, 45, 48), sendo que este último a encontrou em maior porcentagem durante a fermentação; - *Enterobacter aerogenes* foi verificada no trabalho de Leitão & col. (32); - *Enterobacter cloacae* é citada por Rosen & Fabian (53); - *Escherichia coli* foi verificada no trabalho de Taha & col. (56); - *Debaryomyces hansenii* é citada por Etchells & col. (16, 17); - *Candida tropicalis* e *Hansenula anomala* var. *anomala* são citadas por Etchells & col. (15); - *Hansenula subtiliculosa* e *Torulopsis holmi* são citadas nos trabalhos de Etchells & Bell (10), Etchells & col. (15, 17) e Costilow & Fabian (5) e *Torulopeis holmi* é citada por Rosen & Fabian (53).

Em relação aos isolamentos de microrganismos da fermentação de pepinos, várias considerações devem ser feitas: foram isoladas, esporadicamente bactérias do gênero *Bacillus* (Tabela 7), porém o número de culturas foi relativamente pequeno, em relação ao número encontrado para os outros grupos de microrganismos.

Esses microrganismos são suspeitos de serem redutores de acidez (58). Os bacilos esporulados podem consumir o ácido láctico e causar amolecimento de pepinos (62), alteração que poderá ocorrer quando os bacilos predominarem nas populações microbianas de pepinos e suas salmouras, em pH de 5,5 ou mais elevado e se a fermentação for retardada ou paralizada por causas diversas, permitindo que o valor do

Tabela 5 - Microrganismos isolados no decorrer da fermentação lática de pepolho

Microrganismos	Nº de isola- mentos	0	24	48	72	96	1	2	3	4	5
		horas	horas	horas	horas	horas	semana	semanas	semanas	semanas	semanas
<i>Bactérias láticas</i>											
<i>L. plantarum</i>	272	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. delbruekii</i>	31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. brevis</i>	17	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Bactérias láticas</i>											
<i>Lc. mesenteroides</i>	98	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. carnosus</i>	19	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lc. dextranicum</i>	11	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>Enterobactérias</i>											
<i>Es. enteropathica</i>	13	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Es. aerogenes</i>	12	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. freundii</i>	10	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
<i>K. pneumoniae</i>	6	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>E. cloacae</i>	4	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. freundii</i>	4	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	3	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Leveduras</i>											
<i>D. mucosum</i>	19	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>T. duronii</i>	15	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>C. kudriavzevii</i>	8	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Sac. boulardii</i>	5	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-
<i>T. apiculata</i>	3	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>C. phaffii</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>H. subpellucens</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pz. polymorpha</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Do. italicus</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Do. saccharomyces</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>T. fermentans</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. glabrata</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Not.: Acides expressos em percentagem de ácido lático; +: Isolada; -: Não isolada; L. *Lactobacillus*; Le. *Leuconostoc*; P. *Pediococcus*; Es. *Escherichia*; Ent. *Enterobacter*; C. *Citrobacter*; K. *Klebsiella*; E. *Enterobacteriaceae*; P. *Pseudomonas*; Co. *Candida*; Und. *Undomycetidae*; H. *Humicola*; Pl. *Pitchia*; Sc. *Saccharomyces*; Ta. *Torulopsis*.

pH fique alto por vários dias. Tais condições não foram observadas neste trabalho e, provavelmente devido a isso, não se verificou o amolecimento do produto fermentado. A presença de *Bacillus* parece estar de acordo com outros autores (24, 28) que isolaram essas bactérias esporuladas de fermentações de azeitonas e declararam ser normal a sua presença nas condições estudadas.

A presença de bactérias do gênero *Micrococcus*, na fermentação de pepino (Tabela 7), parece estar concordando com estudos de picles (29) e azeitona (24).

Determinadas leveduras, identificadas, no presente trabalho com a fermentação lática de pepino, não foram relatadas na literatura consultada, em relação a alguns autores que fazem referência apenas ao gênero. As espécies identificadas talvez sejam os microrganismos cujas identificações não foram feitas pelos diferentes autores. *Candida solani* poderia corresponder às citações de Etchells & col. (10, 14); *Ranuncula anomala* var. *schnegelii*, à citação feita por Rosen & Fabian (53); *Torulopsis candida*, *Torulopsis dattila*, *Torulopsis inconspicua* e *Torulopsis pinus* à citação de Etchells & col. (14); *Saccharomyces italicus* à citação feita por Etchells & col. (14); e, por último, *Rhodotorula rubra* poderia corresponder às citações de Etchells & Bell (10), Etchells & col. (15) e Rosen & Fabian (53).

A interpretação dada para leveduras poderia justificar o aparecimento da bactéria lática *Leuconostoc dextranicum* durante a fermentação de pepino e identificada no presente trabalho. Com maior aproximação, para essa espécie, Vahlteich & col. (58) encontraram *Leucon-*

Tabela 6 - Microrganismos isolados no decorrer da fermentação lática de vagem

Microrganismos	Nº de isola- mentos	Tempo de incubação											
		0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	1 semana	2 semanas	3 semanas	4 semanas	5 semanas	6 semanas	
	-	8	.07	6.3	.05	6.4	.05	6.4	.09	6.3	.13	5.95	.18
Bactérias láticas													
<i>L. plantarum</i>	145	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. leichmannii</i>	30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. brevis</i>	3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Bactérias láticas													
<i>S. faecalis</i>	34	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. cereviseiae</i>	32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Le. mesenteroides</i>	7	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Enterobactérias													
<i>Ent. aureoënc</i>	22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>E. coli</i>	18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. intermedius</i>	16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. freundii</i>	15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>K. pneumoniae</i>	15	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Ent. cloacae</i>	6	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Leveduras													
<i>D. hansenii</i>	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>Sc. italicus</i>	2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>Sc. uvarum</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Nota: Acidú expressa em porcentagem de ácido lático; +: Isolada; -: Não isolada; *L.*: *Lactobacillus*; *S.*: *Streptococcus*; *P.*: *Pediococcus*; *Le.*: *Leuconostoc*; *Ent.*: *Enterobacter*; *E.*: *Escherichia*; *C.*: *Citrobacter*; *K.*: *Klebsiella*; *D.*: *Debaryomyces*; *Sc.*: *Saccharomyces*.

nostoc e afirmaram que poderia ser *L. mesenteroides* ou *L. dextranicum*, enquanto que Jones & Ferguson (28) citam a presença de bactérias do gênero *Leuconostoc*.

Os resultados referentes ao chucrute mostraram a presença de bactérias produtoras de ácido lático, enterobactérias e leveduras como principais (Tabela 5) e as bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Micrococcus* como secundárias (Tabela 7). Desses microrganismos, apenas as bactérias láticas são citadas referente à fermentação de repolho na literatura. Em relação às bactérias produtoras de ácido lático, identificadas neste estudo, os resultados são bastante semelhantes aos encontrados na literatura, a saber: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* e *Leuconostoc mesenteroides* (7, 8, 20, 44, 46, 49, 51). Durante a fermentação de repolho, a presença de *Leuconostoc mesenteroides* parece imprescindível, Pederson (44) afirmou que *L. plantarum* e *L. mesenteroides* são responsáveis pela produção de chucrute. Segundo Pederson (42) e Cruess (7), as bactérias do gênero *Leuconostoc* são responsáveis pelo aroma do produto fermentado.

Pediococcus cerevisiae é citada na literatura juntamente com *Streptococcus faecalis* (20, 44, 46, 49). A última espécie, no entanto, no presente trabalho, com fermentação de repolho, não foi detectada.

Do ensaio de fermentação com couve-flor foi isolado o *Lactobacillus plantarum*, concordando com relatos já feitos (41).

Com relação à fermentação lática de vagem, apenas uma referência foi encontrada (37), com a citação *Streptococcus faecalis*, também observada no presente trabalho.

A ocorrência de levedura *Debaryomyces hansenii* durante a fermentação das seis hortaliças, ensaiadas neste trabalho, está de acordo com as observações de Mrak & Bonar (36) que verificaram a presença dessa levedura em salmouras de picles e afirmaram, ainda, que devido

Tabela 7 - Espécies e número de culturas
de *Bacillus* e *Micrococcus* isoladas de
cenoura, chuchu, couve-flor, pepino,
repolho e vagem no decorrer da fermentação
láctica

Microrganismos	Cenou- ra	Chu- chu	C. flor	Pepi- no	Repo- lho	Vag- em
<i>Bacillus megaterium</i>	-	2	-	5	-	2
<i>Bacillus subtilis</i>	3	- 3	2	2	1	1
<i>Micrococcus</i> spp.	8	13	13	7	3	3

à sua maior tolerância a altas concentrações de sal, as espécies do gênero *Debaryomyces* são mais abundantemente distribuídas.

Os resultados do presente estudo revelaram ainda que inúmeras espécies foram encontradas, particularmente de enterobactérias e leveduras. Nos trabalhos constantes da literatura consultada, os microrganismos identificados e que estão relacionados com os dados obtidos no presente trabalho, são os seguintes: - *Lactobacillus casei*, foi encontrada somente em fermentação de couve-flor, embora já registrada durante a cura de pepino (54); - *Citrobacter freundii* e *Citrobacter intermedius*, presentes nas fermentações das seis hortaliças estudadas, com exceção de *Citrobacter intermedius*, não detectadas para o pepino, já foram citadas em fermentação de azeitona (24); - Representantes de *Klebsiella*, foram encontrados nas fermentações de todas as hortaliças, ensaiadas na pesquisa; para este gênero existe apenas uma citação, em fermentação de azeitona (22); - Membros de *Endomycopsis*, presentes durante a cura de cenoura, couve-flor e repolho, já foram isolados de pepino (10); - *Candida guilliermondii* e *Candida parapeilosia* representantes de *Cryptococcus*, encontrados, respectivamente, nas fermentações de chuchu, cenoura e pepino, já foram relatados na cura de azeitonas (23); - *Candida melibiosi* e *Kluyeveromyces veronae*, isoladas, respectivamente, das fermentações de cenoura e couve-flor, foram citadas em estudos feitos com azeitonas; - *Pichia polymorpha*, isolada das fermentações de cenoura, chuchu, couve-flor e repolho, foi citada em fermentação de azeitonas (24) e pepino (16); *Rhodotorula rubra*, presente na fermentação de cenoura e pepino, foi citada para azeitonas (60); - *Saccharomyces baillii* var. *baillii* encontrada apenas na fermentação de couve-flor foi verificada em estudos com pepino (15); - *Saccharomyces cerevisiae*, isolada das fermentações de cenoura e couve-flor e citada durante a cura de azeitonas (24, 25) não tendo sido encontrada em pepino, no presente trabalho, embora tivesse assinalada em estudos com essa matéria prima (14); *Saccharomyces chevalieri*, identificada na fermentação de azeitona (23, 24), só foi isolada em experimentos com o chuchu; - *Saccharomyces italicus* que, ao lado da *Debaryomyces hansennii*, foi uma das duas leveduras mais comuns a todas as hortaliças testadas nesta pesquisa, tem sido citada exclusivamente em fermentação de azeitonas (23, 24); *Saccharomyces rosei* e *Saccharomyces rouxii*, foram isoladas unicamente de fermentação de chuchu, mas são citadas em estudos com fermentação de pepinos (10, 17). Nos trabalhos de Etchells & col. (15, 16), de Costilow & Fabian (6) e de Rosen & Fabian (53), *Saccharomyces rouxii* não foi encontrada.

Vários microrganismos, isolados no decorrer deste trabalho, não são citados em estudos da fermentação lática existente na literatura consultada.

São destacadas as seguintes ocorrências: *Leuconostoc cremoris* (cenoura, chuchu, couve-flor e pepino), *Schwanniomyces occidentalis* (cenoura e chuchu), *Trichosporon capitatum* e *T. cutaneum* (chuchu e repolho), *Serratia marcescens* (cenoura e repolho), *Brettanomyces lambicus* e *Nadsonia fulvescens* (cenoura), *Brettanomyces intermedius* (chuchu), *Lipomyces lipofer* (couve-flor), *Metschnikowia pulcherrima* (pepino), *Trichosporon fermentans* (repolho).

Quanto ao desaparecimento ou diminuição das bactérias gram negativas, ou sejam, as enterobactérias, com o decréscimo do valor do pH da salmoura, os resultados obtidos vêm de encontro à observações feitas nos estudos da fermentação de azeitonas (22, 27). No final da fermentação da azeitona a diminuição do valor do pH era muito lenta e tanto as leveduras como os lactobacilos tendem a desaparecer, sendo que após todos esses fatos o valor do pH da salmoura tende a elevar-se (22). Isso também parece válido, para presente investigação.

Conclusões

1. Para as hortaliças, cenoura, couve-flor, pepino, repolho e vagem, o principal microrganismo da fermentação é provavelmente a bactéria *Lactobacillus plantarum*.
2. Durante a fermentação lática de chuchu, tudo indica haver equilíbrio entre *Streptococcus faecalis* e *Lactobacillus plantarum*.
3. É bem provável que *Lactobacillus leishmannii* tenha grande importância no decorrer da fermentação lática de hortaliças, pois ocupou um lugar definido no processo.
4. Além das espécies de bactérias produtoras de ácido lático, que parecem ser as principais, outras também estão presentes, podendo ser consideradas coadjuvantes do processo fermentativo de todas as hortaliças estudadas. Essas espécies são: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc cremoris*, *Leuconostoc dextranicum*, *Pediococcus cerevisiae* e *Streptococcus faecalis*.
5. Nas hortaliças cenoura, chuchu, couve-flor e vagem houve crescimento de enterobactérias e leveduras, em detrimento das bactérias produtoras de ácido lático.
6. Das enterobactérias *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* parecem ser as mais comumente encontradas durante o processo fermentativo, mesmo para a cenoura, chuchu, couve-flor e vagem.
7. Durante a fermentação lática de pepino ocorreu o maior número de culturas de leveduras. O maior número de espécies ocorreu no chuchu, enquanto o menor número de culturas e espécies ocorreu na fermentação de vagem.
8. As leveduras mais comuns são *Saccharomyces italicus* e *Debaryomyces hansennii*, parecendo ser esta última a principal.

9. Embora aparecendo esporadicamente e em pequeno número, foram constatadas, durante a fermentação de todas as hortaliças estudadas, bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Micrococcus*. Essas, principalmente *Bacillus*, quando as condições são favoráveis, podem deteriorar os produtos.

10. Finalmente, conclui-se que a conservação de hortaliças, através da fermentação lática é um processo complexo, onde estão envolvidas inúmeras espécies de microrganismos, tendo como principal representante o grupo das bactérias produtoras de ácido lático, interagindo com os demais grupos e resultando em produtos com características organolépticas próprias e não bem definidas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro prestado na realização deste trabalho e ao Dr. Ralph W. Johnston, Staff Officer-Animal and Plant Health Inspection Service, U.S. Department of Agriculture, pelo auxílio prestado na identificação das bactérias láticas.

Referências Bibliográficas

1. Bell, T.A.; Etchells, J.L. & Borg, A.F. - Influence of sorbic acid on the growth of certain species of bacteria, yeasts, and filamentous fungi. *J. Bact.*, 77:573-580, 1959.
2. Borbola y Alcalá, J.M.R. de la; Fernández-Diez, M.J.; Gonzales-Cancho, F. & Gordón-Casa Nueva, J.L. - Estudios sobre el aderezo de aceitunas verdes: la preparación y fermentación de las aceitunas en recipientes de gran capacidad. *Grasas aceit.*, 2:55-56, 1969.
3. Borg, A.F.; Etchells, J.L. & Bell, T.A. - The influence of sorbic acid on microbial activity in commercial cucumber fermentation. *Bact. Proc.*, 19:19-20, 1955.
4. Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E. - *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8.ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1974.
5. Costilow, R.N. & Fabina, F.W. - Microbiological studies of cucumber fermentations. *Appl. Microbiol.*, 1:314-319, 1953.
6. Costilow, R.N.; Coughlin, F.M.; Robach, D.L. & Ragheb, H.S. - A study of the acid-forming bacteria from cucumber fermentations in Michigan. *Fd Res.*, 21:17-33, 1957.
7. Cruess, W.V. - Commercial fruit and vegetable products. 4.ed. New York, McGraw-Hill, 1958.
8. Desrosier, N.W. - The technology of food preservation. 2.ed. rev. aum. Westport, Avi Publishing, 1963.
9. Emard, L.O. & Vaughn, R.H. - Selectivity of sorbic acid media for the catalase negative lactic acid bacteria and clostridia. *J. Bact.*, 63:487-494, 1952.
10. Etchells, J.L. & Bell, T.A. - Classification of yeasts from the fermentation of commercially brined cucumbers. *Farlowia*, 4:87-112, 1950.

11. Etchells, J.L. & Jones, I.D. - Bacteriological changes in cucumber fermentation. *Fd. Inds.*, 16:54-56, 1943.
12. Etchells, J.L. & Jones, I.D. - Characteristics of lactic acid bacteria from commercial cucumber fermentations. *J. Bact.*, 52: 593-599, 1946.
13. Etchells, J.L. & Jones, I.D. - Procedure for bacteriological examination of brined, salted, and pickled vegetables and vegetable products. *Am. J. publ. Hlth.*, 36:1112-1123, 1946.
14. Etchells, J.L.; Bell, T.A. & Jones, I.D. - Morphology and pigmentation of certain yeasts from brines and cucumber plant. *Farlowia*, 4:265-304, 1953.
15. Etchells, J.L.; Borg, A.F. & Bell, T.A. - Influence of sorbic acid on populations and species of yeasts occurring in cucumber fermentation. *Appl. Microbiol.*, 9:139-144, 1961.
16. Etchells, J.L.; Borg, A.F. & Bell, T.A. - Bloater formation by gas-forming lactic acid bacteria in cucumber fermentations. *Appl. Microbiol.*, 16:1029-1035, 1968.
17. Etchells, J.L.; Costilow, R.N. & Bell, T.A. - Identification of yeasts from commercial cucumber fermentations in northern brining areas. *Farlowia*, 4:249-264, 1952.
18. Etchells, J.L.; Costilow, R.N.; Anderson, T.E. & Bell, T.A. - Pure culture fermentation of brined cucumbers. *Appl. Microbiol.*, 12:523-535, 1964.
19. Fernandez-Diez, M.J.; Gonzales-Cancho, F.; Minguez-Mosquera, M. I.; Marquez-Gonzales, J. & Perez-Paz, C.M. - Elaboración del pimiento para el relleno de aceitunas: pelado químico y conservación en salmuera de baja graduación. I Ensayos preliminares. *Grasas aceit.*, 20:119-125, 1969.
20. Frazier, W.C. - Microbiología de los alimentos. Zaragoza, Acribia, 1962.
21. Goldoni, J.S. - Estudos sobre fermentação láctica em algumas hortaliças. Botucatu, Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, 1973.
22. Gomes, M.R.M. - Nota sobre a tecnologia da azeitona de mesa. *Agronomia lusit.*, 28:171-180, 1966.
23. Gonzales-Cancho, F. - Leveduras en la fermentación de aceitunas verdes estilo español. *Revta Ciência apl.*, 20:24-31; 125-131, 1966.
24. Gonzales-Cancho, F. - Microorganismos relacionados con el aderezo de aceitunas verdes. *Grasas aceit.*, 18:58-60, 1967.
25. Gonzales-Cancho, F. & Fernandez-Diez, M.J. - Resistencia térmica de diferentes especies de *Clostridium*, aisladas de salmueras de aceitunas verdes aderezadas alteradas. *Microbiología esp.*, 20: 73-80, 1967.
26. Izquierdo Tamayo, A. - Fermentación microbiana en el aderezo de las aceitunas verdes. *Microbiología esp.*, 6:291-306, 1953.

27. Izquierdo Tamayo, A. - La probabilidad microbiana de las salmueras de aceitunas. *Microbiología esp.*, 8:313, 1955.
28. Jones, A.H. & Ferguson, W.E. - Further studies on the curing of cucumbers and the development of green colour in finished pickles. *Fd Technol.*, 9:26-27, 1955.
29. Jones, A.H. & Harper, G.S. - A preliminary study of factors affecting the quality of pickles on the Canadian market. *Fd. Technol.*, 6:304-308, 1952.
30. Kasdorf, E.G. - Identification des bactéries lactiques, selon Orla-Jensen. *Lait*, 34:145-156, 1954.
31. Kennedy, H.E. & Speck, M.L. - Studies on corn steep liquor in the nutrition of certain lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.*, 38:208-216, 1955.
32. Leitão, M.F.F.; Menezes, T.J. & Yokoya, F. - Emprego de culturas puras no processamento de picles de pepino. *Col. Inst. Tecnol. Alim.*, 2:73-85, 1967/68.
33. Lodder, J. - The yeasts: a taxonomic study. 2.ed. Amsterdam, North-Holland Publ., 1970.
34. Mayeux, J.V. & Colmer, A.R. - Selective medium for *Leuconostoc* detection. *J. Bact.*, 81:1009-1011, 1961.
35. Menezes, T.J.B.; Leitão, M.F. & Mendonça, N.T. - Produção de picles de pepino por fermentação láctica. *Col. Inst. Tecnol. Alim.*, 1:259-271, 1965/66.
36. Mrak, E.M. & Bonar, L. - Film yeasts from pickle brines. *Zentbl. Bakt. Parasitkde*, 100:189-294, 1939.
37. Mundt, J.O.; Graham, W.F. & McCarty, I.E. - Spherical lactic acid producing bacteria of southern grown raw and processed vegetables. *Appl. Microbiol.*, 15:1303-1308, 1967.
38. Nakagawa, A. & Kitahara, K. - Taxonomic studies on the genus *Pediococcus*. *J. gen. Microbiol.*, 5:95-126, 1959.
39. Neder, R.N. - Introdução à microbiologia. Piracicaba, Instituto Zimotécnico, Esc. Sup. Agric. Luiz de Queirós, 1968.
40. Orillo, C.A. - Studies on cucumber fermentation. *Philipp. Agric.*, 50:56-61, 1966.
41. Pederson, C.S. - A study of the species *Lactobacillus plantarum* (Orla-Jensen) Bergey et al. *J. Bact.*, 31:217-224, 1936.
42. Pederson, C.S. - Lactic acid-producing bacteria in fermentations and food spoilage. *Fd. Res.*, 3:317-321, 1938.
43. Pederson, C.S. - The gas-producing species of the genus *Lactobacillus*. *J. Bact.*, 35:95-108, 1938.
44. Pederson, C.S. - Sauerkraut. *Ad. Fd. Res.*, 10:233-279, 1960.
45. Pederson, C.S. & Albury, M.N. - Factors affecting the bacterial flora fermenting vegetables. *Fd. Res.*, 18:290-300, 1953.
46. Pederson, C.S. & Albury, M.N. - The influence of salt and temperature on the microflora of sauerkraut fermentation. *Fd. Technol.*, 8:1-5, 1954.

47. Pederson, C.S. & Albury, M.N. - Fermentation and curing of cucumbers in low salt brines. *Fd. Technol.*, 9:26, 1955.
48. Pederson, C.S. & Albury, M.N. - Variations in bacterial flora of low salt cucumber brines. *Appl. Microbiol.*, 4:259-263, 1956.
49. Pederson, C.S.; Nicketic, G. & Albury, M.N. - Fermentation of the yugoslavian pickled cabbage. *Appl. Microbiol.*, 10:86-89, 1962.
50. Pederson, C.S.; Mattick, L.R.; Lee, F.A. & Butts, R.M. - Lipid alterations during the fermentation of dill pickles. *Appl. Microbiol.*, 12:513-516, 1964.
51. Prescott, S.C. & Dunn, C.G. - Industrial microbiology. 3.ed. rev. McGraw-Hill, 1959.
52. Rogosa, M.J.A.; Mitchell, J.A. & Wiseman, R.F. - A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal *Lactobacilli*. *J. Bact.*, 62:132-133, 1951.
53. Rosen, S. & Fabian, F.W. - The importance of biotin, niacin and pantothenic acid in cucumber fermentation. *Fd. Technol.*, 7:244-247, 1953.
54. Strzelczyk, A. - Przycsnek do badań nad rozwojem mikro flory mlekorwej w zakiszanych ogórkach. *Ann. Univ. Mariae Curie Skłodowska Sect., E. agric.*, 11:315-329, 1956.
55. Stuart, C.A.; Zimmerman, A.; Baker, M. & Rustigian, R. - Bijkman relationships of coliform and related bacteria. *J. Bact. (Baltimore)*, 43:557:572, 1943.
56. Taha, S.M.; Mahmoud, S.A.Z. & Abdel-Halim, M.A. - Bacteriological and chemical studies on egyptian pickled cucumbers, old brine method. *J. Microbiol.*, 1:117-131, 1966.
57. Thompson, T.L.; Engelhard, W.E. & Pivnick, H. - Pustule formation by *Lactobacilli* on fermented vegetables. *Appl. Microbiol.*, 3:314-316, 1955.
58. Vahlteich, H.W.; Haurand, C.H. & Perry, C.A. - Modern science applies itself to cucumber salting. *Fd. Inds.*, 7:334-336, 1935.
59. Van Pee, W. & Castelein, J.M. - Study of the pectinolytic microflora, particularly the *Enterobacteriaceae*, from fermenting coffee in the Cong. *J. Fd. Sci.*, 37:171-174, 1972.
60. Vaughn, R.H. - Some pink yeasts associated with softening of olives. *Appl. Microbiol.*, 18:771-775, 1969.
61. Vaughn, R.H. & Emard, L.O. - Selectivity of sorbic acid media for catalase-negative lactic acid bacteria and obligate spore-forming anaerobes. *Bact. Proc.*, 38:38-39, 1951.
62. Vaughn, R.H.; Levinson, J.H.; Nagel, C.W. & Krumperman, P.H. - Sources and types of aerobic microorganisms associated with the softening of fermenting cucumbers. *Fd. Res.*, 19:494-502, 1954.
63. Vorbeck, M.L.; Albury, M.N.; Mattick, L.R.; Lee, F.A. & Pederson, C.S. - Lipid alterations during the fermentation of vegetables by the lactic acid bacteria. *J. Fd. Sci.*, 28:495-502, 1963.

ESTUDO MICROBIOLÓGICO DA PRODUÇÃO DE CHUCRUTE COM REPOLHO 'MATSUKASE' (BRASSICA OLERACEAE L. VAR. CAPITATA)

José Santo Goldoni
& Aparecida Alves da Silva

Deptº de Tecnologia dos Produtos Agropecuários
Faculdade de Ciências Agronômicas UNESP
Campus de Botucatu
Caixa Postal 237
18600 Botucatu SP, Brasil

Resumo

No decorrer da produção de chucrute com o repolho fez-se contagens microbianas para verificar: população total, bactérias produtoras de ácido, gênero *Leuconostoc*, cocos sal-tolerantes, coliformes, grupo butírico (NMP), grupo halofílico obrigado (NMP) e leveduras. As bactérias do gênero *Leuconostoc*, do grupo butírico, do grupo halofílico obrigatório e coliformes, sofreram diminuição em suas contagens. Os demais grupos aumentaram suas populações, tiveram oscilações e, no final do processo fermentativo, mostraram a tendência em diminuir as suas contagens.

Summary

Microbiological study of sauerkraut production with cabbage's cultivar 'Matsukase' (Brassica oleraceae L. var. capitata L.)

During the fermentative process of sauerkraut production with cabbage's cultivar 'Matsukase', microorganisms counts were done with the purpose of verifying: total count, acid forming bacteria, genus *Leuconostoc*, salt tolerant cocci, coliform bacteria, obligate halophiles (MPN), yeasts and butyric acid group (MPN). During the fermentation, genus *Leuconostoc* butyric group, obligate halophiles and coliform bacteria, decreased in their counts. The other groups increased their populations, showed oscillations and at the end of fermentation they showed the tendency decrease in number.

Introdução

O chucrute, produto resultante da fermentação lática do repolho, pode ser elaborado com diferentes cultivares da hortaliça, sendo que algumas dão melhores produtos que outras, fato esse amplamente divulgado (16). Para a obtenção do produto, emprega-se sal (NaCl), para remover o suco de repolho, onde se encontram as substâncias fermentecíveis, e reduzir a flora microbiana indesejável, favorecendo, portanto, a fermentação ácida (4). Esta depende das bactérias lácticas, cujas principais espécies, em ordem crescente à quantidade de ácido lático produzido, são (10): *Streptococcus faecalis* (homofermentativa), *Leuconostoc mesenteroides* (heterofermentativa), *Lactobacillus brevis* (heterofermentativa) *Pediococcus cerevisiae* (homofermentativa), e *Lactobacillus plantarum* (homofermentativa), *Leuconostoc mesenteroides* inicia a fermentação, produzindo quantidade

suficiente de ácido para baixar, rapidamente, o pH do meio que, juntamente com o gás carbônico produzido, inibe os microrganismos indesejáveis e propicia condições para o desenvolvimento das demais bactérias lácticas (10, 12). As condições ambientais, número e tipos de organismos presentes, limpeza, concentração, distribuição de sal, temperatura e cobertura dos tanques de fermentação, influenciam o desenvolvimento da fermentação (10, 15).

A conservação de vegetais é processo natural onde interferem inúmeras variáveis. Não se emprega matéria prima esterilizada, nem condições assépticas. A microflora presente é diversa e se constitui, principalmente, de três grupos de microrganismos: bactérias lácticas, enterobactérias e leveduras (5, 7, 9).

Outros grupos de microrganismos, tais como cocos sal-tolerantes, halofílicos e grupo butírico, estão incluídos nos guias de procedimentos para a análise de picles, chucrutes e outros vegetais em salmoura ou salgados (1, 2).

Considerando-se a importância do assunto e o reduzido número de informações disponíveis no Brasil, objetivou-se, no presente trabalho verificar os grupos de microrganismos, envolvidos na produção de chucrute, com repolho 'Matsukase', através do processo fermentativo natural e em condições de temperatura controlada ($19^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$).

Material e Métodos

Matéria prima - Utilizou-se repolhos cultivar 'Matsukase' (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) produzidos na Fazenda Experimental "São Manoel", situada no município de São Manoel, S.P., colhidos no mês de agosto de 1980.

Fermentações - O experimento constituiu-se de quatro ensaios a intervalos de cinco a oito dias, durante um período de 20 dias (quatro repetições). As fermentações foram preparadas pelo método de salga seca, empregando-se sal refinado comercial, seguindo-se metodologia adotada em trabalho anterior (5), utilizando-se, em cada uma delas, 10kg de matéria prima. A preparação e o acondicionamento, nas cubas de fermentação, foram feitos em dias diferentes, conforme a disponibilidade de matéria prima. As fermentações foram realizadas em condições idênticas, empregando-se uma câmara de incubação Fanem-Modelo 095/A-1, com temperatura controlada de $19^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (6).

Determinação da acidez e do pH - No decorrer e no final do processo fermentativo, foram retiradas amostras de salmoura para determinação do pH e da acidez total, nos intervalos de 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 49 dias. A acidez foi determinada através de titulação, com solução de NaOH 0,1N, utilizando-se, como indicador, fenolftaleína a 1%, em solução alcoólica, expressando-se os resultados em porcentagem de ácido lático. Para a determinação do pH, empregou-se potenciômetro medidor de pH com eletrodo de vidro, marca Corning, modelo 7. Os valores encontrados nessas análises, bem como o controle visual do aspecto das fermentações, serviram para avaliar o final do processo fermentativo (5).

Análises microbiológicas - Amostras de salmoura foram assepticamente retiradas dos recipientes de fermentação, seguindo-se as recomendações da APHA (1) e da Etchells & Jones (2), nos intervalos de 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 49 dias, sendo as mesmas trabalhadas imediatamente após a coleta. Seguindo-se a metodologia indicada pela APHA

(1), foram feitas contagens para vários grupos de microrganismos, com os seguintes meios (1): contagem total de microrganismos, em dextrose agar; bactérias produtoras de ácido, em LBS agar; cocos sal-tolerantes, em caseinato nutritivo agar; coliformes, em verde brilhante lactose bile agar; grupo halofílico obrigado (NMP) em caldo de fígado com sal; leveduras, em dextrose agar acidificado; e grupo butírico (NMP), em caldo de fígado sem sal. Especificamente, para a contagem de bactérias do gênero *Leuconostoc*, empregou-se o meio seletivo de Mayeux & Colmer (11).

Resultados e Discussão

Os resultados da acidez, expressa em porcentagem de ácido lático e pH, no decorrer das fermentações com repolho 'Matsukase', são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Acidez expressa em porcentagem de ácido lático e pH no decorrer das fermentações com repolho 'Matsukase'

Dias de fermentação	Fermentações							
	1	2	3	4	1	2	3	4
	Acidez	pH	Acidez	pH	Acidez	pH	Acidez	pH
0	0,05	5,45	0,04	5,70	0,04	5,40	0,03	5,60
7	0,57	4,10	0,98	3,45	0,74	3,85	0,72	3,65
14	1,51	3,25	1,14	3,40	1,24	3,50	0,87	3,65
21	1,85	3,20	1,47	3,25	1,50	3,25	1,40	3,30
28	1,80	3,20	1,47	3,25	1,63	3,20	1,63	3,25
35	1,81	3,30	1,53	3,30	1,47	3,30	1,58	3,20
42	1,88	3,35	1,48	3,35	1,57	3,25	1,45	2,90
49	1,79	3,40	1,57	3,25	1,42	3,00	1,57	3,20

Os valores obtidos, para todos os ensaios, foram similares e ocorreram oscilações, durante o processo fermentativo. Este fato já foi constatado anteriormente (5) e concorda com a maior parte das referências bibliográficas consultadas.

Os resultados das contagens microbianas, efetuadas no decorrer das fermentações com o repolho 'Matsukase' são apresentados nas Tabelas 2 a 9.

Nos quatro ensaios de fermentação, foram detectados todos os grupos de microrganismos que se procurou investigar no experimento. Durante a fermentação, as bactérias do gênero *Leuconostoc*, do grupo butírico, do grupo halofílico obrigado e coliformes, sofreram diminuição em suas contagens. Os demais grupos (contagem total, bactérias produtoras de ácido, cocos sal-tolerantes e leveduras), aumentaram suas populações, sofreram oscilações e, no final do processo fermentativo, mostraram a tendência em diminuir suas contagens.

Os resultados mostraram que existem três grupos de microrganismos ativos, durante o processo fermentativo: as bactérias produtoras de ácido, as enterobactérias (coliformes) e as leveduras, sendo o gru-

Tabela 2 - Contagem total de microrganismos durante a fermentação lática do repolho cultivar 'Matsukase'

Dias de fermentação	Unidades formadoras de colônias (u.f.c.) por ml da salmoura			
	Fermentações			
	1	2	3	4
0	33x10 ⁵	71x10 ⁴	17x10 ⁴	10 ³
7	15x10 ³	26x10 ⁵	89x10 ⁵	5x10 ³
14	23x10 ⁷	18x10 ⁶	14x10 ⁷	53x10 ⁶
21	7x10 ⁶	66x10 ⁵	27x10 ⁷	47x10 ⁷
28	72x10 ⁵	10x10 ⁵	10x10 ⁷	53x10 ⁶
35	31x10 ⁵	27x10 ⁵	35x10 ⁵	17x10 ⁶
42	24x10 ⁵	26x10 ⁵	13x10 ⁶	13x10 ⁵
49	60x10 ³	>65x10 ⁶	63x10 ⁵	>65x10 ⁶

Tabela 3 - Contagem de bactérias produtoras de ácido durante a fermentação lática do repolho cultivar Matsukase

Dias de fermentação	Unidades formadoras de colônias (u.f.c.) por ml da salmoura			
	Fermentações			
	1	2	3	4
0	11x10 ²	27x10 ⁴	62x10 ²	12x10 ²
7	2x10 ²	11x10 ⁵	47x10 ⁴	23x10 ⁴
14	<100	21x10 ⁵	24x10 ⁵	>65x10 ⁵
21	<10	20x10 ⁶	24x10 ⁵	>65x10 ⁷
28	10	20x10 ⁶	24x10 ⁵	12x10 ⁶
35	65x10 ⁴	60x10 ⁴	18x10 ⁵	>65x10 ⁵
42	25x10 ³	13x10 ⁵	30x10 ⁴	>65x10 ⁷
49	10x10 ⁵	25x10 ⁴	37x10 ³	70x10 ⁵

po de bactérias láticas o principal. Isso também foi verificado nos estudos com fermentação lática de diferentes hortaliças (5) e com a azeitona verde (7, 9).

As bactérias do gênero *Leuconostoc* (Tabela 4) estão presentes somente no início da fermentação. Ao que tudo indica, propiciam condições para o melhor desenvolvimento das demais bactérias láticas, principalmente aquelas responsáveis pela maior produção de ácido lático, que é o principal produto da fermentação (Tabela 1). Essa afirmação encontra apoio nos resultados do presente trabalho e de outros autores (5, 12, 13, 14, 15).

Com relação ao grupo de bactérias coliformes (enterobactérias), como pode ser verificado (Tabela 6), sua incidência é maior, no início da fermentação; à medida que a acidez se eleva (Tabela 1), vão reduzindo a sua população. No final do processo fermentativo, praticamente, não se verifica mais a presença desse grupo de bactérias. Isso está de acordo com o estudo microbiológico da fermentação lática com cenoura, chuchu, couve-flor, pepino, repolho e vagem (5), azeitonas verdes (7), picles de nabo, em que estão presentes bactérias do gênero *Enterobacter*, na fase inicial das fermentações e *Escherichia coli*, que diminui, gradualmente devido ao efeito de acidez (17).

Segundo Etchells (3), as leveduras iniciam fermentação ativa após uma semana, declinando o seu número após o 30º dia.

O mesmo comportamento foi observado por Goldoni (5), em seis hortaliças.

No presente estudo, os resultados obtidos, para os ensaios de fermentação com repolho 'Matsukase' (Tabela 7), são concordantes com as afirmações anteriores.

As bactérias do grupo butírico (Tabela 8), encontradas em pequeno

Tabela 4 - Contagem de bactérias do gênero *Leuconostoc* durante a fermentação lática do repolho cultivar 'Matsukase'

Dias de fermentação	Unidades formadoras de colônias (u.f.c.) por ml de salmoura			
	1	2	3	4
0	$\leq 10^2$	24×10^1	≤ 10	≤ 10
7	70	≤ 10	≤ 10	≤ 1
14	≤ 10	≤ 1	≤ 1	≤ 1
21	≤ 1	≤ 1	≤ 1	SPR*
28	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1
35	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1
42	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1
49	≤ 1	≤ 1	≤ 1	SPR*

*SPR = mancha de colônias na placa.

Tabela 6 - Contagem de coliformes durante a fermentação lática do repolho cultivar 'Matsukase'

Dias de fermentação	Número Mais Provável (NMP) por ml de salmoura			
	1	2	3	4
0	11	1100	9	460
7	20	93	36	≤ 3
14	93	14	≤ 3	≤ 3
21	≤ 3	≤ 3	≤ 3	≤ 3
28	≤ 3	≤ 3	≤ 3	≤ 3
35	9,1	≤ 3	≤ 3	≤ 3
42	9,1	≤ 3	≤ 3	≤ 3
49	12	3,6	≤ 3	≤ 3

Tabela 5 - Contagem de bactérias cocos sal-tolerantes durante a fermentação lática do repolho cultivar 'Matsukase'

Dias de fermentação	Unidades formadoras de colônias (u.f.c.) por ml de salmoura			
	1	2	3	4
0	43×10^3	11×10^4	31×10^3	15×10^4
7	85×10^7	31×10^6	17×10^6	80×10^5
14	26×10^7	30×10^5	74×10^5	40×10^6
21	1×10^6	70×10^5	51×10^6	30×10^3
28	2×10^5	55×10^4	20×10^6	86×10^3
35	22×10^4	60×10^4	10×10^6	56×10^3
42	19×10^4	40×10^5	24×10^5	20×10^4
49	73×10^4	38×10^5	42×10^5	SPR*

*SPR = mancha de colônias na placa.

Tabela 7 - Contagem de leveduras durante a fermentação lática do repolho cultivar 'Matsukase'

Dias de fermentação	Unidades formadoras de colônias (u.f.c.) por ml de salmoura			
	1	2	3	4
0	55×10^5	14×10^5	58×10^4	37×10^5
7	36×10^7	94×10^6	11×10^7	30×10^7
14	28×10^7	62×10^6	18×10^7	12×10^7
21	27×10^6	35×10^5	15×10^7	30×10^7
28	77×10^5	28×10^6	45×10^6	13×10^7
35	50×10^5	28×10^6	60×10^6	35×10^6
42	29×10^5	13×10^6	26×10^6	25×10^5
49	34×10^4	10×10^6	77×10^5	17×10^6

número, no inicio da fermentação, tendem a desaparecer rapidamente, no decorrer do processo fermentativo. Isto significa que essas bactérias não encontraram ambiente adequado para se desenvolverem, na concentração de sal, empregada no preparo de chucrute. Esse resultado é concordante com o estudo de fermentação lática de pepino em diferentes concentrações de sal (8).

Os demais grupos de microrganismos observados neste trabalho, não foram citados na literatura consultada. Portanto, não foi possível fazer comparações.

Tabela 8 - Número Mais Provável (NMP) de bactérias do grupo butírico durante a fermentação lática do repolho cultivar 'Matsukase'

Dias de fermentação	Número Mais Provável (NMP) por ml de salmoura			
	Fermentações			
	1	2	3	4
0	>2400	7100	27	20
7	>2400	75	<3	<3
14	6,1	3	<3	<3
21	<3	4	<3	<3
28	93	400	<3	<3
35	7,3	>240	23	<3
42	460	3,6	23	<3
49	3	23	9,1	<3

Tabela 9 - Número Mais Provável (NMP) de bactérias halofílicas durante a fermentação lática do repolho cultivar 'Matsukase'

Modelo	Número	%
CeNSu	1	5,0
CeICa	3	15,0
HCa	2	10,0
CeH	8	40,0
Ca	2	10,0
Ce	2	10,0
H	2	10,0
Sensibilidade a todas as drogas	0	-

Conclusões

1. Nos ensaios com o repolho 'Matsukase' e em todos os intervalos do processo fermentativo em que foi feita a contagem microbiana, foram detectados os seguintes grupos de microrganismos: bactérias produtoras de ácido, bactérias do gênero *Leuconostoc*, cocos sal-tolerantes, coliformes, leveduras, bactérias do grupo butírico e bactérias halofílicas obrigatórias.
2. Para todas as fermentações do experimento, foram verificados três grupos de microrganismos ativos, durante o processo fermentativo: as bactérias produtoras de ácido, as enterobactérias (coliformes) e as leveduras, sendo o grupo de bactérias lácticas o principal.
3. Em todas as repetições efetuadas, durante a fermentação, as bactérias do gênero *Leuconostoc*, do grupo butírico, do grupo halofílico obrigatório e coliformes sofreram diminuições em suas contagens. Os demais grupos aumentaram suas populações, tiveram oscilações e no final do processo fermentativo, mostraram a tendência em diminuir as suas contagens.

Referências Bibliográficas

1. American Public Health Association - Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, Marvin. L. Speck, 1976.
2. Etchells, J.L. & Jones, I.D. - Procedure for bacteriological examination of brined, salted, and pickled vegetables and vegetables products. Am. J. publ. Hlth, 36:1112-1123, 1946.
3. Etchells, J.L.; Costilow, R.N.; Anderson, T.E. & Bell, T.A. -

- Pure culture fermentation on brined cucumbers. Appl. Microbiol., 12:523-535, 1964.
4. Frazier, W.C. - Microbiología de los alimentos. Zaragoza, Acribia, 1962.
 5. Goldoni, J.S. - Estudos sobre fermentação lática em algumas hortaliças. Botucatu, Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, 1973.
 6. Goldoni, J.S.; Bonassi, I.A.; Lima, U. de A.; Conceição, F.A.D. & Kimoto, T. - Produção de chucrute. I - Influência da temperatura na fermentação de cultivares de repolho (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.). Botucatu Cient. Sér. A, 1:61-65, 1976.
 7. Izquierdo Tamayo, A. - Fermentación microbiana en el aderezo de las aceitunas verdes. Microbiología esp., 6:291-306, 1953.
 8. Jones, A.H. & Ferguson, W.E. - Further studies on the curing of cucumber and the development of green colour in finished pickles. Fd. Technol., 9:26-27, 1955.
 9. Juven, B.; Samish, Z. & Henis, Y. - Identification of oleuropein as a natural inhibitor of lactic fermentation of green olive. Israel J. Agric. Res., 18:137-138, 1968.
 10. Luh, B.S. & Woodroof, J.G. - Commercial vegetable processing. Westport, AVI, 1975.
 11. Mayeux, J.V. & Colmer, A.R. - Selective medium for *Leuconostoc* detection. J. Bact., 81:1009-1011, 1961.
 12. Nabors, W.T. & Salunkhe, D.K. - Pre-fermentation inoculation with *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum* on physicochemical properties of fresh and dehydrated sauerkraut. Fd. Technol., 23:67-71, 1969.
 13. Pederson, C.S. & Albury, M.N. - Factors affecting the bacterial flora in fermenting vegetables. Fd. Res., 18:290-300, 1953.
 14. Pederson, C.S. & Albury, M.N. - Variations in bacterial flora of low salt cucumber brines. Appl. Microbiol., 4:259-263, 1956.
 15. Pederson, C.S. & Albury, M.N. - The sauerkraut fermentation. Bull. N.Y. St. agr. Exp. Stn. (Geneva), 824:1-84, 1969.
 16. Prescott, S.C. & Dunn, C.G. - Industrial microbiology. 3. ed. New York, McGraw-Hill, 1959.
 17. Taha, S.M.; Mahmoud, S.A.Z. & Abdel-Halim, M.A. - Bacteriological and chemical studies on egyptian pickled turnips. J. Microbiol. (UAR), 1:179-200, 1966.

INFORMAÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA SBM

Rains, D.W.; Valentine, R.C. & Hollaender, A., eds. - *Genetic engineering of osmoregulation*. New York, Plenum Press, 381p. + XIV, 1980.

O livro pertence à Série "Basic Life Sciences, da qual é o vol. 14, e tem como subtítulo "Impact on Plant Productivity for Food, Chemicals, and Energy" e traz as contribuições de vários cientistas ao Simpósio que sobre o assunto foi realizado em 1979, no Laboratório Nacional de Brookhaven, USA.

Desde que a técnica de engenharia genética começou a ser implantada na última década, a identificação de genes responsáveis por reações bioquímicas que determinam um dado comportamento fisiológico nos vegetais, tem sido uma constante. Ora, tanto plantas como microrganismos são frequentemente submetidos à condições de seca, altas concentrações salinas, temperaturas elevadas, etc, que determinam perda da produtividade. Entretanto, é secular o uso de preservar ou curtir alimentos em soluções salinas; por outro lado, modernamente há tentativas, mesmo esparsas, de se irrigar culturas com água do mar. A água é essencial para todas as formas de vida e quando a concentração celular de solutos aumenta, tem lugar a desidratação que pode levar à morte dos organismos. Os homens e seus animais controlam o problema de desajuste osmótico utilizando os seus rins, ao passo que as células de plantas e microrganismos produzem solutos para contrabalançar a demanda do ambiente em que vivem. Essa adaptação e condições salinas e de seca é chamada de osmoreregulação, governada pelos genes osm detectados em bactérias e que também podem estar presentes funcionalmente em células de plantas superiores.

Quando bactérias como as *Enterobacteriaceae* são expostas à pressões osmóticas crescentes, elas reagem elevando a pressão osmótica do interior de suas células, e o fazem aumentando a concentração de prolina ou em alguns casos de glutamina ou -aminobutirato. Esses aminoácidos protegem as células de efeitos danosos resultantes de estresse de água. A bactéria fixadora de nitrogênio *Klebsiella pneumoniae*, do mesmo modo que *E. coli* e *Salmonella typhimurium*, quando colocadas em meio contendo L-prolina e alta concentração salina, apresentam um estímulo no seu crescimento.

Existem cepas de *Salmonella typhimurium* que produzem grandes quantidades de L-prolina, as quais foram selecionadas em meios de cultura contendo concentração normalmente tóxica do análogo de L-prolina, o L-azetidina-2-carboxilato. Os mutantes com teores elevados de L-prolina, excretam o aminoácido que antagonizará o análogo. A mutação que confere resistência à L-azetidina-2-carboxilato está intimamente relacionada com o locus da primeira enzima pertencente ao complexo enzimático responsável pela síntese de L-prolina, e foi transferido através de um plasmídeo para outras cepas de *S. typhimurium*, as quais assim adquiriram as características do doador que eram de tolerância ao carboxilato e sais. L-prolina, então, desempenha um papel central na osmoregulação, e os resultados até o momento obtidos indicam a possibilidade de utilizar as técnicas de engenharia genética para transferir esse caráter para outros microrganismos e plantas superiores.

Essas e outras abordagens são apresentadas e discutidas amplamente nas várias seções do livro. Os autores colocam perguntas, e procuram respondê-las, sobre a osmoregulação em microrganismos procariontes e

em organismos eucariotos, focalizando também os mecanismos osmoregulatórios em plantas. Neste último caso, os mecanismos de tolerância a seca e a frio são apresentados e discutidos. Desse modo, a publicação é recomendável para microbiologistas, fisiologistas e bioquímicos vegetais e, de um modo mais amplo, para os engenheiros agrônomos, os quais estão continuamente expostos à problemas de osmoreregulação.

Otto J. Crócomo
Deptº de Bioquímica
ESALQ/USP
Caixa Postal 9
13400 Piracicaba SP

Starr, M.P.; Ingraham, J.L. & Balows, A., eds. - Annual Review of Microbiology. California, Annual Reviews Inc., vol. 35, 679p., 1981.

São 22 artigos de revisão, compondo o volume desta tradicional série. No primeiro, H.B. Woodruff autobiografa-se, enfatizando suas atividades como microbiologista do solo. Ligado à Merck, Sharp & Dohme americana, o autor, que trabalhou com S.A. Waksman, deixa consignadas 97 referências de trabalhos nos quais, em grande parte, após a sua assinatura de pesquisador ligado à indústria. Em "Pathogenesis and Immunology of *Treponema pallidum*", T.J. Fitzgerald revê, com 143 referências, a doença, a patogenia e sua ligação com mucopolissacarídios e imunidade (vacinas, respostas humoral e celular, imunsupressão). A. Campbell, em "Evolutionary Significance of Accessory DNA Elements in Bacteria" (115 referências), trata do significado da evolução do DNA extracromossomial (tanto viral como plasmidial) transposons e sequências de inserção, deixando consignadas 202 referências. T.G. Pistole discorre sobre "Interaction of Bacteria and Fungi with Lectins and Lectins-Like Substances". Aborda, entre outros aspectos, os casos gerais e específicos de reação de lectinas com bactérias e fungos, além de comentar o seu uso prático no Laboratório Clínico e papel na natureza. Sumariamente, M. Alexander relata "Why Microbial Predators and Parasites do not Eliminate their Prey and Hosts", com 74 citações. Interessante é encontrar o trabalho de A.R. Maggenti "Nematodes: Development as Plant Parasites", figurando no conjunto de revisões desta obra, sob a alegação de que o menor nematódio parasito de planta possui 0,25mm e a maioria inclui-se nos tamanhos de 1 ou 2mm; cita 26 referências. Não menos interessante é "Psychoneuroendocrinological Effects on the Immune Response" de Salomon & Amkraut, em que se aborda, entre outros, as anormalidades imunológicas em doenças mentais, influência hipotalâmica na resposta imune, "stress" e a resposta imunológica, com 247 citações. Bastante atual, 46 referências, é a revisão de Yewdell & Gerhard sobre "Antigenic Characterization of Viruses by Monoclonal Antibodies", com abordagens do tipo: aplicação de anticorpos monoclonais na análise antigênica e caracterização de hibridoma anteriormente à sua aplicação na análise antigênica. Robert & Brill revêm "Genetics and Regulation of Nitrogen Fixation", abrangendo os avanços com *K. pneumoniae*, *Azotobacter*, bactérias púrpura-fotossintéticas que não do enxofre, e a simbiose *Rhizobium-Legume*, 222 referências. Em "Genetic Studies with Bacterial Protoplasts", D.A. Hopwood relata a preparação e a regeneração de protoplastos em bactérias Gram-positivas e negativas, as interações genéticas em fusões intraespecíficas de protoplastos, transferências de plasmídios na fusão de protoplastos, liposomas e a aplicação industrial de protoplastos; 102 referências. Bactérias que

lemboram membros do gênero *Corynebacterium* (EKO), são causadoras de infecção renal (Dee disease) em trutas, salmões, etc, segundo o levantamento de Fryer & Sanders, que aborda o agente etiológico, epizooetologia, patologia, detecção, diagnóstico, imunidade e controle da doença; 74 referências. Acerca de polissacarídios, além da parede celular de bactérias - glicocálix, em "The Bacterial Glycocalyx in Nature and Disease", Costerton & col. levantam a natureza do glicocálix bacteriano em ecossistemas naturais e sistemas patogênicos, com micrografias e 144 citações. Embora curto, o levantamento de Kreier & Ristic, "The Biology of Hemotrophic Bacteria", coleciona 78 referências sobre morfologia, taxonomia cultivo, metabolismo, bioquímica, infecção e tratamento por *Grahamella*, *Anaplasma* e correlacionados. H. Reichenbach, "Taxonomy of the Gliding Bacteria", aponta as propriedades compartilhadas pela maioria das "gliding" incluindo motilidade, taxonomia e importância para a natureza; 122 referências. Gold & col., "Translational Initiation in Prokaryotes", fazem constar importantes referências (152) sobre a natureza dos sítios das ligações ribossomais, sequência e/ou estrutura de determinantes e regulação da transferência. Num dos mais extensos trabalhos deste volume (Bowien & Schlegel - "Physiology and Biochemistry of Aerobic Hydrogen-Oxidizing Bacteria" - 388 citações) estão esmiuçados a fisiologia do crescimento, o metabolismo (autotrofia, mixotrofia), regulação da síntese de enzimas e metabolismo litoautotrófico. Schoth & Hancock compuseram "Selected Topics in Biological Control", onde revêm (113 referências) os conceitos de parasitismo, antibiose, etc, ligados ao controle biológico em fitopatologia. McNabb & Tomasi sintetizam "Host Defense Mechanisms at Mucosal Surfaces" (187 referências), onde abordam a imunidade secretora, proteases IgA, mucinas, lisozima, etc, enquanto que Buchard traz novos aspectos sobre "Gliding Motility of Prokaryotes: Ultrastructure, Physiology and Genetics", com 234 citações. No antepenúltimo artigo, Nester & Kosuge levantaram "Plasmids Specifying Plant Hyperplasias", a doença neoplásica de plantas dicotiledônes (Crown Gall) e outras causadas por bactérias e plasmídios em vegetais. No penúltimo capítulo, Moore (105 referências) aborda "The Biology of Hyphomicrobium and Ohter Prosthecate, Budding Bacteria", discorrendo sobre os gêneros *Hyphomicrobium*, *Pedomicrobium*, *Rhodomicrobium*, entre outros, focando os ciclos vitais e síntese de macromoléculas. A Microbiologia Oral foi aquinhoadas com "Immunobiology of Dental Caries; Microbial Aspects and Local Immunity" de McGhee & Michalek, amplamente documentado (188 referências), figurando a imunidade secretora e a relação *S. mutans* e imunidade local, com perspectivas de uma vacina. Por fim, para conforto dos leitores o volume relaciona, ao final, os títulos dos capítulos publicados nos vols. 31-35.

Leon Rabinovitch
 Deptº de Bacteriologia
 Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz
 Caixa Postal 926
 21040 Rio de Janeiro RJ

Mapes, C.; Guzmán, G. & Caballero, J. - Etnomicología Purepecha: el conocimiento y uso de los hongos en la cuenca de Pátzcuaro, Michoacán. Sociedad Mexicana de Microbiología, Cuadernos de Etnobiología, Serie Etnociencia, 2:1-79, ilust., 1981.

Discussão sobre o conhecimento dos índios Purépecha que vivem no

Vale do Lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. Região de aproximadamente 1.000km², a 2.000 - 3.000 metros de altitude, clima temperado, e período de chuvas bem definido de junho a setembro. A temperatura média anual é de 16°C e a precipitação de 1.000mm de Hg. Os ecossistemas predominantes são os bosques de *Pinus*, mata sub-tropical e pastagens. A vegetação natural se acha bastante alterada pelas práticas agrícolas, pastoris e de extração de madeira.

A região é habitada por 80.000 pessoas das quais 25% são indígenas que se agrupam em 23 comunidades.

A metodologia empregada para o estudo consistiu na observação direta dos fungos no campo, entrevistas com 20 indígenas e 7 comunidades diferentes e a presença de fungos comestíveis no mercado. Fotografias foram mostradas aos índios para ajudar a identificação.

Como resultado, obteve-se 600 espécimes de fungos (2 mixomicetos, 10 ascomicetos, 1 deuteromiceto, 4 líquens e 117 basidiomicetos) que foram depositados no Herbário da ENCB.

Os fungos não são considerados como plantas ou animais e são classificados pelos Purépecha de acordo com habitat, forma, cor, consistência, época de frutificação e utilidade (comestível, medicinal, venenoso ou alucinógeno), resultando 11 grupos de fungos que pertencem a 3 classes.

Foram relacionados 99 nomes populares de fungos, 53 em língua Purépecha e o resto em castelhano. Discute-se também os fungos alucinógenos do gênero *Psilocybe* encontrados nas proximidades mas que não foram identificados pelos índios e que talvez tenham sido usados em cerimônias religiosas e se perderam ou estão em via de extinção. A presença de uma figura lavrada em pedra, adquirida, na região arqueologia, representa uma *Amanita muscaria* em sua fase juvenil. Essa figura pode significar que os Purépecha provavelmente usavam os fungos em ritos e é possível que conhecessem as propriedades tóxicas e alucinógenas desse fungo de ampla distribuição nos bosques de *Pinus* da região.

Conclui-se que os fungos ocupam lugar importante no conhecimento dos Purépecha, que os utilizam principalmente na alimentação, sendo os fungos uma parte importante de um complexo padrão tradicional de subsistência baseada em recursos múltiplos.

O trabalho cita 49 referências, possui algumas ilustrações em branco e preto e é muito interessantes para os etnólogos e micologistas de modo geral.

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

UNDP/WORLD BANK/WHO - Special Programme for Research and Training in Tropical Disease: Annual Report. TDR/AR(5)/81.1-0.V., 1981.

Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais:
Relatório

1. Introdução

Em dezembro de 1976, um plano de ação, cobrindo um período de cinco anos (1977-1981), foi apresentado numa reunião de "Cooperating

Parties", representando governos e agências interessados no desenvolvimento de um novo Programa para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais. Os participantes aprovaram os dois objetivos interrelacionados do programa:

- pesquisa e desenvolvimento de melhores instrumentos para controlar doenças tropicais; e
- treinamento e fortalecimento de instituições para aumentar a capacidade de pesquisa de países tropicais.

A relação de seis doenças - malária, esquistossomose, filariose, tripanossomiases (doenças do sono e de Chagas), leishmaniose e hanseníase - e os objetivos definidos no plano foram também aprovados.

Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais: Resumo do Relatório Anual

Este boletim, o quinto boletim anual, sobre o período de 1/7/1980 a 30/06/1981, descreve os resultados científicos, com sumários dos planos, de maneira a colocar os resultados na perspectiva apropriada.

Seguindo-se a fase inicial de planejamento, mais de 1000 projetos foram iniciados, sendo que 984 foram publicados, descrevendo os resultados de trabalhos financiados pelo Programa.

O fortalecimento da capacidade de pesquisa de países endêmicos está também sendo procurado de forma vigorosa. Através de "grants" institucionais, bolsas de treinamento e outras formas de apoio; instituições em países em desenvolvimento estão, no momento, adquirindo uma maior capacidade de realizar pesquisas relevantes e treinar cientistas de seus próprios países e de vizinhos.

2. Avaliação

O programa continua a emprestar grande ênfase na avaliação em todos os níveis, monitorizando o rendimento de projetos individuais, de cada grupo de trabalho científico, de cada componente e o programa como um todo. Na sua segunda reunião, o Comitê de Assessoria Científica e Técnica (STAC) recomenda que numa revisão detalhada das atividades dos grupos de trabalho, pelos Comitês de Revisão Técnica e Científica, deve operar num ciclo de quatro anos. Com base nesta proposta ocorrerão as seguintes revisões:

1981 - esquistossomose, leishmaniose, controle biológico de vetores
 1982 - Doença de Chagas, Tripanossomíase africana, Ciência biomédica
 1983 - Hanseníase, epidemiologia
 1984 - Malária, Filariose, Pesquisa econômica e social.

A junta coordenadora de direção (JCB) aprovou a recomendação de que, no futuro, um "report" científico de todo o programa não seja preparado anualmente, mas uma vez cada dois anos. Acontecimentos de interesse vital continuarão a ser comunicados aos cientistas e instituições que colaboram com o programa no boletim, que é editado várias vezes cada ano.

3. Pesquisa e desenvolvimento

Durante o período considerado, 199 novos "grants" foram concedidos para pesquisa e desenvolvimento, fazendo um total de 859 "grants" nesta área desde o início do programa.

4. O fortalecimento da capacidade de pesquisa

O objetivo desta área do Programa Especial é assistir os países em desenvolvimento, onde as seis doenças são endêmicas, ao assumir os seus papéis apropriados na pesquisa necessária para identificar, ana-

-lisar, e solucionar os problemas de saúde, causados por estas doenças. As metas e as atividades deste Programa são interdependentes com aquelas da Área de Pesquisa e Desenvolvimento, embora haja diferenças importantes na natureza dos projetos, que são apoiados.

A faixa de atividades tem aumentado rapidamente durante o período relatado e no momento 22 instituições estão recebendo auxílio num sistema a longo prazo, enquanto outras 26 tem recebido num esquema a curto prazo. Além disso, outras instituições estão sendo ajudadas, num sistema a longo prazo, para permitir-lhes a realização de cursos a nível de Mestrado. O auxílio para atividades de treinamento também foi expandido; mais de 210 cientistas receberam "grants" para treinamento individual de pesquisa científica e aproximadamente 40 grupos ligados a atividades de treinamento, num esquema de curta duração, foram auxiliados em países endêmicos. Mais de 100 elementos treinados já retornaram às suas instituições nos países em desenvolvimento, e cerca de um quarto dos mesmos estão sendo ajudados por "grants", para que possam aplicar seus conhecimentos nas situações locais.

Uma das políticas tem sido a promoção técnica entre países em desenvolvimento. A maioria de tais cooperações tem ocorrido através de atividades de treinamento, que possam levar a ligações entre instituições de países em desenvolvimento. Dos 53 cientistas, sustentados por "grants" de treinamento em pesquisa, e para professor visitante entre 1/7/1980 e 30/06/1981, 21 tiveram todo ou a maioria do seu treinamento em países em desenvolvimento (Brasil, Etiópia, Ivory Coast, Quenia, Singapura, Malásia, Venezuela, Zâmbia).

As atividades na área de fortalecimento de capacidade de pesquisa, foram expandidas para fornecer colaboração entre instituições sustentadas, de maneira a formar uma rede de instituições de pesquisa e treinamento em países onde as doenças são endêmicas. Esta perspectiva ampla tem gerado várias estratégias adicionais, que estão agora sendo implementadas. Entre estas estão:

- treinamento em gerência de pesquisa para aqueles cientistas, que desempenham um papel gerencial nos programas de desenvolvimento institucional. Tais treinamentos foram realizados num nível global e planos foram feitos para promover outros a nível regional;
- reuniões de cientistas, que trabalham em países em desenvolvimento, com o propósito de expandir as informações, que não foram ainda formalmente publicadas e para a troca de experiência em desenvolvimento institucional;
- promoção posterior de programa de treinamento e o desenvolvimento do treinamento em países endêmicos
- promoção do desenvolvimento de "research manpower" em instituições com base em planos de longa duração aprovados e explícitos para o desenvolvimento da instituição.

5. Financiamento do programa

Em meados de julho de 1981, 24 governos (incluindo aqueles de sete países em desenvolvimento) e outras organizações, juntamente com a UNDP, o Banco Mundial e a Organização Mundial de Saúde, haviam contribuído com US\$ 80 milhões para o Programa. A direção da junta coordenadora (JCB), o órgão máximo na direção do programa, aprovou um orçamento máximo de US\$ 30.9 milhões para 1981. Esta quantia permitiu ao programa manter seu curso. Entretanto, desde que parece improvável que os fundos disponíveis em 1981 atinjam este montante, a JCB aprovou um plano, em que, em meados de 1981, sob a estimativa de que

os fundos disponíveis para o ano ainda estejam abaixo de US\$ 27 milhões e portanto o orçamento para 1981 foi revisado para US\$ 26.579 milhões.

Durante os primeiros cinco anos de operação, o Programa recebeu uma colaboração notável de cientistas através do mundo e foram criadas expectativas sem precedentes nos países em desenvolvimento. Se as oportunidades científicas agora a nós oferecidas para serem exploradas e as esperanças de um terço da população do mundo devem ser levadas em consideração, o programa exigirá um substancial suporte financeiro solucional.

Paulo Pinto Gontijo Filho
Instituto de Microbiologia UFRJ
Centro de Ciências da Saúde
Bloco I - Ilha do Fundão
21941 Rio de Janeiro RJ

Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia

CONTEÚDO

CONTENTS

Volume 13 Janeiro-Março 1982 Número 1

Sinval M. de Melo Margarida D. M. Camargos & José Noronha Peres	1 Marcadores de virulência de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . I - Provas "in vitro": tipos piocínicos e atividade hemolítica	Markers of virulence of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . I - Tests "in vitro": hemolysin production related to pyocin type
Margarida D. M. Camargos José Noronha Peres & Sinval M. de Melo	6 Marcadores de virulência de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . II - Provas "in vitro": atividade hemolítica e sensibilidade ao cloreto de benzalcônio (CB)	Markers of virulence of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . II - Tests "in vitro" hemolysin titers compared with sensitivity to benzalkonium chloride
Sânia Maria Tauk & Valdemir Gambale	12 Efeitos da agitação, pH, tempo e nutrientes na produção de bio- massa de <i>Candida guilliermondii</i> em meio de vinhaça e melado	Effect of agitation, pH, time and nutrients on biomass pro- duction of <i>Candida guilliermondii</i> in vinasse and molasses media
Roberto M. Yanaguita Carlos Almeida Santa Rosa Raimundo Rolim Rosa & José Giometti	22 Prevalência de aglutininas anti-leptospiras em eqüinos mantidos para produção de soros terapêuticos	The prevalence of leptospiral agglutinins in horses used for therapeutic sera production
Sonia Presa Salzberg Pilar Rodriguez Massaguer & Antônio de Melo Serrano	26 Estudo epidemiológico e micro- biológico de um surto de intoxicação alimentar	Epidemiological and microbiolo- gical studies of an outbreak of food-borne intoxication
Sirdeia M. P. Furlanetto Claudete R. Paula Walderez Gambale & Dirceu do Nascimento	31 Ocorrência de bolores e leveduras em sucos de laranja ao natural	Occurrence of molds and yeasts in natural orange juices
Sérgio O. P. da Costa Maria Christina Bonato & Marisa Bianco	35 Instabilidade do caráter pro- tease (gelatinase) em <i>Proteus</i> <i>mirabilis</i> . I - Estudo de estirpes recém isoladas	Instability of the protease (gelatinase) trait in <i>Proteus</i> <i>mirabilis</i> . I - A study of newly isolated strains
Sérgio O. P. da Costa Maria Christina M. Bonato & Marisa Bianco	46 Instabilidade do caráter pro- tease (gelatinase) em <i>Proteus</i> <i>mirabilis</i> . II - Comportamento de células excretoras e não excretoras de protease na pre- sença de gelatina	Instability of the protease (gelatinase) trait in <i>Proteus</i> <i>mirabilis</i> . II - Behavior of protease-excreting and non-excreting cells in the presence of gelatin
Regina Maria S. T. Decarlis Deise P. Falcão Helga V. L. Maffei & Celso Pavan	50 <i>Yersinia enterocolitica</i> isolada de criança com diarréia crônica, em Botucatu SP	<i>Yersinia enterocolitica</i> isolated from a child with chronic diarrhoea, in Botucatu SP Brazil

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

Volume 13 Abril-Junho 1982 Número 2

José R. P. Olagorta	101	Sistemas de reparos de DNA	<i>DNA repair systems</i>
Jorge Guerrero & Cerli R. Gattas	110	Substâncias imunomoduladoras: visão geral	<i>Immunomodulating substances: an overview</i>
Maria L.C. Rosa & Flávio Alterthum	116	Efeito da nistatina em esferoplastos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> contendo diferentes esteróis incorporados na membrana	<i>The effect of nystatin on spheroplasts of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> containing different sterols incorporated into the plasma membrane</i>
Marcelo Magalhães Mariene de A. Andrade & Gisélia P. da Silva	124	Método simples e econômico para cultivar <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>jejuni</i>	<i>Simple and inexpensive method for culturing <i>Campylobacter fetus</i> Subsp. <i>jejuni</i></i>
Geraldo A.S. Passos Jr. & Tânia M.A.D. Zucchi	126	Incapacidade do β-caroteno de proteger <i>Escherichia coli</i> J-5 da ação letal da luz ultra violeta	<i>Incapacity of β-carotene to protect <i>Escherichia coli</i> J-5 against ultra violet light lethal action</i>
Jan Dirk van Elsas Mônica M. Linhares & Elisa G.C. Penido	131	Características de um novo bacteriófago de <i>Bacillus megaterium</i> com cabeça alongada	<i>Properties of a new <i>Bacillus megaterium</i> bacteriophage with elongated head</i>

Margaretti S. Oliveira Antonio F.P. de Castro Marlene B. Serafim & Manuel A.S.C. Portugal	135	Produção de enterotoxinas e resistência a drogas em colibacilos isolados de suínos com diarréia	<i>Production of enterotoxin and drug resistance among strains of colibacilli isolated from swine diarrhea</i>
Maria R.F. de Toledo Marlene B. Serafim Denise S.P.Q. Horton & Deise P. Falcão	143	Pesquisa de fatores de virulência em <i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Search for virulence factors in Yersinia enterocolitica</i>
Margarida D. M. Camargos José Noronha Peres & Sinval M. de Melo	151	Marcadores de virulência de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . III – Correlação entre provas "in vivo" e "in vitro"	<i>Markers of virulence of Pseudomonas aeruginosa. III – Relation between "in vitro" and "in vivo" tests</i>
Marcelo Magalhães Marlene Andrade & Adelma Véras	156	Uretrites não gonocócicas masculinas associadas a <i>Chlamydia</i> , <i>Ureaplasma</i> e <i>Trichomonas</i>	<i>Male nongonococcal urethritis associated with Chlamydia, Ureaplasma and Trichomonas</i>
José R.S. Chaves Jussara P. do Nascimento & Marguerite Scott Pereira	161	Vigilância de <i>Influenza</i> no Rio de Janeiro: estudo sorológico	<i>Influenza surveillance in Rio de Janeiro: a serological study</i>
Maria T. Martins Laurinda A. Soares Antonia G. Molina & Edda de Rizzo	166	Sensibilidade de diferentes linhagens celulares na detecção de enterovírus humanos presentes em águas	<i>Sensitivity of cell strains for detection of human enteroviruses present in water</i>
Eva Miranda de Souza	173	Estudo de <i>Entamoeba gingivalis</i> em boca de crianças	<i>Study of Entamoeba gingivalis on children's mouth</i>
Célia L. de L.F. Ferreira & Robert Bradley Jr.	180	Determinação de biotina e ácido fólico em iogurte preparado com diferentes culturas starters	<i>Biotin and folic acid determination in yogurt prepared from different starter cultures</i>
Angela M.W. Barreto & Paulo P. Gontijo Filho	187	Crescimento de micobactérias isoladas de solo e de esgoto, em presença de petróleo, diesel e hidrocarbonetos	<i>Growth of mycobacteria from soil and sewage on petrol, diesel and hydrocarbons</i>

VOLUME 13 JULHO-SETEMBRO 1982 NÚMERO 3

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 lengths 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 licheni-</i> <i>formis IOC 2390</i> (ATCC 33632), nova amostra produtora de bacitracina	<i>Bacillus licheni-</i> <i>formis IOC 2390</i> (ATCC 33632), a new bacitracin producer strain
Francisca P. de França & Angela C.D. de Castro	225	Seleção de linha- gens de <i>Aspergil-</i> <i>lus niger</i> para pro- dução de ácido cí- trico	<i>Selection of ci-</i> <i>tric acid produ-</i> <i>cing strains of</i> <i>Aspergillus niger</i>
Maria Regina F. de Toledo Cleuber F. Fontes & Luiz R. Trabulsi	230	MILI - um meio para a realização dos testes de motilida- de, indol e lisina descarboxilase	<i>MILI - a medium</i> <i>for detection of</i> <i>motility, indole,</i> <i>and lysine decar-</i> <i>boxylase</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 toxí- na LT, isoladas de alimentos processa- dos	<i>Escherichia coli</i> strains producing LT toxin isolated from processed food
Hermann G. Schatzmayr Rita Maria R. Nogueira Jorge Antonio Z. Bermu- dez 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 bai- xa renda no Rio de Janeiro	<i>Serological res-</i> <i>ponse to measles</i> <i>vaccine (Schwarz</i> <i>strain) in a low-</i> <i>-income popula-</i> <i>tion at Rio de</i> <i>Janeiro</i>
Ricardo Ishak Warren A. Andiman Maria de Lourdes C. Gomes & Célia M. Nakauth	244	A imunohemadsorção, através de recepto- res Fc, como prova diferencial no iso- lamento de herpeto- vírus	<i>Immunohepatosorp-</i> <i>tion through Fc</i> <i>receptors as a</i> <i>differential rou-</i> <i>tine test in the</i> <i>isolation of her-</i> <i>petovirus</i>
José Ivo Baldani Vera Lúcia D. Baldani Deise F. Xavier Robert M. Boddey & Johanna Döbereiner	250	Efeito da calagem no número de acti- nomicetos e na por- centagem de bacté- rias resistentes à estreptomicina na rizosfera de milho, trigo e feijão	<i>Effect of liming</i> <i>on the number of</i> <i>actinomycetes and</i> <i>on the percentage</i> <i>of streptomycin</i> <i>resistant bacteria</i> <i>in the rhizosphere</i> <i>of maize, wheat</i> <i>and dry beans</i>

Hassan A. Bolkan José C. Dianese Cláudio B. da Silva & José Cristina B. de Araújo	264	Influência da fonte de carbono, luz, potencial hídrico e temperatura sobre crescimento e espor- ulação de <i>Fusarium</i> <i>moniliforme</i> var. <i>subglutinans</i>	<i>Influence of car- bon source, light, water potential and temperature on growth and sporu- lation of <i>Fusarium</i> <i>moniliforme</i> var. <i>subglutinans</i></i>
Aida Luiza L. dos Santos & João Lúcio de Azevedo	272	Resistência do fun- go entomopatogênico <i>Metarrhizium aniso-</i> <i>pliae</i> em relação a três fungicidas	<i>Resistance of the entomopathogenic fungus <i>Metarrhizium</i> <i>anisopliae</i> to three fungicides</i>
Selma G.F. Leite & Francisca P. de França	279	Influência de dife- rentes fontes de nitrogênio no cres- cimento de <i>Chlorel- la homosphaera</i>	<i>The influence of different nitrogen sources in growth of <i>Chlorella ho- mosphaera</i></i>
Octávio A.C. Pereira & Rosa Maria Silva	291	Vacinação oral anti- <i>Propionebacterium</i> <i>acnes</i> : avaliação por níveis de anti- corpos séricos	<i>Anti <i>Propionebac- terium acnes</i> oral vaccination: evalua- tion based on levels of seric antibodies</i>
Luiz R. Trabulsi Neusa P. Silva & Lilian R.M. Marques	297	Atividade comparada da cefoperazona e cinco cefalospori- nas frente a 628 amostras de entero- bactérias, <i>Pseudomo-</i> <i>nas</i> e <i>Staphylococcus</i>	<i>Comparative acti- vity of cefopera- zone and five other cephalospo- rine against 628 strains of Entero- bacteriaceae, <i>Pseudomonas</i> and <i>Staphylococcus</i></i>

VOLUME 13 OUTUBRO-DEZEMBRO 1982 NÚMERO 4

Maria Regina F. de Toledo Cleuber F. Fontes & Luiz R. Trabulsi	309	EPM - Modificação do Meio de Rugai e Araú- jo para a realizaçāo simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H_2S , urease e tript- ofano desaminase	<i>EPM - a modifi- cation of Rugai and Araujo me- dium for simul- taneous test of gas production from glucose, H_2S, urease and tryptophan dea- minase</i>
Anastácio F. Morgado João Paulo B. Hidebrandt Tania M. Loes Hermann G. Schatzmayr & Szacha E. Cynamon	316	Surto epidêmico de hepatite A associado com uso da água contaminada	<i>An outbreak of hepatitis A ap- parently asso- ciated with use of contaminated water</i>

Maria de Lourdes M. da Silva Norma P.F. Severo Rosana Puccia Laura L.P. Costa & Luiz R. Trabulsi	325 Lisogenia entre amostras de <i>E. coli</i> entero-patogênicas isoladas em São Paulo, entre 1963 e 1981	<i>Lysogene among enteropathogenic E. coli strains isolated in São Paulo between 1963 and 1981</i>
Anete Levi & Ilvan D. Ricciardi	332 <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>jejuni</i> (<i>C. jejuni</i>): isolamento e caracterização de amostras obtidas em galinhas, na cidade do Rio de Janeiro	<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>jejuni</i> (<i>C. jejuni</i>): identification of strains isolated from chickens in Rio de Janeiro
Maria Elisabeth B. Margutti & Fernando S. da Cruz	335 Crescimento de <i>Fonsecaea pedrosoi</i> em meio quimicamente definido	<i>A minimum chemical defined medium for growing Fonsecaea pedrosoi</i>
Leslie C. Benchethrit Armando A. Borges-Neto Ignácio Obadia Myrthes A. Gonzaga Richard R. Facklam & Lúcia M. Teixeira	347 Impetigo no Rio de Janeiro: estreptococos e estafilococos isolados de lesões cutâneas, nariz e garganta de crianças	<i>Impetigo in Rio de Janeiro: Streptococcal and Staphylococcal isolates from skins lesions, nose and throat in children</i>
Luiz Carlos D. Formiga Katia Regina N. dos Santos Hebe A.C. Rodrigues & Susie A. Nogueira	355 Avaliação do teste de fluorescência, em portadores cutâneos de <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	<i>Evaluation of the fluorescence test in cutaneous carriers of Corynebacterium diphtheriae</i>
Lucila C. Ricci Antonio F.P. de Castro & Humberto de A. Rangel	359 Purificação da enterotoxina termo-estável (ST) de <i>Escherichia coli</i>	<i>Purification study thermostable (ST) enterotoxin of Escherichia coli</i>
Lucila C. Ricci Antonio F.P. de Castro & Humberto de A. Rangel	367 Características físicas e químicas da enterotoxina termoestável (ST) de <i>Escherichia coli</i>	<i>Physical and chemical characteristics of thermostable enterotoxin (ST) of Escherichia coli</i>

Augusto F. da Eira	378 Tratamento de efuentes da indústria de chapas de fibras da madeira com fungos micelianos. I - Seleção das linhagens e determinação das temperaturas de incubação	<i>Mycelial fungi for fiberboard wastewater treatment. I - Selection of strains and determination of incubation temperatures</i>
Rita de C. Salomão & Adhemar Purchio	394 Atividade de substâncias de origem vegetal na inibição do crescimento e na produção de aflatoxinas por <i>Aspergillus flavus</i> e <i>A. parasiticus</i>	<i>Activity of extract of plants in the inhibition of growth and aflatoxin production of Aspergillus flavus and A. parasiticus</i>
Deise P. Falcão Betty Maria de Lima Elizeth Marini & Mário T. Shimizu	402 Resistência a drogas em enterobactérias isoladas de alimentos	<i>Resistance to drugs of Enterobacteria isolated from food products</i>
Sonia P. Salzberg & Fumio Yokoya	412 Característica de crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> S50 pigmentado e suas variantes não pigmentadas	<i>Growth characteristics of the pigmented strain <i>Staphylococcus aureus</i> S50 and its non pigmented derivatives</i>
José S. Goldoni Urgei de A. Lima & Ismael Antonio Bonassi	418 Estudo microbiológico da fermentação lática com algumas hortaliças	<i>Microbiological study of lactic acid fermentation with some vegetables</i>
José S. Goldoni & Aparecida A. da Silva	433 Estudo microbiológico da produção de chucrute com repolho 'Matsukase' (<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>capitata</i> L.)	<i>Microbiological study of sauerkraut production with cabbage's cultivar 'Matsukase' (<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>capitata</i> L.)</i>

