

Revista de Microbiologia

Regina



SBM

Sociedade
Brasileira de
Microbiologia

São Paulo — Brasil

Volume 14 Número 3 Jul.-Set. 1983

Instruções aos autores

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

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

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

A Revista segue, essencialmente, o "Style Manual Biological Journals" (2^a edição, AIBS, 1964). Os símbolos genéticos devem seguir, essencialmente, as recomendações de Demerec & col. (Genetics, 54:61, 1966). Abreviações bioquímicas devem seguir, essencialmente, as regras de IUPAC-IUB (J. Biol. Chem., 241:527, 1966). Atividade enzimática deve ser expressa em termos de unidades internacionais (Enzyme Nomenclature, Elsevier Publ. Co., 1965). Para pesos e volumes, devem ser usados os prefixos nano (n) e pico (p), ao invés de milímicró ($m\mu$) micromícromo ($\mu\mu$). Comprimentos devem ser expressos em micrômetro (μm ; $10^{-6}m$), ao invés de micro (μ); nanômetro (nm; $10^{-9}m$), ao invés de milímicró ($m\mu$); e Angströms (\AA ; $10^{-10}m$). Partes por milhão (ppm) devem ser expressas como microrganismos por milímetros ($\mu g/ml$) ou microlitros por litro (μl 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 e espanhol, de um título e resumo em inglês. O resumo na língua do trabalho e o título com resumo na outra língua devem ser datilografados em página separada do restante do texto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS — No texto, as referências devem ser citadas por número. Os sobrenomes de dois autores devem ser separados por & quando houver mais de dois autores, a separação é feita por um ponto 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 do trabalho, nome do periódico (abreviado de acordo com o World Medical Periodicals), número do volume, número do fascículo (quando desejado; colocado entre parênteses), número da primeira e da última página do artigo, e ano da publicação.

Exemplo:

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

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

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

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

Citações de "resumos", "dados não publicados", "comunicações pessoais" ou "no prelo" pode-ão 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 normógrafo. As fotografias de ilustrações a traço devem ser feitas em papel de alto contraste apropriado. É recomendável submeter gráficos e desenhos no dobro da impressão final da Revista, prevendo-se todos os elementos da figura para as escalas de redução. Fotografias com reticulas devem ser feitas em papel brilhante, com contrastes adequado para a reprodução na escala 1:1, observados os espaços máximos disponíveis na Revista e seus submúltiplos, reservando-se espaço suficiente para a legenda. Sempre que houver escala de aumento ou redução, esta deverá ser superposta ou desenhada diretamente na fotografia ou figura. Ver instruções sobre legendas, notas de rodapé, etc. sob TABELAS. Proteja as ilustrações durante o trânsito, com uma folha de papelão.

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.



Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo — Brasil

Conselho Diretor	Luiz Rachid Trabulsi, Italo Suassuna e Wilson Chagas de Araujo	<i>Pertence à</i> REVISTA DE MICROBIOLOGIA - SBM Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 Cid. Universitária - USP 05508-900 — São Paulo/SP
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\$ 9.000,00 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 Gontijo Filho Instituto de Microbiologia UFRJ Centro de Ciências da Saúde Bloco I — Ilha do Fundão 20000 Rio de Janeiro RJ	Tesoureiro Milton Mangini 01000 São Paulo SP
Objetivos	A Sociedade Brasileira de Microbiologia, fundada em 28 de setembro de 1956, é sociedade civil, sem fins lucrativos, dedicada a agrupar microbiologistas brasileiros; a promover o desenvolvimento da microbiologia através do estímulo à pesquisa científica e suas aplicações, melhorar as qualificações profissionais dos microbiologistas; e manter intercâmbio e fazer aproximação com entidades que visem objetivos semelhantes. Organiza, a cada dois anos, na última semana do mês de julho, o Congresso Brasileiro de Microbiologia e edita a Revista de Microbiologia, com distribuição trimestral. Para informações sobre a SBM, escrever para qualquer membro da Diretoria.	

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

A Sociedade Brasileira de Microbiologia recomenda que seus associados prestigiem os sócios patrocinadores da Revista de Microbiologia:

Biolab-Mérieux Produtos para Laboratórios Ltda.

Coca-Cola Indústrias Ltda.

Companhia Industrial e Comercial Brasileira de Produtos Alimentares
Eli Lilly do Brasil Ltda.

Embrabio - Empresa Brasileira de Biotecnologia Ltda.

Indústria Química e Farmacêutica Schering S.A.

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

Rhodia S.A.

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
Dept. de Microbiologia - ICB II - USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 - Cid. Universitária
CEP 05508-900 - São Paulo - SP - BRASIL
Site: www.revmicro.qb.net

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA
VOLUME 14 JULHO-SETEMBRO 1983 NÚMERO 3
REV. MICROBIOL. (S. PAULO), 14(3)

	CONTEÚDO	CONTENTS
Maria Lúcia Rácz José Alberto Neves Candeias & Edna Lilian Lira Capeletti	157 Definição de soros padrões brasileiros para a pesquisa de anticorpos contra a rubéola	<i>Definition of Brazilian Standard sera for titration of rubella antibodies</i>
Maria de Lourdes Monteiro da Silva Isabel C. Affonso Scaletsky & Lúcia Helena Viotto	161 Ausência de produção de citotoxina entre amostras enteropatogênicas de <i>Escherichia coli</i> isoladas em São Paulo, Brasil	<i>Non production of cytotoxin among enteropathogenic strains of <i>Escherichia coli</i> isolated in São Paulo, Brazil</i>
Luis Antonio Mathias Dilermando Perecim & Aramis Augusto Pinto	163 Análise quantitativa de três provas sorológicas utilizadas no diagnóstico da brucelose bovina: comparação entre animais não vacinados e animais vacinados com <i>B. abortus</i> amostra B19	<i>Quantitative analysis of three serological tests utilized in the diagnosis of bovine brucellosis: comparison between unvaccinated cattle and <i>Brucella abortus</i> strain 19 vaccinated cattle</i>
Luiza Helena da Silva Melo Cavalcanti Ricardo Fernandes Maia Edeltrudes de Oliveira Lima & Lauro Xavier Filho	168 Atividade anti-microbiana "in vitro" da atranorina	<i>In vitro antimicrobial activity of atranorine</i>
Luiz Carlos Duarte Formiga Thereza Cristina Ferreira Camello Ana Luiza de Mattos Guaraldi Lylian Badaue de Almeida Rangel & Angela Cristina F.C. Blois de Assis	172 Teste de fluorescência e pesquisa da atividade pirazina-carboxilamidase (Pyz) na identificação do bacilo diftérico atoxinogênico	<i>The U.V. fluorescence test and the pyrazin carboxylamidase activity as screening tests for identifying the non-toxigenic diphtheria bacilli</i>
Ernesto Hofer	174 Primeiro isolamento e identificação de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> no Brasil de infecção gastrointestinal humana	<i>The first isolation and identification of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> from human gastrointestinal infection in Brazil</i>

Claudia E.O. Pires de Campos Regina M.S. Tosoni Decarlis & Evanil Pires de Campos	176	Aspectos microbiológicos de bactérias isoladas de pacientes com infecções pulmonares agudas tratadas pela tobramicina	<i>Microbiological features of bacterial infection of lung from patients treated by tobramycin</i>
Maria Eunice Mônaco Furletti & Alcides Serzedello	183	Determinação de carboidratos em micélio de <i>Rozites gongylophora</i>	<i>Determination of carbohydrates in mycelium of Rozites gongylophora</i>
Angela Maria Werneck & Paulo Pinto Contijo Filho	187	Quantificação na degradação de heptadecano e hexadecano por micobactérias através da cromatografia líquido-gasosa	<i>Gas-liquid chromatography quantification of heptadecan and hexadecan degradation by mycobacterias</i>
Luiz Antonio Graciolli José Renato de Freitas & Alaides Puppin Ruschel	191	Bactérias fixadoras de nitrogênio nas raízes, caules e folhas de cana-de-açúcar (<i>Saccharum</i> sp.)	<i>Nitrogen fixing bacteria isolated from roots, stems and leaves of sugarcane (<i>Saccharum</i> sp.)</i>
Maria Cristina Dantas Vanetti Daison Olzany Silva & Arnaldo Chaer Borges	197	Caracterização, teor proteico e aminoácidos essenciais de quatro culturas de <i>Bacillus</i> isoladas de vinhaça represada	<i>Characterization, protein and essential aminoacids contents of four isolates of <i>Bacillus</i> from distillery slops pond</i>
Armando Augusto Henriques Vieira	202	Purificação de culturas do fitoplâncton com solução de Dakin	<i>Purification of phytoplankton cultures with Dakin's solution</i>
Walderez Gambale Adhemar Purchio & Claudete Rodrigues Paula	204	Influência de fatores abióticos na dispersão aérea de fungos na cidade de São Paulo, Brasil	<i>Action of abiotic factors on airborne fungi in the city of São Paulo, Brazil</i>
Maria das Graças Silva Yascai Kassai Moreira & Eduardo Osório Cisalpino	215	Flora fúngica do ar e do piso no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil	<i>Fungic flora in the air and floor at the "Hospital das Clínicas" of the Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil</i>
Informação Técnico-Científica SBM	223		

DEFINIÇÃO DE SOROS PADRÕES BRASILEIROS PARA A PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA A RUBÉOLA

Maria Lúcia Rácz
 José Alberto Neves Candeias
 & Edna Lilian Lira Capeletti

Deptº de Microbiologia
 Instituto de Ciências Biomédicas USP
 Setor de Saúde Pública
 Av. Dr. Arnaldo, 715
 01255 São Paulo SP, Brasil

Resumo

Definem-se dois soros padrões brasileiros para a conversão dos títulos inibidores da hemaglutinação para a rubéola em Unidades Internacionais, usando um soro padrão inglês, com vistas à uniformização dos resultados e sua comparabilidade, entre diferentes laboratórios.

Summary

Definition of Brazilian Standard sera for titration of rubella antibodies

To obtain an adequate reproducibility and uniformity in titration of anti-rubella antibodies by different laboratories, two Brazilian Standard sera are established, by comparison with a British Standard anti-rubella serum. They are suitable for converting titers of hemagglutination-inhibition antibodies to International Units per milliliter (IU/ml).

Introdução

A reação da inibição da hemaglutinação é o teste sorológico mais usado no diagnóstico de infecções pelo vírus da rubéola e na determinação prévia do estado imunitário, com vistas à vacinação.

A multiplicidade de variações introduzidas pelos diferentes laboratórios, na reação da inibição da hemaglutinação, possibilita a ocorrência de erros de interpretação dos resultados, o que no caso particular da rubéola adquire especial importância. Considerando a necessidade de dispor-se de informações precisas, tanto do ponto de vista do diagnóstico, quanto da epidemiologia da doença e, conhecida como é, a eficácia da vacinação, torna-se óbvia a necessidade de padronizar a reação da inibição da hemaglutinação, recomendando-se o uso rotineiro de tal técnica padronizada, para que os diversos resultados obtidos possam ser comparados (5, 7).

Para a confirmação de infecções recentes, através do aumento do título de anticorpos em duas amostras de soro, colhidas com intervalo apropriado, é essencial que os dois soros sejam testados simultaneamente. Neste caso, o valor absoluto do conteúdo de anticorpos assume menor valor, mas podem surgir problemas de interpretação quando os soros são testados em dias diferentes ou em diferentes laboratórios (8). Na determinação do estado imunitário, cada laboratório considera como título significativo mínimo, valores que variam conforme a sensibilidade da técnica utilizada.

Para contornar tais inconvenientes, têm sido feitas tentativas no sentido de considerar que o conteúdo de anticorpos anti-rubéola de um soro seja expresso não no título de anticorpos inibidores da hemaglutinação, mas em Unidades Internacionais por mililitro (1, 8), o que se pode conseguir, comparando os soros a serem testados com um soro padrão, de potência conhecida (UI/ml).

O objetivo do presente trabalho é estabelecer um soro anti-rubéola, com potência conhecida, que possa ser utilizado com soro padrão pelos laboratórios brasileiros que executam testes sorológicos para rubéola.

Material e Métodos

Soros padrões brasileiros (ICB 01/82 e ICB 02/82) - Foram utilizados para o preparo do soro anti-rubéola ICB 01/82, 60 soros, selecionados de um total de 10.360 soros testados qualitativamente para determinação do grau de imunidade para rubéola em professoras da rede municipal de ensino de São Paulo. Todos os soros escolhidos foram testados quantitativamente pela reação de inibição da hemaglutinação, apresentando títulos com valores iguais ou maiores do que 128. Para o preparo do soro anti-rubéola ICB 02/82, foram selecionados 700 soros, deste mesmo total, testados apenas na diluição 1:16, apresentando títulos de anticorpos iguais ou maiores que 16. A mistura destes soros foi filtrada em membrana Millipore de 0,22 μ m, distribuída em volumes de 1ml e liofilizada, resultando em 30 frascos do soro anti-rubéola ICB 01/82 e 500 frascos do soro ICB 02/82. Após liofilização, cada aliquote foi estocada a -20°C, ao abrigo da luz. De cada vez que foram testados, os soros padrões foram reconstituídos com 1ml de água destilada esterilizada.

Soro padrão inglês (69/60) - Foi utilizado um soro padrão (The 1st British Standard for anti-rubella serum, 69/60, 1975) contendo 360UI por ampola (3) (Recebido do National Biological Standard Board, Londres). O conteúdo de cada ampola foi reconstituído com 1ml de água destilada esterilizada, resultando então em uma solução contendo 360UI/ml. Após a reconstituição, este soro padrão foi distribuído em volumes de 0,1ml e as aliquotas congeladas a -70°C.

Reação de inibição da hemaglutinação - Esta reação foi realizada segundo técnica padronizada pelo "Center for Disease Control" (2). Em resumo, a técnica utiliza o tratamento do soro a testar com heparina e cloreto de manganês, para retirada dos inibidores inespecíficos da hemaglutinação, seguindo-se a microtitulação em placas "V" (Cooke Engineering Co.), com 4 unidades hemaglutinantes de antígeno (Flow Laboratories Inc., Rockville, USA). Foram utilizadas na reação, hemácia de porco, na concentração de 0,25%, em tampão HEPES - salina-albumina-gelatina (HSAG) pH 6,2. O título do soro foi considerado como a reciproca da maior diluição do soro que inibe a hemaglutinação. Inicialmente, o soro padrão inglês (69/60) e os soros padrões brasileiros (ICB 01/82 e ICB 02/82) foram titulados em triplicata, com fator de diluição 2, nas diluições de 1:8 até 1:2048. Dada a amplitude do intervalo entre as diluições utilizadas com fator 2, a titulação dos 3 soros foi repetida, em 3 séries, a partir das diluições iniciais 1:100, 1:102 e 1:104, com fator de diluição 1,1. As diluições foram realizadas em tubos e transferidas para as microplacas, seguindo-se procedimento normal da reação de inibição da hemaglutinação. A titulação foi repetida em triplicata, em cada uma das séries (Tabela 1) em 3 dias diferentes (testes n°s 1, 2 e 3).

Resultados

Os títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação obtidos com o soro padrão inglês 69/60 e com os soros padrões brasileiros ICB 01/82 e ICB 02/82 usando-se o fator de diluição 2, a partir da diluição inicial 1:8, foram respectivamente 256, 256 e 128.

O resultado da titulação destes mesmos soros fator de diluição 1,1, a partir das diluições 1:100, 1:102 e 1:104 estão contidos na Tabela 2.

Considerando-se a média geométrica (G) dos títulos obtidos, em triplicata, nas três séries e a potência do soro padrão inglês 69/60 de 360UI/ml, os títulos dos soros ICB 01/82 e ICB 02/82 em UI/ml serão, respectivamente, 243 e 174, valores estes obtidos pela fórmula $Pt = GTt \times G(Pp/Tp)$, onde Pt é a potência do soro a testar, Tt o título inibidor da hemaglutinação do soro a testar, Pp a potência do soro padrão e Tp o título inibidor da hemaglutinação do soro padrão (8).

Discussão

Em vários estudos a respeito da reação de inibição da hemaglutinação para rubéola, verificou-se que a expressão do conteúdo de anticorpos na forma de título leva a uma grande discrepância entre os resultados obtidos (1, 8).

Um dos estudos demonstra que a reprodutibilidade entre laboratórios diferentes é grandemente melhorada quando os soros a testar são comparados com um soro controle de título conhecido (8). Como os soros padrões disponíveis têm seu conteúdo de anticorpos anti-rubéola expressos em Unidades Internacionais por mililitro, a potência dos soros controle e teste, deve ser expressa da mesma forma.

Dada a dificuldade em se conseguir, em nosso meio, soros padrões internacionais, o presente trabalho definiu, por comparação com um soro padrão inglês, com uma potência de 360UI/ml, dois soros padrão anti-rubéola, os quais mostram ter as seguintes potências: ICB 01/82 = 243UI/ml e ICB 02/82 = 174UI/ml.

Este soro padrão deve ser titulado em triplicata, exigência não estabelecida para os soros da prova. Uma vez obtidos os resultados em título de anticorpos inibidores à hemaglutinação, a conversão para UI/ml pode ser realizada através de um método simplificado de cálculo (8), facilitado por dispensar a determinação da média geométrica dos títulos do soro padrão.

Assim, todos os laboratórios que executam reação sorológica para rubéola têm a possibilidade de fornecer resultados expressos em potência (UI/ml), o que diminui sensivelmente a discrepância entre resultados de laboratórios diferentes e mesmo entre resultados do mesmo laboratório, provenientes de reações executadas em dias diferentes. Além disso, os laboratórios podem definir seus resultados em relação ao valor de 15UI/ml, nível mínimo atualmente aceito como indicativo de imunidade para a rubéola (4, 6).

Tabela 1 - Série de diluições com fator 1,1 a partir das diluições iniciais 1:100, 1:102 e 1:104

Diluições iniciais	Série de diluições com fator 1,1
Série 1 1:100	110 121 1083
Série 2 1:102	112 123 1105
Série 3 1:104	114 126 1126

Tabela 2 - Títulos dos anticorpos inibidores da hemaglutinação para diluições dos soros com fator 1,1.

Símbolos: G = média geométrica

Soros	Teste Nº	Títulos UI						G
		Série 1 1:100		Série 2 1:102		Série 3 1:104		
69/60	1	380	380	380	387	387	387	326
	2	345	345	345	320	320	320	359
	3	314	314	314	320	320	320	326
ICB 01/82	1	285	285	285	291	291	291	223
	2	214	214	214	219	219	240	245
	3	195	195	195	181	181	181	245
ICB 02/82	1	236	236	236	199	219	199	126
	2	161	146	146	149	149	149	167
	3	146	161	161	149	149	149	167

Referências Bibliográficas

1. Bradstreet, C.M.P.; Kirkwood, B.; Pattinson, J.R. & Tobin, J.O. - The derivation of a minimum immune titre of rubella haemagglutination-inhibition (HI) antibody: a Public Health Laboratory Service collaborative survey. *J. Hyg. (Camb.)*, 81:383-388, 1978.
2. Center for Disease Control - Standard rubella hemagglutination inhibition test. Atlanta, GA, 1970.
3. Clarke, M.; Dudgeon, J.A.; Ferris, R.; Colinet, G.; Tate, H. & Perkins, F.T. - The British Standard for anti-rubella serum. *J. Biol. Standard*, 3:151-161, 1975.
4. Kurtz, J.B.; Mortimer, P.P.; Mortimer, P.R.; Morgan-Capner, P.; Shafi, M.S. & White, G.B.B. - Rubella antibody measured by radial haemolysis: characteristics and performance of a simple screening method for use in diagnostic laboratories. *J. Hyg. (Camb.)*, 84:213-222, 1980.
5. Lennette, H.H. & Schmidt, H.J. - Principles and performance of rubella hemagglutination inhibition test. Chicago, American Society of Clinical Pathologists, 1973.
6. Mortimer, P.P.; Edwards, J.M.B.; Porter, A.D.; Tender, R.S.; Mace, J.E. & Hutchinson, A. - Are many women immunized against rubella unnecessarily? *J. Hyg. (Cam.)*, 87:131-138, 1981.
7. Palmer, D.F.; Herrmann, K.L.; Lincoln, R.E.; Hearn, M.V. & Fuller, J.M. - A procedural guide to performance of the standardized rubella hemagglutination-inhibition test. Atlanta, GA, Center for Disease Control Immunity Series nº 2, 1970.
8. Public Health Laboratory Service Standing Advisory Committee on Viral Reagents - Hemagglutination-inhibition test for the detection of rubella antibody. *J. Hyg. (Camb.)*, 81:373-382, 1978.

NON PRODUCTION OF CYTOTOXIN AMONG ENTEROPATHOGENIC STRAINS OF *ESCHERICHIA COLI* ISOLATED IN SÃO PAULO, BRASIL

Maria de Lourdes Monteiro da Silva
Isabel C. Affonso Scaletsky
& Lúcia Helena Viotto

Deptº de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia
Escola Paulista de Medicina
Caixa Postal 20342
01000 São Paulo SP, Brasil

Summary

Production of a toxin which affects Vero cells was not observed among 186 enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated in São Paulo. The same was observed concerning 23 strains of *E. coli* belonging to serotype 0128ac that produced thermo-stable enterotoxin. The results suggest that this toxin is not the mechanism of virulence of the strain studied.

Resumo

Ausência de produção de citotoxina entre amostras enteropatogênicas de *Escherichia coli* isoladas em São Paulo, Brasil.

Produção da toxina que afeta células Vero não foi observada entre 186 amostras de *Escherichia coli* enteropatogênicas clássicas isoladas em São Paulo. O mesmo ocorreu em relação a 23 amostras de *E. coli* produtoras de toxina termo-estável pertencentes ao sorogrupo 0128ac. Os resultados sugerem que aquela toxina não é o mecanismo de virulência das amostras estudadas.

Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) are the most common cause of infantile diarrhea in many developing countries. In São Paulo in 1978 and 1979 these bacteria accounted for about 30% of the cases of acute endemic diarrhea in children under 6 months of age, of low socio-economic level (Toledo & col., Infect. Immun., 39:586-589, 1983). They belong to specific serogroups and in Brazil the most frequent are: 026, 055, 086, 0111, 0119, 0125, 0126, 0128ab and 0142. Among these, serogroups 0111 and 0119 are isolated with higher frequency (Toledo, M.R.F. & col., Infect. Immun., 39:586-589, 1983). Strains of serogroup 0128ac produce ST toxin and are considered enterotoxigenic (Reis, M.H.L. & col., Infect. Immun., 24:289-290, 1979).

The mechanism of virulence of enteropathogenic strains has not been established. Some serogroups were described as producing a cytotoxin (Vero toxin) which affects Vero cells (African green monkey kidney) (Konowalchuk, J. & col., Infect. Immun., 18:775-779, 1977).

The objective of this work was to verify whether Vero toxin (VT) is produced by EPEC strain isolated in São Paulo, Brazil. VT is a heat-labile cytotoxin that occurs in culture filtrates and affects Vero cells producing an effect different from that of LT toxin. Among 136 strains studied this toxin was found in ten

strains belonging to serogroups 018, 026, 068, 0111, 0126, 0128 and 0138 (Konowalchuk, J. & col., Infect. Immun., 18:775-779, 1977). The properties of Vero toxin were described by the same author (Konowalchuk, J. & col., Infect. Immun., 20:575-577, 1978).

A hundred and eighty-six EPEC strains belonging to different serotypes of serogroups 026, 055, 086, 0111, 0119, 0125, 0126, 0127, 0128 and 0142 were studied (Table 1). Twenty-three enterotoxigenic strains (ST^+) of serotype 0128ac were also studied. The positive control for VT test *E. coli* H30 was supplied by Dr. J. Konowalchuk and *E. coli* 711 was used as negative control.

The technique used was modified from that described by Konowalchuk & col. (Konowalchuk, J. & col., Infect. Immun., 18:775-779, 1977). Bacterial cultures were grown in test tubes containing 4ml of trypticase soy broth (Oxoid) mechanically shaken for 20h at 37°C. An amount of 1,5ml were then centrifuged at 14.000rpm during 6 min. The supernatants were filtered through 0,45mm membrane filters (Millipore Corp.) and assayed. Vero cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco Laboratories) containing 25mM HEPES Buffer (Gibco Laboratories), 0,1% gentamicin and 10% fetal calf serum. Maintenance of the cell cultures was done as described by Speirs & col. (Speirs, J.I. & col., Infect. Immun., 16:617-622, 1977). Toxin activity was assayed in 96-well tissue culture plates (Costar, Cambridge, MA) with 0,25ml of cell culture per well. The plate was prepared with a suspension of 100,000 cells/ml one day before use. For the test, 0,025ml of the undiluted bacterial filtrate was added to each well. The plate was incubated at 37°C and observed daily for five days. In each plate TSB was included as the medium control and *E. coli* H30 and 711 as positive and negative toxin controls. The cells affected by VT appear shriveled, many of them floating in the medium. A hundred percent of the cells exposed to *E. coli* H30 supernatants showed cytotoxic effect after 2-3 days.

All the 186 EPEC strains were negative for Vero toxin production. The same occurred with the 23 0128ac ST^+ strains.

Studying 253 EPEC strains of serogroups 018, 026, 055, 0111, 0114, 0119, 0125, 0126, 0127, 0128 and 0142, Scotland & col. (Scotland, S.M. & col., FEMS Microbiol. Lett., 7:15-17, 1980) found 25 strains VT^+ . Twenty strains belonged to serotype 026:H11, 3 were 026:H⁻ and 2 were 0128:H2. On the other hand, Johnson & col. (Johnson, W.M. & col., Lancet, 1:76, 1983) studied over 2.000 *E. coli* strains isolated from diarrhoeal patients and found 78 strains VT^+ . Seventy per cent of the VT^+ strains had the serotype 026:K60:H11 and 9% were 0157:H7. Some of the 0157:H7 strains were associated with haemorrhagic colitis.

The literature and results of this work suggest that the production of Vero toxin is exclusive of some serotypes, mostly 026:H11. The only strain of this serotype studied was negative. The same occurred with the strain 0128ab:H2 whereas strains of serogroup 0157 have not been isolated in São Paulo in cases of diarrhea. Our conclusion is that Vero toxin is not the mechanism of virulence of the EPEC strains studied.

Acknowledgement

We thank J. Konowalchuk for kindly supplying the strain *E. coli* H30. This work was supported by IV Plano Integrado de Genética grant 40.2530/82 from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and Financiadora de Estudos e Projetos.

Table 1 - List of enteropathogenic serogroups and serotypes studied

Sero-group	Sero-type	No. of Strains
026	026:H ⁻	3
	026:H11	1
055	055:H ⁻	4
	055:H6	6
	055:H7	2
	055:H11	1
	055:HNT	9
086	086:H8	1
	086:H34	1
0111	0111:H ⁻	37
	0111:H2	42
	0111:H6	1
	0111:H9	2
	0111:H25	1
	0111:HNT	1
0119	0119:H2	1
	0119:H6	21
	0119:HNT	28
0125	0125:H ⁻	5
	0125:H6	1
0126	0126:H20	1
0127	0127:HNT	1
0128ab	0128ab:H2	1
	0128ab:H35	5
	0128ab:HNT	1
0142	0142:H ⁻	1
	0142:H2	5
	0142:H6	2
	0142:HNT	1
Total		186

ANÁLISE QUANTITATIVA DE TRÊS PROVAS SOROLÓGICAS UTILIZADAS NO DIAGNÓSTICO DA BRUCELOSE BOVINA: COMPARAÇÃO ENTRE ANIMAIS NÃO VACINADOS E ANIMAIS VACINADOS COM *B. ABORTUS* AMOSTRA B_{19}

Luis Antonio Mathias

Deptº de Higiene Veterinária e Saúde Pública
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal UNESP
Campus de Jaboticabal
14870 Jaboticabal SP, Brasil

Dilermando Perecim

Deptº de Ciências Exatas
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal UNESP

& Aramis Augusto Pinto

Deptº de Microbiologia
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal UNESP

Resumo

Avaliação da correlação (associação) entre os resultados obtidos por provas de Soro-aglutinação Rápida em placa (SAR), Fixação do Complemento (RFC') técnica 50% de hemólise e Antígeno Acidificado Tamponado (PAAT). Foram utilizados 119 soros sanguíneos de bovinos não vacinados contra a brucelose e pertencentes a um rebanho naturalmente infectado e 100 soros de bovinos vacinados com *B. abortus* amostra B_{19} . A análise estatística, pela obtenção do coeficiente de correlação e da equação da reta entre escores, revela que não há concordância perfeita entre as três provas analisadas, sendo que a concordância foi menor no grupo de animais vacinados. Entre os animais naturalmente infectados, os títulos fixadores de complemento foram mais altos que os observados entre os animais vacinados.

Summary

*Quantitative analysis of three serological tests utilized in the diagnosis of bovine brucellosis: comparison between unvaccinated cattle and *Brucella abortus* strain 19 vaccinated cattle*

Evaluation of the correlation (association) among the results obtained by Plate Agglutination Test (PAT), Complement Fixation Test (CFT) 50 per cent hemolytic end point technique, and Rose Bengal Plate Tests (RBPT). One hundred and nineteen serum samples collected from unvaccinated cattle belonging to a naturally infected herd

and 100 serum samples from *B. abortus* strain B₁₉ vaccinated cattle were utilized. The results were analyzed by utilizing correlation coefficient and linear regression among scores, which led to the conclusion that there was no perfect agreement among the three analyzed tests and that the agreement was minor in sera from vaccinated cattle. Among cattle naturally infected the complement fixing antibody titers were higher than the observed among vaccinated cattle.

Introdução

Um dos entraves à utilização de provas sorológicas para o diagnóstico da brucelose bovina tem sido a reação inespecífica, devido a anticorpos induzidos pela vacinação com *B. abortus* amostra B₁₉.

Inúmeras têm sido as tentativas de se conseguir diferenciar os anticorpos resultantes da infecção natural daqueles resultantes da vacinação.

Neste sentido, a maioria dos autores é unânime, quanto à importância de se considerar o histórico de vacinação dos animais a serem testados sorologicamente. Heck & col. (8) verificaram que há maior probabilidade de concordância entre provas sorológicas em soros de animais não vacinados, do que em soros de animais vacinados.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a correlação (associação) entre os resultados obtidos pela soro-aglutinação rápida em placa (SAR), reação de fixação do complemento (RFC') e prova do antígeno acidificado tamponado (PAAT), tanto em soros de animais não vacinados contra a brucelose e pertencentes a um rebanho naturalmente infectado como em soros de animais vacinados com *B. abortus* amostra B₁₉.

Material e Métodos

Antígenos - Para todas as técnicas, empregou-se antígeno padrão, produzido e comercializado pelo Ministério da Agricultura do Brasil.

Soros sanguíneos - Examinou-se 119 soros de bovinos adultos, pertencentes a um rebanho onde nunca foi empregada a vacinação contra brucelose e 100 soros de bezerros com idade entre 3 e 18 meses, vacinadas com *B. abortus* amostra B₁₉. Estas amostras foram colhidas em diferentes etapas do período de pós-vacinação. Antes da vacinação estas bezerras não apresentavam reação a nenhuma das provas empregadas.

Provas sorológicas - *Soro aglutinação rápida* - A SAR foi realizada de acordo com a técnica padrão, descrita por Alton & Jones (3).

Prova do antígeno acidificado tamponado - A PAAT foi conduzida e interpretada de acordo com os critérios de Alton & col. (4).

Reação de fixação do complemento - A RFC' foi realizada de acordo com a técnica descrita por Bier & col. (6).

Análise estatística - Na literatura, há vários métodos para se obter medidas de associação (1). No caso, devido a simplicidade da técnica, optou-se pela obtenção do coeficiente de correlação e de equação de reta entre escores. Para tanto, foram escolhidos escores que possam representar as respectivas classes como um todo. Para a PAAT, foi atribuído o valor zero para N (negativo) e um para P (positivo); para a SAR, o escore foi representado pela respectiva diluição em UI/ml e finalmente para a RFC' o escore foi representado pelo ponto médio da classe a que pertence, exceto a última classe que foi representada pelo ponto inferior (pois não há ponto superior).

Resultados e Discussão

Dos 100 soros de animais vacinados (Tabela 1), cerca de 40% apresentaram resultado negativo à PAAT e apenas 20% não apresentou título à RFC'. Nota-se ainda, uma distribuição quase uniforme nos escores de 0 a 130, representando cerca de 90% do total de soros.

O coeficiente de correlação foi 0,71 e a equação da reta foi $\text{RFC}' = 10 + 110 \text{ PAAT}$, expressando o fato de a maior parte dos animais positivos à PAAT apresentar escores no intervalo de escore 120 e que os negativos à PAAT apresentam escores baixos na RFC'.

Os resultados obtidos na PAAT e na RFC' para os soros de animais não vacinados e os respectivos escores (Tabela 2) revelam que cerca de 60% dos soros apresentaram concordantemente resultados negativos nos dois testes.

O coeficiente de correlação foi 0,72 e a equação de reta foi $\text{RFC}' = 160 \text{ PAAT}$, sugerindo que, no global, os soros negativos à PAAT também serão negativos à RFC', e que, os soros positivos à PAAT serão distribuídos ao redor do escore 160. A equação sugere também que os soros positivos à PAAT, no caso de animais não vacinados, corresponderão a um escore RFC' maior que no caso dos animais vacinados, ou seja, os soros positivos de animais não vacinados teriam escores RFC' maiores.

Estes dados, estão de acordo com Heck & col. (8), para quem os soros de animais não vacinados, negativos à PAAT, têm maior probabilidade de apresentar resultado negativo à RFC' do que os soros dos animais vacinados.

Por outro lado, Corbel (7), embora não tenha observado uma correlação completa entre a RFC' e a prova do antígeno acidificado tamponado (PAAT), sugere que esta última poderia oferecer uma alternativa à RFC', uma vez que constatou que a PAAT detecta apenas IgG₁. Entretanto, Allan & col. (2) afirmam que a PAAT é mais eficiente para detectar IgM do que IgG₁ e IgG₂.

Os resultados obtidos na SAR e na RFC' para os soros de animais vacinados, com os respectivos escores, estão apresentados na Tabela 3. Nota-se claramente que não há perfeita concordância entre as duas provas, uma vez que quase todas as classes de um teste se distribui por diversas classes do outro.

O coeficiente de correlação foi 0,68 e a equação de reta foi $\text{RFC}' = 0,52 \text{ SAR}$, su-

Tabela 1 - Distribuição do número de soros sanguíneos de bovinos vacinados com *B. abortus* B₁₉, de acordo com os resultados obtidos pela reação de fixação do complemento (RFC') e pela prova do antígeno acidificado tamponado (PAAT), com os respectivos escores.

Símbolos: * = Recíproco; N = Nenhum título

Escores PAAT	Escores RFC'*						Total
	0 (N)	10 (0-20)	40 (20-60)	130 (60-200)	300 (200-400)	400 (≥400)	
0 (N)	20	16	5	-	-	-	41
1 (P)	1	6	18	28	4	2	59
Total	21	22	23	28	4	2	100

Tabela 2 - Distribuição do número de soros sanguíneos de bovinos não vacinados, de acordo com os resultados obtidos pela reação de fixação do complemento (RFC') e pela prova do antígeno acidificado tamponado (PAAT), com os respectivos escores

Escores PAAT	Escores RFC'*						Total
	0 (N)	10 (0-20)	40 (20-60)	130 (60-200)	300 (200-400)	400 (≥400)	
0 (N)	74	4	-	-	-	-	78
1 (P)	-	2	11	17	4	7	41
Total	74	6	11	17	4	7	119

gerindo que os escores RFC' são em média 52% dos escores SAR. Este fato sugere que os escores RFC' correspondem às classes de diluição menores, em termos de escores SAR.

Os resultados obtidos na SAR e na RFC' para os soros de animais não vacinados, com os respectivos escores

(Tabela 4) revelam que não há perfeita concordância entre as duas provas, a exemplo do que ocorreu com os soros de animais vacinados.

O coeficiente de correlação foi de 0,82, superior ao verificado para o soro de animais vacinados, o que talvez se deva ao fato de os escores serem mais claramente diferenciados, levando assim a maior concordância.

Heck & col. (8) também constataram que a melhor concordância entre as diversas provas sorológicas é obtida em soros de animais não vacinados.

A equação da reta foi $RFC' = 0,77 \text{ SAR}$, sugerindo que neste caso os escores RFC' são em média 77% dos escores SAR, ou seja, os escores RFC' são, tal como no caso dos soros de animais vacinados inferiores aos escores SAR, mas nesse caso a diferença é menor que no caso anterior. Este fato está a sugerir que os soros de animais não vacinados, quando positivos, possuem escores RFC' mais fortes, tanto assim

que, entre os soros de animais vacinados, o mais alto título fixador de complemento observado foi de 1:410, ao passo que entre os soros de animais naturalmente infectados obteve-se título fixador de complemento de até 1:3.280.

Utilizando diferentes classes de imunoglobulinas, Beh (5) observou que subsequentemente à vacinação encontra-se no soro sanguíneo, anticorpos pertencentes às classes IgG₁ e IgM, ao passo que em animais naturalmente infectados estão presentes a IgG₁ e, em menor quantidade, a IgM. Com base no fato de que reações vacinais persistentes se deveriam provavelmente à IgM e que em animais cronicamente infectados há predominância de IgG, a reação de fixação do complemento (RFC') tem sido indicada para diferenciar animais vacinados de animais com infecção crônica.

Tabela 3 - Distribuição do número de soros sanguíneos de bovinos vacinados com *B. abortus* B19, de acordo com os resultados obtidos pela reação de fixação do complemento (RFC') e pela soro-aglutinação rápida (SAR) com os respectivos escores

Escores SAR	Escores RFC'*					Total	
	0 (N)	10 (0-20)	40 (20-60)	130 (60-200)	300 (200-400)		
0 (N)	14	2	-	-	-	16	
25 (1:25)	4	4	1	-	-	9	
50 (1:50)	2	9	12	4	-	27	
100 (1:100)	1	5	3	9	-	18	
200 (1:200)	-	1	6	10	-	17	
400 ($\geq 1:400$)	-	1	1	5	4	2	13
Total	21	22	23	28	4	2	100

Tabela 4 - Distribuição do número de soros sanguíneos de bovinos não vacinados, de acordo com os resultados obtidos pela reação de fixação do complemento (RFC') e pela soro-aglutinação rápida (SAR) com os respectivos escores

Escores SAR	Escores RFC'*					Total	
	0 (N)	10 (0-20)	40 (20-60)	130 (60-200)	300 (200-400)		
0 (N)	32	-	-	-	-	32	
25 (1:25)	30	3	-	1	-	34	
50 (1:50)	12	1	4	-	-	17	
100 (1:100)	-	2	6	5	2	16	
200 (1:200)	-	-	1	8	1	10	
400 ($\geq 1:400$)	-	-	-	3	1	6	10
Total	74	6	11	17	4	7	119

Conclusões

1. Não há concordância perfeita entre as três provas analisadas, sendo a concordância menor no caso de animais vacinados.
2. As retas ajustadas mostram que em média e com flutuações deve se esperar:
 - a) animais vacinados

$$\text{RFC}' = 10 \text{ (para animais negativos à PAAT)}$$

$$\text{RFC}' = 120 \text{ (para animais positivos à PAAT)}$$

$$\text{RFC}' = 0,52 \text{ SAR (nos diversos escores SAR e RFC')}$$
 - b) animais não vacinados

$$\text{RFC}' = 0 \text{ (para animais negativos à PAAT)}$$

$$\text{RFC}' = 160 \text{ (para animais positivos à PAAT)}$$

$$\text{RFC}' = 0,77 \text{ (nos diversos escores SAR e RFC')}$$
3. Os escores RFC' foram inferiores aos correspondentes SAR, sugerindo que uma reação em escores SAR é produzida por escores mais baixos em termos de RFC'.
4. Entre os animais naturalmente infectados observou-se títulos fixadores de complemento mais altos que entre os animais vacinados.

Referências Bibliográficas

1. Agresti, A. - The effect of category choice on some ordinal measures of association. *J. Am. Statist. Assoc.*, 71:49-55, 1976.
2. Allan, G.S.; Chappel, R.J.; Williamson, P. & MacNaught, D.J. - A quantitative comparison of the sensitivity of serological tests for bovine brucellosis to different antibody classes. *J. Hyg. Camb.*, 76:287-298, 1976.
3. Alton, G.G. & Jones, L.M. - Las técnicas de laboratório en la brucellosis. OMS, 1976.
4. Alton, G.G.; Maw, J.; Rogerson, B.A. & McPherson, G.G. - The serological diagnosis of bovine brucellosis: an evaluation of the complement fixation, serum agglutination and Rose Bengal tests. *Aust. Vet. J.*, 51:57-63, 1975.
5. Beh, K.J. - Quantitative distribution of *Brucella* antibody amongst immunoglobulin classes in vaccinated and infected cattle. *Res. Vet. Sci.*, 17:1-4, 1974.
6. Bier, O.; Siqueira, M. & Esteves, M.B. - Quantitative studies of complement fixation. I - A simplified and accurate procedure based on 50 per cent hemolytic end point. *Rev. Inst. Med. Trop. (São Paulo)*, 10:199-208, 1968.
7. Corbel, M.J. - Identification of the immunoglobulin class active in the Rose Bengal plate test for bovine brucellosis. *J. Hyg. Camb.*, 70:779-795, 1972.
8. Heck, F.C.; Williams, J.D.; Crawford, R.P. & Flowers, A.I. - Comparison of serological methods for the detection of *B. abortus* antibodies in sera from vaccinated and non-vaccinated cattle. *J. Hyg. Camb.*, 83:491-499, 1979.

ATIVIDADE ANTI-MICROBIANA "IN VITRO" DA ATRANORINA

Luiza Helena da Silva Melo Cavalcanti
 Ricardo Fernandes Maia
 Edeltrudes de Oliveira Lima
 & Lauro Xavier Filho

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

Resumo

Duas substâncias, extraídas de *Cladonia sandstedei* Abb., podem ser comparáveis à atranorina e ao β -metil orcinol carboxilato, com base em estudos de espectroscopia de massa, ressonância magnética nuclear e infravermelho. Somente atranorina foi testada "in vitro", pois apresentou melhor rendimento. Foi testado a atividade microbiológica da atranorina, mostrando-se esta, efetiva para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* e para os leveduriformes *Candida albicans*, *Candida stellatoidea*, em algumas doses nos meios líquidos e sólido.

Summary

In vitro antimicrobial activity of atranorine

Two substances isolated from *Cladonia sandstedei* Abb. were found to be identical to atranorine and β -methylorcinol carboxylate based on MS, NMR and IR analysis. Only atranorine was tested "in vitro" for its antimicrobial activity for it had shown a higher yield. In microbiological tests different concentrations of atranorine was found to be effective against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* as well as for yeast such as *Candida albicans* and *Candida stellatoidea* in liquid and solid media.

Introdução

Cladonia sandstedei Abb. líquen da família Cladoniaceae, é abundante na região do Tabuleiro (Cerrado) de Santa Rita, no Estado da Paraíba, crescendo sobre humos e solo arenoso, existindo também em outras áreas do Brasil.

Foram isolados dois compostos, atranorina e o β -metil orcinol carboxilato (1, 2, 3), sendo que o primeiro composto isolado apresentou rendimento superior ao do β -metil-orcinol carboxilato, portanto prestou-se para testar "in vitro".

Atranorina é um para-depsídeo (1), com apenas uma exceção, o anel A de todas as depsidonas da série b-orcínol têm um substituinte aldeídico na posição 3, como mostra o anel A do para-depsídeo atranorina (Fig. 1) ou um substituinte 3-metil, como mostra o anel B da atranorina.

Vartia (6) notou a presença da atranorina em 50% das espécies estudadas, apresentando atividade pelo menos em uma bactéria.

Entre os poucos trabalhos realizados sobre ação antimicrobiana de líquens no Brasil (4, 5, 7), não há muita ênfase às substâncias puras, propriamente ditas.

Neste trabalho, foi evidenciada a atividade antimicrobiana da atranorina, frente a algumas bactérias e leveduras, a fim de determinar a potencialidade da substância testada e eventual aproveitamento no futuro.

Material e Métodos

Após extração e purificação, a ação antimicrobiana da atranorina foi testada em bactérias gram-positivas e gram-negativas (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Sarcina lutea* e *Bacillus cereus*) e em fungos leveduriformes (*Candida albicans* e *Candida stellatoidea*).

O meio líquido para os fungos leveduriformes foi o caldo Sabouraud (20g de dextrose, 10g de peptona, 1000ml de água destilada); para as bactérias, o caldo nutritivo (5g de peptona, 3g de extrato de carne e 1000ml de água destilada).

O meio sólido para fungos leveduriformes foi o agar Sabouraud (20g de dextrose, 10g de peptona, 15g de agar e 1000ml de água destilada); e para as bactérias, o agar nutritivo (5g de peptona, 3g de extrato de carne, 15g de agar e 1000ml de água destilada).

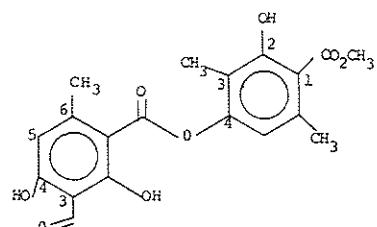
Para inóculo dos microrganismos, no meio de cultura tanto sólido como líquido, utilizou-se uma solução salina a 0,9%, estéril para bactérias: água destilada foi empregada para os fungos leveduriformes.

Foram utilizadas as doses de 12,5; 25; 50; 250 e 500 μ g/ml da droga para os testes nos meios líquidos e sólido, tanto para as bactérias como para os fungos leveduriformes.

Após a distribuição da droga (dissolvida em acetona) nos meios (mantidos os controles da droga, solvente e microrganismo), foi iniciada a incubação à temperatura ambiente (25–28°C), para fungos leveduriformes e a 37°C para as bactérias (em câmara de crescimento). No meio líquido, foi utilizado o método de diluições sucessivas.

No meio sólido, além de diluições alteradas, foram utilizados discos de papel de filtro com 6mm de diâmetro, impregnados com 0,01ml de solvente, contendo a droga nas diferentes concentrações já citadas, além do disco controle para cada dose.

Figura 1 – Atranorina



Resultados e Discussão

A substância identificada como atranorina, possui alguma ação antimicrobiana, quando testada em meio líquido (Tabelas 1 e 2).

Em organismos leveduriformes foi observado que, após 24 horas de incubação, houve inibição de crescimento de *Candida albicans*, quando utilizada a dose de 500 μ g/ml. Para a *Candida stellatoidea*, houve inibição com as doses de 500 a 250 μ g/ml.

A leitura feita 48 horas após a incubação de amostras, mostrou pouca modificação, verificando-se aumento de crescimento em apenas duas doses, 50 e 25 μ g/ml em *Candida stellatoidea*.

É discreta a atividade antimicrobiana da atranorina, sobre organismos leveduriformes, visto que, foi obtida inibição de *Candida albicans* apenas na dose de 500 μ g/ml e de *Candida stellatoidea* nas doses de 500 a 250 μ g/ml. A partir de 250 μ g/ml, para *Candida albicans*, até 12,5 μ g/ml para *Candida stellatoidea*, foram observados crescimentos que variaram de pequeno a muito intenso, respectivamente.

Nos testes com bactérias (Tabela 1), foram feitas leituras após 24 e 48 horas de incubação, observando-se que houve aumento de crescimento apenas no controle de bactéria de *Bacillus cereus*. As inibições e crescimento mantiveram-se inalterados durante o período de observação, mostrando-se efetivas as seguintes doses: 500 μ g/ml para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus*; 250 μ g/ml para

Staphylococcus aureus, *Bacillus cereus*, 50µg/ml para *Staphylococcus aureus*.

Tabela 1 - Teste de inibição das bactérias por atranorina em meio líquido.

Símbolos: ++++ = Inibição excelente; +++) = Inibição boa; ++ = Inibição regular; 0 = Sem efeito; C.T. = Caldo turvo; C.L. = Caldo límpido

Droga µg/ml	<i>S. aureus</i> 24h	<i>S. aureus</i> 48h	<i>E. coli</i> 24h	<i>E. coli</i> 48h	<i>S. faecalis</i> 24h	<i>S. faecalis</i> 48h	<i>B. cereus</i> 24h	<i>B. cereus</i> 48h	Droga controle
500	++++	++++	++++	+++	++	++	++++	++++	C.L.
250	++++	+++	++	++	++	++	+++	+++	C.L.
50	++++	+++	++	++	++	++	++	++	C.L.
25	0	0	0	0	0	0	0	0	C.L.
12,5	0	0	0	0	0	0	0	0	C.L.
Bactérias controle	C.T.	C.T.	C.T.	C.T.	C.T.	C.T.	C.T.	C.T.	-
Bactérias controle em acetona	C.T.	C.T.	C.T.	C.T.	C.T.	C.T.	C.T.	C.T.	-

Tabela 2 - Teste de inibição das bactérias por atranorina em meio sólido.

Símbolos: ++++ = Inibição excelente; +++) = Inibição boa; ++ = Inibição regular; 0 = Sem efeito; P.H. = Presença de halo; A.H. = Ausência de halo

Droga µg/ml	<i>S. aureus</i> 24h	<i>S. aureus</i> 48h	<i>E. coli</i> 24h	<i>E. coli</i> 48h	<i>S. faecalis</i> 24h	<i>S. faecalis</i> 48h	<i>B. cereus</i> 24h	<i>B. cereus</i> 48h	Droga controle
500	++++	++++	++++	+++	++	++	++++	++++	A.H.
250	++++	+++	++	++	++	++	+++	+++	0 0
50	++	++	++	++	++	++	++	++	0 0
25	0	0	0	0	0	0	0	0	0 0
12,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0 0
Bactérias controle	P.H.	P.H.	P.H.	P.H.	P.H.	P.H.	P.H.	P.H.	-

As leveduras, em meio sólido e líquido (Tabelas 3 e 4), apresentaram alterações significativas de inibição e crescimento, comparando-se os dois métodos. Observa-se que a dose de 50µg/ml inibiu o crescimento de *Candida albicans* no meio sólido.

A inibição de crescimento bacteriano da atranorina, no meio sólido, foi obtida com doses maiores de 250µg/ml, na maior parte dos casos (Tabelas 1 e 2). Nas doses de 50µg/ml e concentrações inferiores, a inibição decresceu.

Estes resultados mostram que, tanto nas leveduras como nas bactérias, a atividade da atranorina é alta, nas doses de 500 e 250µg/ml para os microrganismos estudados.

Tabela 3 - Teste de inibição das leveduras por atranorina em meio líquido.

Símbolos: ++++ = Inibição excelente; +++) = Inibição boa; ++ = Inibição regular; + = Valor discutido; 0 = Sem efeito; C.T. = Caldo turvo; C.L. = Caldo límpido

Droga µg/ml	<i>C. albicans</i> 24h	<i>C. albicans</i> 48h	<i>C. stellatoidea</i> 24h	<i>C. stellatoidea</i> 48h	Droga controle
500	++++	++++	++++	++++	C.L.
250	++	++	+++	+++	C.L.
50	0	0	+	++	C.L.
25	0	0	0	0	C.L.
12,5	0	0	0	0	C.L.
Leveduras controle	C.T.	C.T.	C.T.	C.T.	-
Leveduras controle em acetona	C.T.	C.T.	C.T.	C.T.	-

Tabela 4 - Teste de inibição das leveduras por atranorina em meio sólido, com disco de papel de filtro.

Símbolos: ++++ = Inibição excelente; +++) = Inibição boa; ++ = Inibição regular; 0 = Sem efeito; P.H. = Presença de halo; A.H. = Ausência de halo

Droga µg/ml	<i>C. albicans</i> 24h	<i>C. albicans</i> 48h	<i>C. stellatoidea</i> 24h	<i>C. stellatoidea</i> 48h	Droga controle
500	++++	++++	++++	++++	A.H.
250	++++	+++	+++	+++	A.H.
50	+++	+++	+++	+++	A.H.
25	0	0	++	++	A.H.
12,5	0	0	0	0	A.H.
Levedura controle	P.H.	P.H.	P.H.	P.H.	-

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Departamento de Antibióticos da UFPe e ao Departamento de Farmácia da USP, pelo fornecimento de microrganismos.

Referências Bibliográficas

1. Culberson, C.F. - Chemical and botanical guide to lichen products. Durham, N.C., University of North Caroline Press, p.628, 1969.
2. Culberson, C.F. - Supplement to chemical and botanical guide to lichen products. *The Bryologist*, 73:177-377, 1970.
3. Culberson, C.F.; Culberson, W.L. & Johnson, A. - Second supplement to chemical and botanical guide to lichens products. Missouri, The American Bryological and Lichenological Society, p.400, 1977.
4. Mitidieri, J.; Joly, S.; Ferraz, E.C. & Vencovsky, R. - Estudo da ação antimicrobiana do extrato dos líquens brasileiros. In: - Anais do Congresso da Sociedade Botânica do Brasil, 13º, Recife, 1962. Instituto de Micologia, 345p. 1964.
5. Silva, J.O. - Atividade antimicrobiana de líquens brasileiros. Recife, Pernambuco, p.106, 1976. (Teses de Livre Docência).
6. Vartia, K.O. - Antibiotics in lichens. In: - Ahmadjian, V. & Hale, M.E., eds. - The lichens. New York, Academic Press, p.547-561, 1973.
7. Xavier Filho, L. & Rizzini, C.T. - Manual da liquenologia brasileira. Recife, Universidade Federal de Pernambuco, Ed. Universitária, 431p., 1976.

TESTE DE FLUORESCÊNCIA E PESQUISA DA ATIVIDADE PIRAZINA-CARBOXILAMIDASE (PYZ) NA IDENTIFICAÇÃO DO BACILO DIFTÉRICO ATOXINOGÊNICO*

Luiz Carlos Duarte Formiga
 Thereza Cristina Ferreira Camello
 Ana Luiza de Mattos Guaraldi
 Lylian Badaue de Almeida Rangel
 & Angela Cristina F.C. Blois de Assis

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

Resumo

O teste de fluorescência pode ser usado para identificar bacilos diftéricos toxinogênicos ou não, além de evitar esforço adicional, no processo de identificação de microrganismos corineiformes, não fluorescentes, semelhantes ao *C. diphtheriae*. O teste da pirazina-carboxilamidase, uma vez que pode ser realizado em duas horas, mostra-se também de grande valor para o diagnóstico laboratorial.

Summary

The U.V. fluorescence test and the pyrazine carboxylamidase activity as screening tests for identifying the non-toxigenic diphtheria bacilli

The U.V. fluorescence test can be used to identify toxigenic and nontoxigenic diphtheria bacilli, as well as to avoid additional efforts in the identification process of non-diphtheric coryneform bacteria. The fact that the pyrazine carboxylamidase activity can be done within two hours makes it a test of considerable value for diagnostic laboratories.

O teste de fluorescência (Formiga, L.C.D. & col., Rev. Bras. Patol. Clin., 16:201-202, 1980) mostrou-se satisfatório na triagem do bacilo diftérico, no trato respiratório (Formiga, L.C.D. & col., Rev. Lat-amer. Microbiol., 23:131-133, 1981). Entre indivíduos saudáveis foi observado apenas 2,9% de resultados falso-positivos e em nenhuma oportunidade resultados falso-negativos. De 237 amostras, de bastonetes Gram positivos, isolados de 29 pacientes com difteria e de seus contatos familiares, 15,6% apresentaram-se fluorescentes, sendo 13,5% identificadas como *C. diphtheriae* e apenas 2,1% como difteroides. Estes resultados recomendaram o teste de fluorescência, em casos de faringites, principalmente pela possibilidade do isolamento de amostras atoxinogênicas. Em materiais de origem cutânea este fato é ainda mais frequente (Formiga, L.C.D. & Suassuna, I., F. Med. (BR), 84:115-118, 1982).

* Trabalho realizado com auxílio da FINEP.

A porfirina fluorescente é produzida por diversas outras espécies do gênero *Corynebacterium*, porém não é fator limitante do teste de fluorescência, uma vez que estas espécies, na sua maioria, são bioquimicamente diferentes do bacilo diftérico, ou não são encontradas com frequência no nicho ecológico habitual da espécie patogênica. Entretanto, para materiais de lesões de pele, nicho de difteróides fluorescentes, cresce a expectativa do aumento de resultados falso-positivos. Por esse motivo, avaliamos a eficácia do teste de fluorescência na investigação do bacilo diftérico à partir de lesões cutâneas (Formiga, L.C.D. & col., Rev. Microbiol. (São Paulo), 13(4), 1982). Demonstramos então, que a maioria dos difteróides isolados não apresentaram fluorescência (60,49%) e por isso puderam ser afastados dos testes laboratoriais adicionais. Observamos também que 23,45% das amostras isoladas tinham comportamento bioquímico do bacilo diftérico, mas apenas 3 eram produtoras de toxina. Recomendamos estudo adicional desses microrganismos fluorescentes atoxinogênicos por sua semelhança com o complexo "*C. minutissimum*". Com esse objetivo, utilizamos a aglutinação em tubos com imune-soro monoespecífico (espécie específico) contra o bacilo diftérico (Andrade, A.F.B., Instituto de Microbiologia, UFRJ, 1976 (Tese de Mestrado) e o teste da pirazina-carboxilamidase (Sulea, I.T. & col., Int. J. Syst. Bacteriol., 30:466-472, 1980). Das amostras com comportamento bioquímico do bacilo diftérico (23,45%) apenas uma apresentou-se como difteróide (Pyz positivo). Concluimos, que deve ser pequeno o número de difteróides fluorescentes, semelhantes bioquimicamente ao bacilo diftérico, em materiais provenientes de lesões de pele, o que reforça a importância do teste de fluorescência na triagem do *C. diphtheriae* à partir destes materiais e recomenda o teste da pirazina-carboxilamidase como recurso adicional de valor.

PRIMEIRO ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE VIBRIO
PARAHAEMOLYTICUS NO BRASIL DE INFECÇÃO GASTROINTESTINAL
HUMANA

Ernesto Hofer

Deptº de Bacteriologia
Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz
Caixa Postal 926
21041 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Resumo

Amostra de *Vibrio parahaemolyticus* sorotipo 05:K17 e Kanagawa positiva, foi isolada de fezes diarréicas de uma criança de Cascavel, Ceará. Esta é a primeira referência de isolamento de *V. parahaemolyticus* de origem humana no Brasil e, provavelmente, da América do Sul.

Summary

The first isolation and identification of Vibrio parahaemolyticus from human gastrointestinal infection in Brazil

A strain of *Vibrio parahaemolyticus*, serotype 05:K17 and Kanagawa positive, was isolated from diarrheic feces of a child in Cascavel, Ceará. This is the first isolate of *V. parahaemolyticus* of human origin in Brazil and probably in South America.

Vibrio parahaemolyticus é um microrganismo com características halofílicas, tendo como habitat normal o ecossistema representado por animal e águas de origem marinha, que após as observações de Fugino & col. (J. Jap. Assoc. Infect. Dis., 25:11, 1951), veio a se constituir em novo agente de toxinfecção alimentar. Hodernamente, esta bactéria galgou a posição de principal responsável por este acontecimento no Japão. Em outras áreas do mundo, encontram-se algumas referências enfocando sua ocorrência no homem, em particular, em vários pontos da Ásia, América do Norte e África.

No Brasil, as descrições sobre *V. parahaemolyticus* se concentram, exclusivamente, nos achados em peixes, crustáceos, moluscos marinhos e águas de regiões estuarinas (Hofer, E. & Silva, C.H.D. In: - Resumos de trabalhos V Cong. Bras. Microbiol., Rio de Janeiro, p.193, 1974; Leitão, M.F.F. & Arima, H.K., Col. Inst. Tecnol. Alimentos, 6:149, 1975; Gelli, D.S. & col., Rev. Inst. Adolfo Lutz, 35/36:9, 1975/76; Barros, G.C. Tese de Mestrado. Faculdade de Veterinária, Univ. Fed. Fluminense, RJ, 1977; Santos, E.A. & col. In: - Resumos de trabalhos VIII Cong. Bras. Microbiol., Rio de Janeiro, p. 16, 1977; Zebral, A.A. & col. - Resumos de trabalhos X Cong. Bras. Microbiol., Rio de Janeiro, p. 71 e França, S.M.C. & col., JAMA, 244:587, 1980).

Em meados de junho de 1975, ocorreu, na cidade de Cascavel, Ceará, um surto de gastrorenterite, com características epidêmicas, atingindo, indistintamente, a adultos e crianças, tendo como provável agente, *Shigella flexneri* 2a, em vista do maior número de isolamentos efetuados. Nesta ocasião, foram encaminhadas, ao Laboratório de Enterobactérias e Vibrio, do Instituto Oswaldo Cruz, seis espécimes fecais,

transportados e conservados pela técnica de impregnação do material em papel de filtro, tipo xarope (Dold, H. & Ketterer, M.Z. Hyg. Infekt. - Kr., 125:444, 1944). Em uma das amostras de fezes, oriunda de uma criança de 6 anos de idade, sexo feminino, apresentando diarréia aquosa, foi detectado apenas *Vibrio parahaemolyticus*.

A técnica de coprocultura utilizada, consistiu no processo de enriquecimento em água peptonada alcalina, pH 8.5, durante 18 horas a 37°C e passagem posterior, em agar TCBS (Difco), incubado a 37°C por 18 horas. O crescimento no meio seletivo-indicador, revelou somente a presença de colônias sacarose negativas (azul-esverdeadas), cujo perfil bioquímico se compatibilizou com *V. parahaemolyticus* (Tabela 1).

Tabela 1 - Perfil bioquímico da amostra isolada.

Símbolos: + = reação positiva em 24 a 48 horas; - = reação negativa ou ausência de crescimento; * = Grupo VII da classificação de Heiberg; ** = 0/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropyl-pteridine), discos com concentração de 150mcg; Temperatura de incubação = 37°C

Prova ou Substrato	Reação
Coloração (Gram)	Bastonetes Gram negativos
Glicose (ácido)	+
Glicose (gás)	-
Manitol	+
Lactose	-
Sacarose*	-
Arabinose*	+
Mannose*	+
Inositol	-
Indol	+
H ₂ S (SIM e Kligler)	-
Citrato de sódio (Simmons)	+
Nitrito a nitrito	+
Urease	+
VM	+
VP	-
Fenilalanina desaminase	-
Lisina descarboxilase	+
Arginina dihidrolase	-
Oxitina descarboxilase	+
Crescimento a 42°	+
Crescimento em água peptonada com:	
0% NaCl	-
3% NaCl	+
7% NaCl	+
10% NaCl	-
Sensibilidade 0/129**	+
Oxidase	+
Catalase	+
Mobilidade	+
Hemólise total, hemátias humanas (Tese de Kanagawa)	+

As propriedades complementares analisadas, revelaram a hemólise típica no teste de Kanagawa, observada pelo processo de Fishbein & Wentz (J. Milk Food Technol., 36:118, 1973) e as estruturas antigênicas, definiram a amostra como pertencente ao sorotipo 05:K17 (Tipagem sorológico confirmada por Dr. M. Ohashi, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, Japan).

Nenhuma informação epidemiológica de vulto foi obtida, no sentido de esclarecer a causa desta ocorrência, assim como do surto, a não ser a utilização frequente na alimentação, de peixes de origem marinha e de água doce, estes, conservados pela salga.

Provavelmente, este relato constitui a primeira referência da detecção de *Vibrio parahaemolyticus*, no homem, apresentando sintomatologia gastrintestinal no Brasil e talvez, na América do Sul.

ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE PACIENTES COM INFECÇÕES PULMONARES AGUDAS TRATADOS PELA TOBRAMICINA

Claudia E.O. Pires de Campos
Regina M.S. Tosoni Decarlis

Deptº de Microbiologia e Imunologia
Instituto Básico de Biologia Médica e Agrícola UNESP
Campus de Botucatu
18600 Botucatu SP, Brasil

& Evanil Pires de Campos

Deptº de Moléstias Infecciosas e Parasitárias
Dermatologia e Radiologia
Faculdade de Medicina de Botucatu UNESP
Campus de Botucatu
18600 Botucatu SP, Brasil

Resumo

Foram avaliados clínica e microbiologicamente pacientes com infecções pulmonares bacterianas, tratados pela tobramicina, pertencentes à faixa etária média de 40 anos de idade. Procurou-se comparar os resultados obtidos com dois métodos de antibiograma. Foram verificadas a permanência dos germes e as modificações da flora patogênica durante e após antibioticoterapia. A tobramicina revelou boa ação sobre bactérias Gram positivas e Gram negativas. Em cinco pacientes, houve persistência de bactérias durante a convalescência e consequente recaída, causada principalmente por *S. pneumoniae*. Em 22 casos, após cinco dias ou mais de tratamento, ocorreu persistência da mesma flora em nove e mudança em 13. Nos casos de persistência da mesma flora, predominou a associação *S. aureus* e *S. pneumoniae* (9,1%). As modificações mais frequentes da flora foram nos casos em que a *Klebsiella* sp. foi isolada em primeiro cultivo (13,7%), seguidos do *S. aureus* (9,1%).

Summary

Microbiological features of bacterial infection of lung from patients treated by tobramycin

We analysed the clinic and microbiological aspects of bacterial pulmonary infections of patients treated by tobramycin with the average age of 40 years old. The two utilized antibiogram methods were compared. We found out modifications of pathogenic flora during and after antibiotic therapy. The tobramycin brought out to be good against Gram positive and Gram negative bacteria. Five patients that had a persistence of bacteria in convalescent period exhibited relapse of pneumonia; in all of these patients the bacteria isolated was *S. pneumoniae*. In 22 patients, after five days or more of treatment, it

happened persistence of the same flora in nine of them and change in 13. In cases of persistence of the same flora, it prevailed the association *S. aureus* and *S. pneumoniae* (9.1%). The more frequent modification in the flora were the cases where *Klebsiella* sp. was isolated in the first culture (13.7%), followed by *S. aureus* (9.1%).

Introdução

Há autores que invalidam a microbiologia da secreção purulenta bronco-pulmonar, como auxiliar do diagnóstico etiológico de pneumopatias agudas (1, 8, 19). Outros, consideram a bacteriologia de escarro fundamental, se as condições técnicas empregadas para o isolamento foram adequadas. Paralelamente, não deixaram de valorizar a semiologia clínica-radiológica do aparelho respiratório, como ponto importante para o diagnóstico final (3, 7, 16, 17). Por outro lado, o uso de antibióticos tem dificultado a identificação da flora bacteriana do escarro purulento, responsável por pneumonias agudas.

Frente à controvérsia, foram estudadas as prováveis influências da terapia pela tobramicina, em bactérias patogênicas ou não, isoladas de pacientes com infecções pulmonares.

Material e Métodos

Foram estudados 30 doentes, sendo 20 do sexo masculino e 10 do sexo feminino, internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. A idade dos pacientes oscilou entre 12 a 75 anos; na maioria, foi superior a 40 anos.

Dos pacientes, 23 possuíam condições agravantes e 19 antecedentes pulmonares à internação. As manifestações foram designadas discretas em um, moderada em sete e grave em 22 doentes, baseado no exame clínico, no momento da internação.

O estudo radiológico revelou broncopneumonia em 22 pacientes, dos quais 10 também possuíam derrame pleural; abscesso em dois, abscesso com derrame em três; pneumonia lobar em dois e neoplasia infectada em um doente.

O escarro de cada paciente foi colhido 24 horas antes do início do tratamento, no quinto dia e 24 horas após o término pela tobramicina.

O diagnóstico microbiológico foi feito por bacterioscopia direta e por isolamento e identificação das bactérias. O patógeno principal foi caracterizado através de dados clínicos, radiológicos e microbiológicos.

Na bacterioscopia, procurou-se verificar a presença e o tipo de leucocócitos, bem como a predominância das formas bacterianas.

Foram usados os meios de cultura Agar Sangue (Blood Agar Base "Oxoid", acrescido de 10% de sangue de ovino) e Mac Conkey Agar ("Oxoid"). As enterobactérias foram identificadas segundo Edwards & Ewing (5) e as demais de acordo com Cowan & Steel (4). Não foram estudadas as bactérias anaeróbicas estritas.

O antibiograma foi realizado para todas as 102 bactérias isoladas, por dois métodos: o da difusão pela padronização de Kirby-Bauer (2) e o da diluição da droga, em agar nutritivo, para a determinação da concentração inibitória mínima (19).

Os microrganismos foram estudados segundo a sua concentração inibitória mínima frente à tobramicina, o desaparecimento nas culturas subsequentes e se havia ou não modificação e persistência da flora patogênica. Procurou-se, ainda, verificar a correlação existente entre os dois métodos de antibiograma utilizados para o estudo da sensibilidade bacteriana; e o comportamento das bactérias dos pacientes que apresentaram evolução clínica insatisfatória, frente à terapia pela tobramicina.

A duração média do tratamento dos pacientes portadores de pneumonias agudas, pela tobramicina, foi de 10 dias. Utilizou-se, para a análise estatística dos resultados, o teste "t".

Resultados e Discussão

Os agentes etiológicos isolados com maior frequência, antes da terapia antimicrobiana, foram *Klebsiella sp.*, em 36,7% dos pacientes e *S. aureus*, em 20,0% (Tabela 1); 61,1% das bactérias Gram positivas e 80,9% das bactérias Gram negativas foram sensíveis à 1 μ g/ml de tobramicina, sem diferença significativa, quando se comparou a porcentagem acumulada das bactérias Gram positivas e Gram negativas, em relação à sensibilidade a tobramicina (Tabela 2).

Após cinco dias de tratamento houve desaparecimento da bactéria isolada em 26% dos pacientes (Tabela 3). Houve persistência de bactérias no escarro, após o quinto dia ou mais da antibioticoterapia, em 73,3% dos pacientes (Tabela 4).

Tabela 2 - Porcentagem acumulada de 63 bactérias Gram negativas e de 39 bactérias Gram positivas em relação à sensibilidade a tobramicina

Concentração (μ g/ml)	Gram negativas			Gram positivas		
	Nº de sensíveis	%	% (acumulada)	Nº de sensíveis	%	% (acumulada)
0,10	9	14,3	14,3	2	5,1	5,1
0,15	11	17,5	31,8	2	5,1	10,2
0,20	7	11,1	42,9	8	20,5	30,7
0,25	3	4,8	47,7	0	0,0	30,7
0,30	0	0,0	47,7	2	5,1	35,8
0,35	3	4,8	52,5	1	2,6	38,4
0,40	3	4,8	57,3	0	0,0	38,4
0,45	2	3,1	60,4	1	2,6	41,0
0,50	1	1,6	62,0	1	2,6	43,6
0,55	2	3,1	65,1	0	0,0	43,6
0,60	0	0,0	65,1	0	0,0	43,6
0,65	1	1,6	66,7	0	0,0	43,6
0,70	3	4,8	71,5	0	0,0	43,6
0,75	0	0,0	71,5	2	5,1	48,7
0,80	2	3,1	74,6	0	0,0	48,7
0,85	0	0,0	74,6	1	2,6	51,3
0,90	4	6,3	80,9	0	0,0	51,3
0,95	0	0,0	80,9	0	0,0	51,3
1,00	0	0,0	80,9	4	10,3	61,6
> 1,00	12	19,1	100,0	15	38,4	100,0

Tabela 1 - Número de porcentagem de pacientes de acordo com o patógeno principal isolado na pré-terapia

Bactérias	Nº pacientes	% pacientes
<i>Klebsiella sp.</i>	11	36,7
<i>S. aureus</i>	6	20,0
<i>S. pneumoniae</i>	3	10,0
<i>Pseudomonas sp.</i>	3	10,0
<i>E. coli</i>	2	6,7
<i>Enterobacter sp.</i>	1	3,3
<i>P. mirabilis</i>	1	3,3
<i>Streptococcus</i> B hemolítico	1	3,3
<i>Klebsiella sp.</i> x <i>S. aureus</i>	2	6,7
Total	30	100,0

Em nove casos (40,6%), ocorreu a persistência da mesma flora bacteriana em três culturas subsequentes, realizadas do mesmo paciente após cinco dias ou mais com o uso de antibiótico (Tabela 5). Em 13 casos (58,8%), houve mudança da flora bacteriana, isto é, o patógeno principal foi substituído por outras bactérias nas culturas subsequentes (Tabela 6).

Tabela 3 - Frequência de desaparecimento das bactérias isoladas, de 30 pacientes, após cinco dias de tratamento pela tobramicina

Bactérias	Nº pacientes	% pacientes
<i>Klebsiella sp.</i>	2	6,8
<i>E. coli</i>	1	3,3
<i>Enterobacter sp.</i>	1	3,3
<i>Streptococcus B hemolítico</i>	1	3,3
<i>Klebsiella sp. x E. coli</i>	1	3,3
<i>Klebsiella sp. x P. mirabilis</i>	1	3,3
<i>Pseudomonas sp. x Enterobacter sp.</i>	1	3,3
Total	8	26,6

A comparação dos resultados do antibiograma realizado pelos métodos da diluição da droga (MIC) e o da difusão (Kirby-Bauer) em todas as bactérias isoladas (Tabela 7) revela que houve concordância da metodologia empregada, em 93,1% das amostras estudadas.

Ao ser correlacionado o comportamento das bactérias isoladas, no que diz respeito à concentração inibitória mínima da droga, com o quadro clínico apresentado pelos pacientes, verificou-se que, em quatro casos, houve recaída, com manifestações clínicas de infecção pulmonar ativa (Tabela 8).

Tabela 4 - Frequência de persistência de bactérias no escarro, após 5 dias ou mais de tratamento com a tobramicina, em 30 pacientes

Bactérias	Nº pacientes	% pacientes
<i>Klebsiella sp.</i>	3	10,0
<i>S. aureus</i>	3	10,0
<i>P. mirabilis</i>	1	3,3
<i>S. pneumoniae</i>	1	3,3
<i>Pseudomonas sp.</i>	1	3,3
<i>S. aureus x S. pneumoniae</i>	3	10,0
<i>Klebsiella sp. x S. aureus</i>	2	6,8
<i>Klebsiella sp. x P. mirabilis</i>	2	6,8
<i>Klebsiella sp. x Pseudomonas sp.</i>	1	3,3
<i>Klebsiella sp. x Citrobacter sp.</i>	1	3,3
<i>Pseudomonas sp. x Enterobacter sp.</i>	1	3,3
<i>E. coli x Pseudomonas sp.</i>	1	3,3
<i>E. coli x S. aureus</i>	1	3,3
<i>S. aureus x Streptococcus B hemolítico</i>	1	3,3
Total	22	73,3

Como o diagnóstico microbiológico foi iniciado logo após a colheita da secreção broncopulmonar, a bacterioscopia do escarro e a semeadura em meios de cultura adequados, foi possível o isolamento dos agentes responsáveis pelos quadros broncopulmonares dos doentes internados.

Tabela 5 - Frequência de persistência da mesma flora bacteriana, após 5 dias ou mais de tratamento pela tobramicina, em 22 pacientes

Bactérias	Nº pacientes	% pacientes
<i>S. pneumoniae</i>	1	4,5
<i>S. aureus</i>	1	4,5
<i>P. mirabilis</i>	1	4,5
<i>S. aureus</i> x <i>S. pneumoniae</i>	2	9,1
<i>Klebsiella sp.</i> x <i>S. aureus</i>	1	4,5
<i>S. aureus</i> x <i>E. coli</i>	1	4,5
<i>Klebsiella sp.</i> x <i>P. mirabilis</i>	1	4,5
<i>Pseudomonas sp.</i> x <i>Enterobacter sp.</i>	1	4,5
Total	9	40,6

Houve nítida correlação entre o observado na bacterioscopia e a identificação microbiológica do agente etiológico. A bacterioscopia do escarro possibilitou o encontro de grande número de leucócitos, nos casos de isolamento do patógeno. Nos casos em que houve o desaparecimento do agente principal, não se observou mais a presença de leucócitos na lâmina.

Tabela 6 - Frequência de mudança da flora bacteriana, após 5 dias ou mais de tratamento pela tobramicina, em 13 dos 22 pacientes

Bactérias	Nº pacientes	% pacientes
<i>Klebsiella sp.</i>	3	13,7
<i>S. aureus</i>	2	9,1
<i>S. pneumoniae</i>	1	4,5
<i>Pseudomonas sp.</i>	1	4,5
<i>E. coli</i> x <i>Pseudomonas sp.</i>	1	4,5
<i>Klebsiella sp.</i> x <i>P. mirabilis</i>	1	4,5
<i>Klebsiella sp.</i> x <i>Pseudomonas sp.</i>	1	4,5
<i>Klebsiella sp.</i> x <i>Citrobacter sp.</i>	1	4,5
<i>S. aureus</i> x <i>S. pneumoniae</i>	1	4,5
<i>S. aureus</i> x <i>Streptococcus B hemolítico</i>	1	4,5
Total	13	58,8

As bactérias Gram negativas foram as mais isoladas. O achado de 36,7% de *Klebsiella* sp. e de 20,0% de *S. aureus*, antes do inicio da terapia antimicrobiana, sugere, possivelmente, que os doentes pulmonares apresentavam condições agravantes ou utilizaram, previamente, outros antimicrobianos. Resultado análogo foi observado por outros autores (3, 7, 9, 10, 11, 17).

Verificou-se também que a associação mais frequente entre bactérias foi a de *Klebsiella* sp. com *S. aureus*. Vasconcelos & col. (14), obtiveram uma razoável por-

centagem de associação de bactérias em investigação semelhante.

A concentração inibitória mínima da droga utilizada, frente às bactérias isoladas, manteve-se inalterada, nas três culturas sucessivas efetuadas, antes, durante e pós-terapia.

Os agentes bacterianos, identificados e submetidos ao teste de sensibilidade à tobramicina, mostraram-se, na grande maioria, sensíveis a uma concentração inibitória mínima baixa.

A presença de bactérias patogênicas, nos escarros colhidos nos três momentos de estudo, foi de 73,3% dos casos e a permanência da mesma flora foi de 40,6%, após o quinto dia ou mais de tratamento pela tobramicina.

Tabela 7 - Estudo comparativo do método da diluição (MIC) e método da difusão (K.B.) em bactérias Gram negativas e Gram positivas frente a tobramicina.

Símbolos: * = Antibiograma realizado pelo método da diluição em placas, para verificação da concentração inibitória mínima; ** = Antibiograma realizado pelo método de difusão segundo padronização de Kirby-Bauer

Diluição (MIC)* e Difusão (K.B.)**	Gram negativas		Gram positivas		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Concordância	59	57,4	36	35,3	95	93,1
Discordância	4	3,9	3	3,0	7	6,9
Total	63	61,7	39	38,3	102	100,0

A terapia, pelo antimicrobiano estudado, elevou o número de germes Gram negativos, nas vias respiratórias. Fato semelhante foi observado por outros autores (7, 9, 11, 17).

A mudança da flora bacteriana, após o quinto dia ou mais de tratamento pelo antimicrobiano, parece estar de acordo com o achado por outros autores (6, 7, 9, 10, 11).

A recaída da pneumonia, observada em cinco pacientes internados, foi interpretada segundo parâmetros clínico-radiológico e microbiológico evolutivo, pois, quatro dos cinco casos apresentaram recaída quando se isolou o mesmo agente etiológico após o quinto dia ou mais de observação clínica e terapêutica durante o período de internação.

O estudo microbiológico, aliado ao clínico-radiológico permitiu, concluir pela adequada etiologia das infecções pulmonares, além de caracterizar o quadro pneumônico de supra-infecções.

Em síntese, a tobramicina mostrou: a) excelente ação "in vitro" para Enterobactérias, onde a concentração inibitória mínima foi menor que 1 μ g/ml, em 80,9% das amostras avaliadas; b) boa ação "in vitro" para bactérias Gram positivas, onde 61,6% apresentaram concentração inibitória menor que 1 μ g/ml; c) 26,6% dos casos, em que

Tabela 8 - Concentração inibitória mínima da tobramicina frente a bactérias isoladas de 1^a, 2^a ou mais culturas de escarro de pacientes com pneumonia e resposta terapêutica adequada.

Símbolos: * = Pneumonia lobar-bloqueio neuromuscular; ** = Recaída

Bactérias	MIC (μ g/ml)			
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a
* S. pneumoniae	2,0	-	-	-
** S. pneumoniae	1,0	1,0	-	-
** S. pneumoniae	5,7	5,55	5,7	5,55
** S. aureus	1,0	2,0	2,0	-
** Streptococcus B hemolítico	3,55	3,6	-	-

houve desaparecimento da flora patogênica, após o quinto dia de tratamento; d) 40,6% dos pacientes, nos quais houve persistência da mesma flora bacteriana, após o quinto dia ou mais de tratamento; e inadequação para o tratamento de pneumonias agudas causadas por *S. pneumoniae*.

Referências Bibliográficas

1. Barret-Conner, E. - The non value of sputum culture in the diagnosis of pneumococcal pneumonia. Am. Rev. Resp. Dis., 103:845-848, 1971.
2. Bauer, A.N.; Kirby, W.M. & Sherris, J.C. - Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. Am. J. Clin. Path., 45:493-496, 1966.
3. Campos, E.P.; Meira, D.A.; Mendes, R.P. & Campos, C.E.O.P. - Tratamento de pneumonias agudas com um novo antibiótico tobramicina. Rev. Bras. Pesq. Med. e Biol., 11:369-376, 1978.
4. Cowan, S.T. & Steel, K.L. - Manual of the identification medical bacteria. 2.ed. Cambridge University, 238p., 1974.
5. Edwards, O.L. & Ewing, N.H. - Identifications of Enterobacteriaceae. 3.ed. Minneapolis, Burgess Publishing, 362p., 1972.
6. Finland, M. - Changing ecology of bacterial infections as related to antibacterial therapy. J. Infect. Dis., 122:419-431, 1970.
7. Fraser, R.G. & Pare Peter, J.A. - Infectious diseases of the lungs pneumonia. In: - Diagnosis of diseases of the chest. 2.ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 6:657-860, 1978.
8. Golin, V.; Silva Jr., E.; Sessa, E. & Mimica, I. - A aspiração transtráqueal no diagnóstico das infecções pulmonares na emergência. Rev. Ass. Med. Bras., 25:159-162, 1979.
9. Johanson, W.G.; Pierce, A.K. & Sanford, J.P. - Changing pharingeal bacterial flora of hospitalized patients. N. Eng. J. Med., 281:1137-1140, 1969.
10. Kislak, J.W.; Eickhoff, T.C. & Finland, M. - Hospital acquired infections and antibiotic usage in Boston City Hospital. N. Eng. J. Med., 271:834-835, 1964.
11. Le Frock, J.L. & Kainer, A.S. - Nosocomial infections. Michigan, The Upjohn Company Kalamazoo Michigan, 51p., 1976.
12. Lepper, M.H. - Opportunistic Gram-negative rod pulmonary infections. Dis. Chest., 44:18-26, 1963.
13. Polisuk, J.; Yoshino, M.K.; Raulino, R.L.; Vainer, R. & Knibel, M.F. - Estudo sobre a eficácia e tolerância da combinação molecular Tiafenicol-Acetil Cisteína no tratamento das infecções pulmonares agudas. Rev. Bras. Clin. Terap., 9:119-128, 1980.
14. Rocha, O.M.; Campos, E.P.; Meira, D.A.; Brasil, M.A.M.; Mendes, R.P. & Campos, C.E.O.P. - Uso de antimicrobianos no Hospital da Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 1:89-92, 1980.
15. Spencer, R.C. & Philp, J.R. - Effect of previous antimicrobial therapy of bacteriological findings in patients with primary pneumoniae. Lancet, 2:249-350, 1973.
16. Thorsteinson, S.B.; Musher, D.M. & Ferrence, F. - The diagnostic value of sputum culture in acute pneumoniae. J. Am. Med. Ass., 233:849-895, 1975.
17. Vargas, F.S.; Verrastro, C.; Biuggi, F.H.M.; Silva, A.A.B. da; Yen, C.C. & Neto, M.M.R. - Avaliação clínica e bacteriológica da bacampicilina em infecções brônquicas: estudo comparativo da administração de 400mg duas a três vezes ao dia. Rev. Bras. Clin. Terap., 9:185-190, 1980.
18. Vasconcelos, R.F.; Stape, D.D.B.; Hutzler, R.V. & Olson, C.M. - Prevalência de doentes infectados e uso de antimicrobianos em Hospital Universitário. Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Univ. São Paulo, 31:208-214, 1976.
19. Youmans, G.P.; Paterson, P.Y. & Sommers, H.N. - The biologic and clinic basis of infectious disease. 2.ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 813p., 1980.

DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS EM MICÉLIO DE ROZITES GONGYLOPHORA*

Maria Eunice Mônaco Furletti
& Alcides Serzedello

Deptº de Bioquímica
Instituto de Biociências UNESP
Caixa Postal 178
13500 Rio Claro SP, Brasil

Resumo

Rozites gongylophora, um fungo cultivado por formigas do gênero *Atta*, foi desenvolvido em meio de malte líquido, contendo pedaços de coco (*Coccus nucifera*), visando-se produção de massa micelial e determinando-se alguns carboidratos. Culturas estacionárias de 30 e 50 dias demonstraram diferenças nos teores de carboidratos em micélios aéreos e sub-aéreo. Carboidratos totais, trealose, glicogênio e glicana apresentaram-se em concentrações maiores no micélio sub-aéreo. Os micélios aéreos com 50 dias de cultivo apresentaram 61,98% mais carboidratos que os de 30 dias de crescimento, enquanto que para os sub-aéreos, a diferença mais apresentada pelas culturas de 50 dias foi de 41,83%.

Summary

Determination of carbohydrates in mycelium of Rozites gongylophora

Rozites gongylophora, a fungus grown by ants of the genus *Atta*, was developed in malt extract liquid medium with pieces of coconut (*Coccus nucifera*) for the production of mycelial mass and determination of carbohydrates. Stationary cultures, 30 and 50 days old, have showed significant differences between the reserve carbohydrate in aerial and sub-aerial mycelia. Total carbohydrates, trehalose, glycogen and glucan have showed higher concentrations in the sub-aerial mycelium and the 50 days old mycelium have showed 61,98% and 41,83% more carbohydrates than the 30 days old one, respectively for the aerial and sub-aerial forms.

Introdução

As formigas "Attini" cultivam um fungo que, em condições propícias, desenvolve estruturas nas extremidades das hifas denominadas "Kolhrabi" (8), gongilídios ou estáfilos (15), que se constituem no principal alimento desses insetos (2, 8, 14).

* Parte da Tese de Mestrado do primeiro autor.

O fungo de *Atta colombica tonsipes* possui rico conteúdo nutritivo (7); os estáfios do fungo cultivado por *Atta sexdens* são mais ricos em lipídios e carboidratos que a hifa e mais pobres em proteínas (10).

No Brasil, avaliaram-se os teores em proteína bruta de fungos cultivados por *Atta sexdens rubropilosa* Forel. e *Atta capiguara* Gonçalves (4) e constatou-se a ocorrência de hidrocarbonetos alifáticos saturados, álcoois primários alinfáticos saturados de alto peso molecular e ceras, no fungo de *Atta sexdens rubropilosa* (5). Os teores de proteína total na matéria seca de *Rozites gongylophora*, isolado de saúveiros de *Atta sexdens*, variam de 25,62% a 46,69%, quando cultivado em vários meios (9).

O presente trabalho foi realizado com o intuito de se conhecer os conteúdos de carboidratos totais e de alguns carboidratos de reserva e estruturais de *R. gongylophora* avaliados no micélio aéreo (estáfios) e sub-aéreo (hifas comuns), em diferentes condições de cultivo e em diferentes maneiras de preparo do material para dosagem.

Material e Métodos

Microrganismo - Fungo *Rozites gongylophora*, isolado de saúveiros de *Atta sexdens*, fornecido pelo Instituto Biológico de São Paulo.

Meio de cultivo - Meio de malte a 2% (100ml) com 35g de coco (*Coccus nucifera*) em pedaços, pH 5 (M.M.L.C.).

Separação e preparo do micélio aéreo e sub-aéreo - *R. gongylophora* foi cultivado em M.M.L.C. por períodos de 30 a 50 dias, em cultura estacionária, à temperatura ambiente. O micélio total foi subdividido em duas frações: aérea - porção micelial superficial (cerca de 0,4cm) e sub-aérea - porção inferior a 0,4cm. Os micélios aéreo e sub-aéreo foram retirados dos frascos de cultura com auxílio da alga de inoculação, pinças e tesouras, sendo então lavados exaustivamente com água destilada e secados em dessecador a vácuo contendo CaCl_2 , até peso constante. No preparo das amostras para dosagem, cerca de 70mg de material fresco e 30 a 50mg de material seco, tanto para o micélio aéreo quanto para o sub-aéreo, foram homogeneizados com 4ml de ácido tricloroacético (T.C.A.) 0,5M, em homogeneizador de Potter, sendo então transferidos para frascos Erlenmeyers, adicionando-se água destilada até um volume de 100ml (matéria fresca) ou 200ml (matéria seca) exatamente antes da dosagem.

Detectção e avaliação de carboidratos - Para a obtenção de trealose, glicogênio, glicana e manana, seguiu-se o esquema de fracionamento de acordo com Trevelyan & Harrison (13). As dosagens de carboidratos totais e dos carboidratos de reserva e estruturais foram efetuadas nas frações miceliais secadas em dessecador como também nas frações miceliais frescas. No material seco, a avaliação foi efetuada em duas condições: a) imediatamente após a secagem dos micélios; b) após estocagem no dessecador por 20 dias. Foram realizadas duas dosagens seguindo-se a técnica de Martelli & Panek (6), modificada (1), empregando-se reagente de antrona.

Resultados e Discussão

Resultados experimentais revelaram que a secagem em dessecador a vácuo, contendo CaCl_2 , até peso constante, mantém cerca de 5 a 9% de água nos micélios. Sendo assim, parece conveniente a pronta avaliação de nutrientes, logo após a secagem dos micélios em dessecador a vácuo.

A estocagem dos micélios, deve ter permitido a continuidade das atividades metabólicas; materiais estocados, na avaliação, apresentaram teores em glucídios totais inferiores aos daqueles que foram secados e imediatamente empregados nas dosagens (Tabela 1).

O tempo de cultivo também influenciou nos resultados; as culturas mais velhas (micélio aéreo e sub-aéreo) mostraram-se mais ricas em carboidratos (Tabela 1).

Culturas de 50 dias apresentaram teores mais elevados em trealose e glicogênio, em relação às culturas de 30 dias, tanto para o micélio aéreo como para o sub-aéreo (Tabela 2), enquanto os conteúdos em glicana do micélio aéreo de 30 dias (1,25%) não foram muito distintos dos obtidos para o micélio sub-aéreo (1,31%). Para os cultivos de 50 dias, a diferença se acentuou, obtendo-se 3,66% de glicana na fração sub-aérea (Tabela 2). Os teores de trealose, glicogênio e glicana do micélio sub-aéreo perfazem conjuntamente 85% dos glucídios totais para as culturas de 30 dias, e para o micélio aéreo de 50 dias, eles totalizam 44%. Essas diferenças acentuadas indicam que outros glucídios não determinados estão variando.

O fungo de *Atta colombica tonsipes* (7), cultivado em meio agar batata dextrose apresentou teores de 27% e 16%, em peso seco, respectivamente, para glucídios totais e trealose; com relação a esse último componente, pode-se salientar que há considerável diferença entre os níveis obtidos para *R. gongylophora* (máximo de 6,55%) e o fungo de *Atta colombica tonsipes* (16%), mas para os dois microrganismos, o teor em trealose aumentou com a idade do fungo.

Trealose em fungos parece ter uma função de reserva translocável (3) servindo provavelmente como fonte de energia durante a germinação ou formação de esporos (11, 12). Como o fenômeno de esporulação não é comum em *R. gongylophora*, é de se supor que o teor em trealose deva aumentar nas culturas mais velhas, que também encerram os mais elevados conteúdos em glicogênio, a exemplo de outros fungos que acumulam glicogênio em zonas hifais mais velhas.

Manana não foi detectada nos micélios aéreo e sub-aéreo; ela é comum em leveduras, mas não em fungos, em geral (3).

Tabela 1 - Porcentagens de glucídios totais nos micélios aéreo e sub-aéreo de *R. gongylophora*, cultivado em M.M.L.C. pH 5, durante 30 e 50 dias.

Símbolos: 1 = matéria fresca; 2 = matéria secada em dessecador a vácuo e imediatamente avaliada; 3 = matéria secada em dessecador a vácuo e estocada até a avaliação

Tipo de micélio	Tempo de cultivo (dias)	Material usado na análise	Conteúdo de carboidratos (% peso seco)
Aéreo	30	1	23,48
	30	2	23,83
	30	3	13,98
	50	1	38,60
Sub-aéreo	30	1	29,50
	30	2	31,92
	30	3	16,69
	50	1	41,84

Tabela 2 - Porcentagens (em peso seco) de glucídios totais, trealose, glicogênio, glicana e manana na matéria fresca de *R. gongylophora* (micélio aéreo e sub-aéreo) cultivado em M.M.L.C. durante 30 e 50 dias

Tipo de micélio	Tempo de cultivo (dias)	Glucídios				
		Totais (%)	Trealose (%)	Glicogênio (%)	Glicana (%)	Manana (%)
Aéreo	30	23,48	3,99	8,93	1,25	0
	50	38,60	5,05	10,35	1,77	0
Sub-aéreo	30	29,50	5,05	18,83	1,31	0
	50	41,84	6,55	20,20	3,66	0

Referências Bibliográficas

- Angelis, D.F. de; Oliveira, M.C.F.L. de & Furletti, M.E.M. - Teor de glucídios totais e trealose em algumas espécies do gênero *Candida*. Rev. Microbiol. (S. Paulo), 10:153-156, 1979.

2. Belt, T. - The naturalist in Nicaragua. London, John Murray, 1874.
3. Cochrane, V.W. - Physiology of fungi. London, John Wiley & Sons, 1958.
4. Kiyan, C. & Serzedello, A. - Investigações sobre os fungos das formigas saúvas (*Atta* sp.) visando o cultivo em laboratório, conhecimento de suas composições químicas e bioquímicas para possível emprego na alimentação animal. Cie. e Cult., 18:182, 1966.
5. Lopes, J.L.C. & Gilbert, B. - Constituintes químicos do fungo de *Atta sexdens rubropilosa*, Forel, 1908 (Hymenoptera Formicidae). Arq. Inst. Biol. (São Paulo), 44:75-83, 1977.
6. Martelli, H. & Panek, A. - Bioquímica experimental. Rio de Janeiro, Livro Técnico, 1968.
7. Martin, M.M.; Carman, R.M. & MacConnell, J.G. - Nutrients derived from the fungus cultured by the fungus growing ant *Atta colombica tonsipes*. Ann. Entomol. Soc. Amer., 62:11-13, 1969.
8. Moeller, A. - Die Pilzgarten einiger sudamerikanischer Ameisen. Schimper's Botan. Mitt Tropen, 6:1-127, 1893.
9. Poltronieri, A. & Serzedello, A. - Produção de biomassa de *Rozites gongylophora* visando emprego como complemento alimentar. Rev. Microbiol. (S. Paulo), 11:131-135, 1980.
10. Quinlan, R.J. & Cherrett, J.M. - The role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.). Ecological Entomology, 4:151-160, 1979.
11. Sussman, A.S. - The role of trehalose in the activation of dormant ascospores of *Neurospora*. Quart. Rev. Biol., 36:109-116, 1961.
12. Sussman, A.S. - The dormancy and germination of fungus spores. Symp. Soc. Exptl. Biol., 23:99-121, 1969.
13. Trevelyan, W. & Harrison, J.S. - Yeast carbohydrate fractions, separation from nucleic acid: analysis and behavior during anaerobic fermentation. Biochem. J., 63:23-33, 1956.
14. Weber, N.A. - Evolution in fungus growing ants. Proc. 10th Int. Congr. Entomol. (Montreal), 1:459-474, 1958.
15. Wilson, E.O. - The insect societies. Cambridge, The Belknap Press of Harvard University, 1976.

QUANTIFICAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE HEPTADECANO E HEXADECANO POR MICOBACTÉRIAS ATRAVÉS DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-GASOSA*

Angela Maria Werneck
& Paulo Pinto Gontijo Filho

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

Resumo

Análise por cromatografia líquido-gasosa, da utilização de heptadecano, hexadecano, diesel e petróleo por estirpes de *M. fortuitum* e uma de *M. triviale* isoladas de solo e de esgoto. Quantificação de consumo de hidrocarbonetos e comparação dos perfis de degradação de petróleo e diesel pelas estirpes, confirmando os resultados obtidos na experiência de crescimento.

Summary

Gas-liquid chromatography quantification of heptadecan and hexadecan degradation by mycobacterias

Gas-liquid chromatography was performed to analyse the ability of four strains of *M. fortuitum* and one of *M. triviale* isolated from soil and sewage to degrade heptadecan, hexadecan, diesel fuel and petroleum. This assay allowed the quantification of hydrocarbons consumption and profile comparison of diesel fuel and petroleum degradation by mycobacteria.

Introdução

A cromatografia líquido-gasosa tem sido empregada como técnica de grande sensibilidade na análise do petróleo bruto (8) e na avaliação da biodegradabilidade de suas frações (1, 3, 5, 10). Através desta técnica, Pinto & col. (6) quantificaram o consumo de hidrocarbonetos por espécies de micobactérias, isoladas de água poluída com resíduos de petróleo.

Neste trabalho, foi quantificada a degradação de heptadecano e hexadecano e analisado o consumo de petróleo e diesel, por estirpes micobacterianas, isoladas de solo poluído com resíduos de refinaria, solo de jardim e esgoto (2).

Material e Métodos

Foram selecionadas quatro estirpes de *M. fortuitum* e uma de *M. triviale*, provenientes de amostras de solo e esgoto (2), paralelamente com as respectivas amos-

* Trabalho realizado no Instituto de Microbiologia UFRJ, com recursos da FINEP (Convênio 527/CT).

tras-tipo, para análise cromatográfica líquido-gasosa.

Utilizou-se a técnica proposta por Walker, Colwell & Petrakis (10), modificada. Foram adicionados 5ml de clorofórmio aos tubos com meio inoculado e não inoculado, agitando-se vigorosamente e deixando-se em repouso por alguns segundos. O extrato foi transferido para outro tubo, com auxílio de pipeta de Pasteur e adicionado de sulfato de sódio anidro. O material foi filtrado em papel Whatman nº 5, concentrado sob atmosfera de nitrogênio até a secura e ressuspensão em clorofórmio. Adicionou-se octanol, como padrão interno e injetou-se a mistura em cromatógrafo líquido-gasoso (Varian - modelo 2440), equipado com detector de ionização de chama, contendo uma coluna de aço inoxidável (6'x1/8") SE-30, com temperatura programada para 6°C por minuto.

Os hidrocarbonetos foram quantificados pelo método da triangulação nos traços do registrador, multiplicando-se a altura, pela largura da metade da altura dos picos. O consumo do diesel II e do petróleo foi avaliado, através da comparação com os perfis dos cromatogramas dos controles não inoculados.

Resultados

Nesta experiência observou-se que a degradação de hidrocarbonetos (Tabela 1), foi proporcional ao crescimento registrado por Barreto & Gontijo (2), excetuando-se os resultados obtidos com *M. triviale* (estirpe nº 123), quanto ao consumo de heptadecano.

Os perfis obtidos com a estirpe nº 58 (Fig. 1b) e o nº 36 (Fig. 1a) de *M. fortuitum*, que utilizaram, respectivamente, 23,68% e 81,57% de hexadecano quando comparados ao controle (Fig. 1a). O consumo de heptadecano pelas estirpes referidas acima, mostrou resultado semelhante (Fig. 2a, 2b, 2c).

A degradação do diesel pela estirpe nº 36 pode ser observada, comparando-se os perfis das Figuras 3a e 3c. A utilização do petróleo foi ainda mais evidente (Fig. 4a, 4c). Em relação a estirpe nº 58, diferiram muito pouco, (Fig. 3b, 4b) quando comparados ao padrão não inoculado (Fig. 3a, 4a).

Discussão

Os óleos crus variavam largamente, em composição e podem ser classificados segundo seus componentes parafínicos, naftênicos, aromáticos e asfaltênicos (11). Neste estudo, foi utilizado petróleo proveniente da Arábia Saudita e seu derivado óleo diesel, composto principalmente de parafinas de 12 ou mais átomos de carbono. O componente parafínico é o mais importante, com relação à biodegradabilidade do petróleo (11).

Através de cromatografia líquido-gasosa, foi demonstrado que esta fração é a primeira a ser metabolizada por microrganismos (3). Apesar deste fato, foi verificado que apenas as estirpes de *M. fortuitum* degradaram os componentes da fração diesel e o petróleo não destilado.

Vários pesquisadores utilizaram a cromatografia líquido-gasosa para identificar ácidos graxos de micobactérias (4, 7, 8). Com o emprego desta técnica, já foi quantificado o consumo de haptadecano e hexadecano por estirpes de *M. fortuitum*, *M. smegmatis* e *M. dierhoferi*, isoladas de água poluída com resíduos domésticos e de refinaria de petróleo (6).

Os resultados da análise cromatográfica da degradação de hidrocarbonetos, obtidos nesta investigação, confirmaram os achados obtidos anteriores (6) mostrando estrei-

Tabela 1 - Percentagem de consumo de hidrocarbonetos evidenciada pela cromatografia líquido-gasosa.

Símbolos: * = Resultado obtido na experiência de crescimento em meio mineral adicionado de hidrocarbonetos (Barreto & Gontijo, dados ainda não publicados)

Estirpes	Heptadecano	Hexadecano
<i>M. fortuitum</i>		
ATCC- 6841	42,56 ++*	72,63 ++
36	81,28 ***	81,57 ***
58	29,23 ***	23,68 +
138	60,51 +	58,94 ++
150	17,18 +	36,84 +
<i>M. triviale</i>		
ATCC- 23293	92,30 ***	100,00 ***
123	46,15 (+)	26,31 (+)

ta correlação com os dados avaliados através dos ensaios de crescimento (2).

Figura 1 - Análise cromatográfica líquido-gasosa da utilização de hexadecano por *M. fortuitum*. Perfil do controle não inoculado (a), da estirpe nº 58 (b) e da estirpe nº 36 (c)

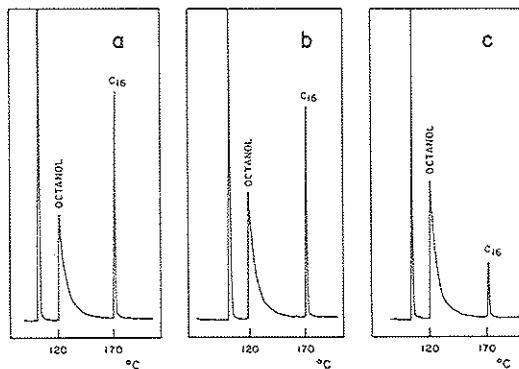


Figura 3 - Análise cromatográfica líquido-gasosa da utilização de diesel por *M. fortuitum*. Perfil do controle não inoculado (a), da estirpe nº 58 (b) e da estirpe nº 36 (c)

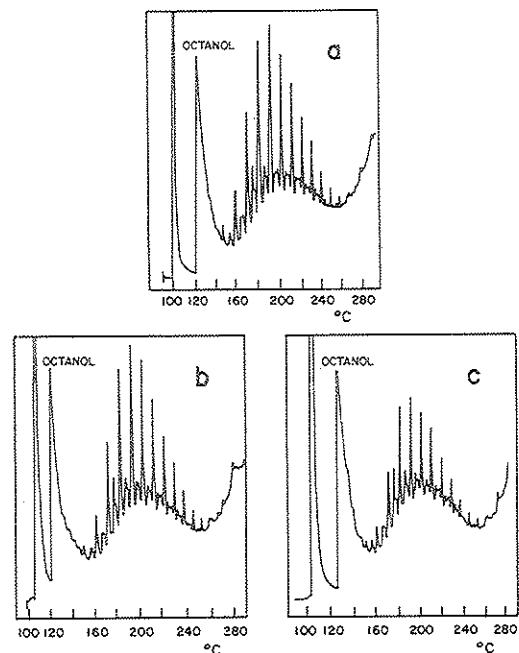


Figura 2 - Análise cromatográfica líquido-gasosa da utilização de heptadecano por *M. fortuitum*. Perfil do controle não inoculado (a), da estirpe nº 58 (b) e da estirpe nº 36 (c)

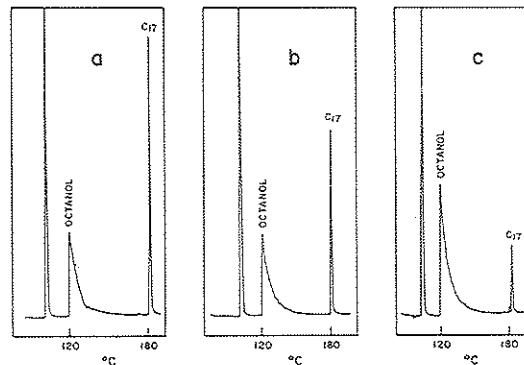
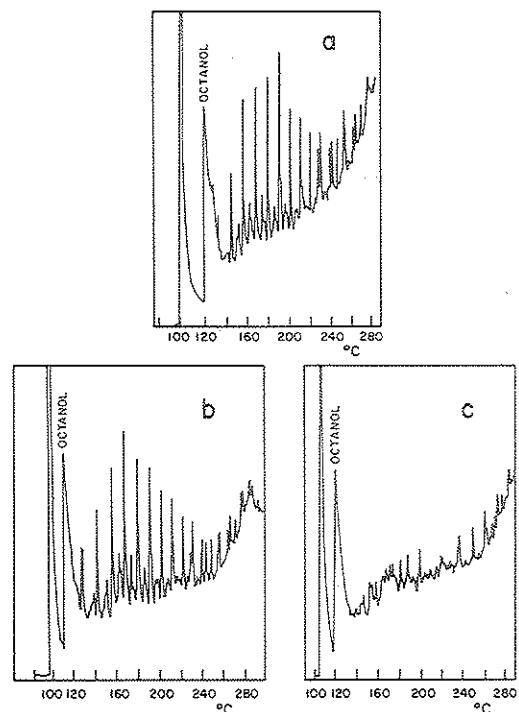


Figura 4 - Análise cromatográfica líquido-gasosa da utilização de petróleo por *M. fortuitum*. Perfil do controle não inoculado (a), da estirpe nº 58 (b) e da estirpe nº 36 (c)



Referências Bibliográficas

1. Austin, B.; Calomiris, J.J.; Walder, J.D. & Cowell, R.R. - Numerical taxonomy and ecology of petroleum-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 34:60-68, 1977.
2. Barreto, A.M.W. & Gontijo Filho, P.P. - Crescimento de micobactérias isoladas de solo e de esgoto, em presença de petróleo, diesel e hidrocarbonetos. *Rev. Microbiol.*, 13(2):101-109, 1982.
3. Jobson, A.; Cook, F.D. & Westlake, D.W.S. - Microbial utilization of crude oil. *Appl. Microbiol.*, 23:1082-1089, 1972.
4. Julák, J.; Turecek, F. & Miková, A. - Identification of characteristic branched chain fatty acids of *Mycobacterium kansasii* and *gordonae* by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, 190:183, 1980.
5. Mulkins-Phillips, G.J. & Stewart, J.E. - Distribution of hydrocarbon: utilizing bacteria in Northwestern Atlantic waters and coastal sediments. *Can. J. Microbiol.*, 20:955-962, 1974.
6. Pinto, A.S.; Fonseca, L.C.; Cardoso, C.L.; Bonfin, M.E.; Gontijo Filho, P.P. & Angluster, J. - Análise cromatográfica gás-líquida da utilização de hidrocarbonetos por micobactérias. Resumos do X Congresso Brasileiro de Microbiologia, 1979.
7. Tisdall, P.A.; Roberts, G.D. & Anhalt, J.P. - Identification of clinical isolates of mycobacteria with gas-liquid chromatography alone. *J. Clin. Microbiol.*, 10:506-514, 1979.
8. Thoen, C.O.; Kalrson, A.G. & Ellefson, R.D. - Comparison by gas-liquid chromatography of fatty acids of *Mycobacterium avium* and some other nonphotochromogenic mycobacteria. *Appl. Microbiol.*, 22:560, 1971.
9. Walker, J.D. & Colwell, R.R. - Enumeration of petroleum-degrading microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 31:198-207, 1976.
10. Walker, J.D.; Colwell, R.R. & Petrakis, L. - Microbial petroleum degradation: application of computerized mass spectrometry. *Can. J. Microbiol.*, 21:1760-1767, 1975.
11. Westlake, D.W.S.; Jobson, A.; Phillippe, R. & Cook, F.D. - Biodegradability and crude oil composition. *Can. J. Microbiol.*, 20:915-928, 1974.

BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO NAS RAÍZES, CAULES E FOLHAS DE CANA-DE-AÇÚCAR (*SACCHARUM SP.*)

Luiz Antonio Graciolli

Deptº de Biologia UNESP
Campus de Ilha Solteira
Caixa Postal 31
15378 Ilha Solteira SP, Brasil

José Renato de Freitas
& Alaides Puppin Ruschel

Deptº de Microbiologia de Solos
CENA/ESALQ/USP
Caixa Postal 96
13400 Piracicaba SP, Brasil

Resumo

Bactérias fixadoras de nitrogênio, foram isoladas de raízes, caules e folhas de cana-de-açúcar e identificadas através de testes bioquímicos (API 20E) englobados em um programa de computador. *Enterobacter cloacae*, *Erwinia herbicola* e *Azotobacter vinelandii* ocorreram associadas à parte externa das raízes. *E. herbicola*, *A. vinelandii* e *Derria gummosa* foram isoladas de folhas secas. Um isolado de folhas jovens (fotossintetizantes) não foi possível a identificação pelo método utilizado, mas pressupostamente pertence a família *Enterobacteriaceae*. A população de bactérias no interior dos colmos variou quantitativa e qualitativamente. Colmos intermediários (aproximadamente ao meio do caule), pareceram conter mais bactérias que os basais e/ou apicais. *E. herbicola* foi encontrada nos colmos intermediários e apicais, enquanto *A. vinelandii* somente nos apicais. Isto indica que num plantio de cana-de-açúcar a distribuição das bactérias é aleatória. Não foi obtido nenhum isolado pertencente ao gênero *Azospirillum*.

Summary

*Nitrogen fixing bacteria isolated from roots, stems and leaves of sugarcane (*Saccharum sp.*)*

Nitrogen fixing bacteria were isolated from roots, stems and leaves of sugarcane and identified by using the Api system (API 20E) assisted by a computer program. *E. cloacae*, *E. herbicola* and *A. vinelandii* were found associated to the outer part of roots. *E. herbicola*, *A. vinelandii* and *D. gummosa* were isolated from dry old leaves. Only one isolated from young leaves, was not possible to identify by the Api system used. This isolated belonged to the *Enterobacteriaceae* family. The bacteria populating the inner part of stem varied quantitatively and qualitatively. Intermedium seems to have more bacteria than

the basals and or apex stem. This shows that in a sugarcane field the bacteria distribution occurs at random. No *Azospirillum* was found associated to the sugarcane.

Introdução

Utilizando-se da técnica de ^{15}N , foi provada a fixação biológica de nitrogênio (N_2) em cana-de-açúcar (25). Vinte e cinco a trinta por cento do nitrogênio na planta é proveniente da fixação pelas bactérias (27). O sitio ativo da fixação de N_2 está associado às raízes (16, 25).

As bactérias encontram-se no interior do colmo, concentradas na região nodal e tornam-se ativas quando emergem das raízes após germinação (10, 16). A atividade da nitrogenase (NA) foi observada em altas diluições ($10^3 - 10^5$), tanto de folhas jovens (fotossintetizantes), como de folhas secas (10) indicando grande populações de fixadoras de N_2 na filosfera.

Foram realizados diversos trabalhos de identificação das bactérias fixadoras de N_2 em cana-de-açúcar. Baseados na morfologia das células Ruschel & col. (28), identificaram *Azotobacter*, *Beiherinckia*, *Caulobacter*, *Clostridium* e *Derrxia*; Purchase (18), isolou bactérias semelhantes a *Azospirillum*; Gracciolli & Ruschel (7) observaram *Azotobacter*, *Beiherinckia*, *Bacillus* e *Azospirillum* e muitas formas esporulantes, principalmente aquelas obtidas de folhas completamente secas. Com base em testes bioquímicos e na morfologia das células, Hegazi & col. (12) identificaram *Azotobacter vinelandii* e *Azospirillum lipoferum*. Rennie (19) a partir de isolados feitos no Brasil, identificou através de testes bioquímicos (API 20E) englobados em um programa de computador, populações de *Derrxia gummosa*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus polymyxa* e *Azotobacter vinelandii* em idênticas proporções.

O presente trabalho mostra, utilizando o sistema API 20E, as bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de raízes, caules e folhas de cana-de-açúcar.

Material e Métodos

Utilizou-se cana-de-açúcar (NA 56-79) cultivada em Latossolo Roxo, com 11 meses, obtida na Usina Modelo, Piracicaba, Estado de São Paulo.

Raízes - As raízes foram coletadas próximo às touceiras, a uma profundidade não superior a 20cm, de três locais diferentes do canavial. No laboratório, após 30 minutos aproximadamente, foram misturadas e divididas em duas amostras de 10g cada. A primeira não foi esterilizada; a segunda superficialmente segundo metodologia de Vincent (32).

Caules - Três caules de diferentes touceiras foram cortados rente ao solo e divididos em três partes de acordo com sua posição: colmo basal (próximo ao solo), colmo intermediário (aproximadamente ao meio do caule) e colmo apical (próximo do cartucho). Consegiu-se assim, três amostras de colmos com nós intactos. De cada amostra, foi removida a casca com auxílio de uma lâmina e pinça esterilizadas e procedeu-se o isolamento da parte interna.

Folhas - Folhas jovens (fotossintetizantes) ou totalmente secas foram coletadas com bainha de diferente touceira. Cortando-se pequenos pedaços transversais (1-3cm) das folhas (incluindo bainha), obteve-se uma amostra de folhas verdes (10g). O mesmo procedimento foi feito para obter amostra de folhas secas. Antes da maceração as folhas verdes ou secas foram lavadas com água estéril por 5 vezes.

Meios de cultura, enumeração e atividade da nitrogenase das bactérias isoladas das diferentes partes da planta - Maceração das diferentes partes da planta foi realizada em liquidificador (baixa rotação) por 1 min. As diluições decimais foram realizadas em tampão fosfato (0,05M, pH 7.0), até 10^{-9} . De cada diluição 0,1ml foi distribuído em placas (2 réplicas) contendo meio carbono combinado - CC (20) e em

frascos (10ml) contendo 3ml do meio semi-sólido. As placas foram incubadas aerobicamente a 30°C e as colônias foram contadas após 48 e 72 horas. Os frascos, após a incubação por 24 horas, a mesma temperatura, foram fechados com rocha de borracha (saba-seal), previamente esterilizados e a NA foi determinada pelo método da redução de acetileno (11). Utilizou-se o cromatógrafo de gás Beckman G-65, com detector de ionização de chama de H₂ a 175°C, com coluna de vidro 1/8" (diâmetro interno x 1,60m), contendo Poropak N de 8-100 "mesh" a 110°C.

Colônias individuais das placas com CC, associadas àquelas diluições positivas para atividade de redução de acetileno (ARA) no meio semi-sólido, foram transferidas em frascos de 35ml contendo 20ml do meio CC líquido. Após 24 horas de incubação a 30°C, sob agitação rotativa, foram fechados com rolha de borracha e ARA foi determinada. Os isolados com ARA, foram estriados nos meios agar nutritivo-AN (checkar a pureza e para testes de identificação), MacConkey's - MC (5) para as supostas *Enterobacteriaceae* e MacConkey's com carbenicilina - MCC para favorecer a identificação de *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloacae* e por falta de crescimento de *Erwinia herbicola* (19). Placas com meio sólido contêm 1,2% de agar e meio semi-sólido 0,18% de agar.

Identificação dos microrganismos fixadores de nitrogênio - Todos os isolados de bactérias com ARA, foram identificados através de 27 testes bioquímicos, sistema API 20E (1), cujos resultados foram passados em programa de computador (13). Este sistema de identificação, comparado com os testes padrões de identificação bioquímica (4) é altamente consistente e reproduzível (19).

Para provar a integridade dos meios seletivos e o método bioquímico, 4 culturas conhecidas de bactérias foram usadas como controle. Esses organismos foram selecionados por suas diferenças em motilidade, capacidade de crescer em meio AN, CC, MC e MCC e de reduzir C₂H₂ (Tabela 1).

Resultados

Bactérias fixadoras de N₂ nas raízes. - A esterilização superficial das raízes diminui o número total de bactérias (Tabela 3) e parece ter eliminado as bactérias que reduzem o C₂H₂ (Tabelas 2 e 3). Das raízes não esterilizadas, 61% da população total reduziu C₂H₂ (Tabela 3). Desses, foram identificadas: *Enterobacter cloacae* (37%), *Azotobacter vinelandii* (37%), *Erwinia herbicola* (13%). O restante (13%) não foi identificado (Tabela 2).

Bactérias fixadoras de N₂ nos colmos - Nenhuma bactéria que reduz C₂H₂ foi isolada de colmos basais; entretanto, 100% das bactérias presentes nos colmos intermediários e 60% das presentes nos colmos apicais apresentaram essa capacidade (Tabela 3). No primeiro caso, 25% era *Erwinia herbicola* e 75% desconhecida. No entanto, dessas últimas, um isolado pelo bom crescimento no meio MC, pode ser classificado, pressupostamente, como sendo membro da família *Enterobacteriaceae*. Este fato também ocorreu nos isolados dos colmos apicais onde dos 60% que reduziu C₂H₂, 33% era *Erwinia herbicola*, 33% *Azotobacter vinelandii* e 33% pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Os colmos intermediários continham mais bactérias que os demais (Tabela 3).

Isolamento das folhas - Apenas um dos isolados das folhas jovens (11%) reduziu C₂H₂

Tabela 1 - Características das bactérias conhecidas que fixam N₂ usadas como controle.

Símbolos: aCC = carbono combinado, NA = agar nutritivo, MC = MacConkey's e MCC = MacConkey's + carbenicilina; b = no meio CC; c = nif⁻ mutante

Bactéria	Motilidade	Crescimento em:				Redução de acetileno b
		CC	NA	MC	MCC	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> M5a1	-	+	+	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i> 107	-	-	+	+	+	- c
<i>Erwinia herbicola</i> R1	+	+	+	+	-	+
<i>Azotobacter vinelandii</i> AVOP	+	+	+	-	-	+

(Tabela 3). Das folhas secas, 43% das bactérias isoladas reduziu C₂H₂ (Tabela 3), 33% foi identificado como sendo *Erwinia herbicola*, 17% *Azotobacter vinelandii*, 17% *Derria gummosa* e 33% não foi identificado (Tabela 2) e esse não pertencia à família Enterobacteriaceae.

Tabela 2 - Identificação e percentagem de bactérias que reduziram C₂H₂, isoladas de raízes, colmos e folhas de *Saccharum* sp. var. NA 56-79, colhidas no campo, com 11 meses de idade.

Símbolos: a = diluição na qual foi feito o isolamento; b = Enterobacteriaceae; c = não identificada

	Parte analisada						
	Raiz		Colmo			Folha	
	não esterilizada (-5) ^a	esterilizada (-3)	basal (-3)	intermediário (-4)	apical (-3)	verdes (-4)	secas (-4)
<i>Enterobacter cloacae</i>	37	0	0	0	0	0	0
<i>Erwinia herbicola</i>	13	0	0	25	33	0	33
<i>Azotobacter vinelandii</i>	37	0	0	0	33	0	17
<i>Derria gummosa</i>	0	0	0	0	0	0	17
Desconhecidas	13 ^c	0	0	75 ^{b,c}	33 ^b	11 ^b	33 ^c

Discussão

Os diferentes agentes de esterilização superficial de raízes de cana-de-açúcar e de outras gramíneas (2, 7, 12, 17, 18, 30) não chegam a eliminar totalmente as bactérias fixadoras de N₂, como ocorreu no presente trabalho. É provável que, pelo menos na época em que foi realizado o isolamento, os organismos estivessem localizados na rizosfera e não associados intimamente às raízes das plantas.

Das bactérias isoladas de raízes não esterilizadas foi possível a identificação de 87%; o restante (13%), não identificado, não pertencia a Enterobacteriaceae (Tabela 2). *Erwinia herbicola* e *Azotobacter vinelandii* foram isoladas das raízes não esterilizadas, interior dos colmos e das folhas secas. Este fato vem a favor da ideia de que talvez o colmo seja a fonte inicial do inóculo das bactérias fixadoras de N₂ (26).

Tabela 3 - Número total e percentagem de bactérias fixadoras de N₂ isoladas de raízes, colmos e folhas de *Saccharum* sp. var. NA 56-79, colhidas no campo com 11 meses de idade.

Símbolos: a = crescidas no meio CC sólido, após 72 horas de incubação; m.f. = matéria fresca; b = crescidas no meio CC semi-sólido

Fator	Raiz		Colmo			Folhas	
	não esterilizada	esterilizada	basal	intermediário	apical	verdes	secas
Bactéria/g m.f. (X10 ⁵) ^a	1.100	1,7	0,4	10	0,5	10	86
% isolados positivos para ARA ^b	61	0,0	0,0	100	60,0	11	43

A superfície foliar é o meio ambiente por excelência para o crescimento microbiano em geral e especialmente para os organismos fixadores de N₂ (23, 24). Bessens (3) isolou *Klebsiella* de folhas de gramíneas tropicais, tendo Graciolli & Ruschel (10) obtido diluições positivas para ARA em folhas de cana-de-açúcar, com ou sem esterilização superficial em diferentes meios de cultura. No presente trabalho, 43%

das colônias isoladas das folhas secas reduziu C₂H₂ (Tabela 3), constituindo diferentes populações de bactérias fixadoras de N₂ (Tabela 2). *Derria gummosa* (17%) só foi encontrada nas folhas secas (Tabela 2). Dois isolados não foram identificados e esses não eram *Enterobacteriaceae*. Dos isolados das folhas jovens (fotossintetizantes), 11% reduziu C₂H₂ (Tabela 3) e pressupostamente pertence a *Enterobacteriaceae*. Assim, há possibilidade das folhas serem outro inóculo natural deste sistema, pois quando totalmente secas, ao cair no solo ou pela lavagem de água de chuva, contribuirão para aumentar ou manter a população de bactérias fixadoras de N₂ neste sistema.

A atividade de nitrogenase (C₂H₂) dos colmos diverge de acordo com a variedade, estação do ano e posição de cada colmo no caule (8, 10, 26), no entanto, ficou claro, agora, que a população de bactérias fixadoras de N₂, no interior de cada colmo, varia quantitativa e qualitativamente (Tabelas 2 e 3). Isto indica que, num plantio de cana-de-açúcar, a distribuição das bactérias que fixam N₂ é aleatória.

No isolamento de *Azospirillum*, é comum a utilização do meio contendo malato como fonte de carbono (6). No entanto, a maioria das bactérias fixadoras de N₂ é capaz de se desenvolver, multiplicar e de reduzir acetileno em diferentes fontes de carbono (15, 21, 31). Dessa maneira, a variação da fonte de carbono entre esses meios não o torna seletivo. Rennie (20) mostrou que o meio CC com glicose, manitol e lactato de sódio como fontes de carbono, é tão eficiente no isolamento de *Azospirillum* quanto o proposto por Dobereiner & Day (6). No presente trabalho não foi encontrado nenhum isolado de *Azospirillum*, contrariamente a outros autores (12, 18, 22, 30). Isso leva a crer que, nesse sistema, a população desses organismos não se mantém constante, diferentemente da associação com o milho, onde foi possível isolar *Azospirillum* por todo o ciclo da planta (9, 14, 29).

Dentre todos os isolados com atividade de nitrogenase, foi possível a identificação de 57%. O restante 43%, não identificado, é na maioria proveniente da parte aérea da planta (Tabela 2). O sistema de identificação API 20E foi destinado primeiramente para identificação de microrganismos pertencentes a *Enterobacteriaceae* (13, 19). Assim, pode fazer parte das não classificadas bactérias entéricas que reduzem C₂H₂ e/ou *Beijerinckia*, uma vez que suas características não foram incluídas como bactérias conhecidas fixadoras de N₂.

Referências Bibliográficas

1. API - Analytical Profile Index: *Enterobacteriaceae* and other gram-negative bacteria. New York, API, Division of Ayerst Laboratories, Plainview, 1979.
2. Baldani, V.L.D. & Dobereiner, J. - Host plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. *Soil Biol. Biochem.*, 12:433-439, 1979.
3. Bessens, E.P.M. - Nitrogen fixation in the phyllosphere of Gramineae. *Agric. Res. Repts.* (Versl. landbouwk. Onderz.) 786, ISBN 90 220 0422 8, 1973.
4. Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E. - Bergey's manual of determinative bacteriology. 8.ed. Baltimore, Williams and Wilkins, 1974.
5. Difco. Difco manual. 9.ed. Detroit, Difco Laboratories, 1967.
6. Dobereiner, J. & Day, J.M. - Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen: fixing sites. In: - Proc. 1st Int. Symp. on Nitrogen fixation, vol. 2. Washington State University Press, p.518-538, 1974.
7. Dobereiner, J.; Marriell, I.E. & Nery, M. - Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* *Beijsenck*. *Can. J. Microbiol.*, 22:1464-1473, 1976.
8. Ferro Costa, J.M.T. & Ruschel, A. P. - Seasonal variation in the microbial populations of sugar cane plants. In: - Associative N₂ fixation. Florida, CRC Press, Vol. II, p.109-118, 1981.
9. Graciolli, L.A.; Freitas, J.R. & Ruschel, A.P. - Atividade da nitrogenase em culturas de enriquecimento de raízes de milho (*Zea mays* L.). Resumo da VIII Reunião de Genética de Microrganismos, Belo Horizonte, 1981.
10. Graciolli, L.A. & Ruschel, A.P. - Microorganisms in the phyllosphere and rhizosphere of sugarcane. In: - Associative N₂ fixation. Florida, CRC Press, Vol. II, p.91-101, 1981.

11. Hardy, R.W.F.; Holsten, R.D.; Jackson, E.K. & Burns, R.C. - The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.*, 43:1185-1207, 1968.
12. Hegazi, N.A.; Eid, M.; Farag, R.S. & Monib, M. - Asymbiotic N₂: fixation in the rhizosphere of sugarcane planted under semi-arid condition of Egypt. *Rev. Ecol. Biol. Sol.*, 16:23-37, 1979.
13. McCarley, E. & Rennie, R.J. - A computer program to interpret multiple biochemical tests to identify dinitrogen-fixing soil bacteria. *Rev. Ecol. Biol. Sol.*, 17:501-507, 1980.
14. Magalhães, F.M.M.; Patriquin, D. & Dobereiner, J. - Infection of field grown maize with *Azospirillum* spp. *Rev. Brasil. Biol.*, 39:587-596, 1979.
15. Okon, Y.; Albrecht, S.L. & Burris, R.H. - Methods for growing *Spirillum lipoferum* and for counting it in pure culture and in association with plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33:85-88, 1977.
16. Patriquin, D.G.; Graciolli, L.A. & Ruschel, A.P. - Nitrogenase activity of sugarcane propagated from stem cutting in sterile vermiculite. *Soil Biol. Biochem.*, 12:413-417, 1980.
17. Pedersen, W.L.; Chakrabarty, K.; Klucas, R.V. & Vidaver, A.K. - Nitrogen fixation (acetylene reduction) associated with roots of winter, wheat and Sorghum in Nebraska. *Applied and Environmental Microbiology*, 35:129-135, 1978.
18. Purchase, B.S. - Nitrogen fixation associated with sugarcane. *Proceedings of the South African Sugar Technologists Association*, p.173-176, 1980.
19. Rennie, R.J. - Dinitrogen-fixing bacteria: computer assisted identification of soil isolated. *Can. J. Microbiol.*, 26:1275-1283, 1980.
20. Rennie, R.J. - A single medium for the isolation of acetylene reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Can. J. Microbiol.*, 27:8-14, 1980.
21. Rennie, R.J. - ¹⁵N-isotope dilution as a measures of nitrogen fixation by *Azospirillum brasiliense* associated with maize. *Can. J. Bot.*, 58:21-24, 1980.
22. Rocha, R.E.M.; Baldani, J.I. & Dobereiner, J. - Host plant specificity in the infection of C₄ plants with *Azospirillum* spp. In: - Associative N₂ fixation. Florida, CRC Press, Vol. II, p.67-69, 1981.
23. Ruinen, J. - The phyllosphere. I - An ecologically neglected milieu. *Plant and Soil*, 15:8-10, 1961.
24. Ruinen, J. - Nitrogen fixation in the phyllosphere. In: - The biology of nitrogen fixation. Amsterdam, North Holland, p.121-169, 1974.
25. Ruschel, A.P.; Henis, Y. & Salati, E. - Nitrogen: ¹⁵ tracing of N-fixation with soil grown sugarcane seedling. *Soli. Biol. Biochem.*, 7:181-182, 1975.
26. Ruschel, A.P. & Ruschel, R. - Varietal differences affecting nitrogenase activity in rhizosphere of sugarcane. *Proceedings of the XVI Congress Int. Soc. Sugarcane Tech.* São Paulo, Brasil, 2:1941-1947, 1977.
27. Ruschel, A.P. & Vose, P.B. - Present situation concerning studies in associative N-fixation sugarcane, *Saccharum officinarum*. L. *Boletim Científico*, 045:28, 1977.
28. Ruschel, A.P.; Orlando F9, J.; Zambello, E. & Henis, Y. - Aerobic and anaerobic nitrogen-fixing bacteria in sugarcane roots. *Proceeding of the XVI Congress of the Int. Soc. Sugarcane Tech.* São Paulo, Brasil, 2:1903-1912, 1978.
29. Scott, C.A.; Magalhães, F.M.M.; Divan, V.L.S. dos & Scott, D.B. - Numbers of *Azospirillum* spp. associated with the roots of field grown maize. In: - Limitation and potentials for biological nitrogen fixation in the tropics. New York, Plenum Press, p.371-372, 1978.
30. Saito, S.M.T. & Graciolli, L.A. - Relationships between *Azospirillum* spp. isolates from maize and sugarcane. In: - Associative N₂ fixation. Florida, CRC Press, Vol. II, p.163-168, 1981.
31. Tarrand, J.J.; Krieg, N.R. & Dobereiner, J. - A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasiliense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.*, 24:967-980, 1978.
32. Vicent, J.M. - A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. Oxford Blackwell Scientific Pub., 1970.

CARACTERIZAÇÃO, TEOR PROTEICO E AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS DE QUATRO CULTURAS DE *BACILLUS* ISOLADAS DE VINHAÇA REPRESADA

Maria Cristina Dantas Vanetti
 Daison Olzany Silva
 & Arnaldo Chaer Borges

Laboratório de Microbiologia
 Deptº de Biologia Geral
 Universidade Federal de Viçosa
 Campus Universitário
 36570 Viçosa MG, Brasil

Resumo

Quatro culturas bacterianas, isoladas da vinhaça de cana-de-açúcar represada, foram caracterizadas e analisadas quanto ao teor proteico e composição em aminoácidos essenciais. Tais isolados foram capazes de crescer em vinhaça de mosto de melado esterilizada e com pH corrigido para 6,5 - 7,0. A faixa ótima de temperatura para crescimento variou de 35 a 45°C. O conteúdo proteico das bactérias variou de 47 a 73,2% e o triptofano foi o aminoácido limitante nas proteínas dos quatro isolados.

Summary

Characterization, protein and essential aminoacids contents of four isolates of Bacillus from distillery slops pond

Four bacterial cultures isolated from sugar cane distillery slops pond were characterized and the contents of protein and essential aminoacids were determined. All of them were able to grow in sterilized distillery slops from molasses after the pH adjustment to 6,5 - 7,0. The optimal temperature range was 35 to 45°C. The bacterial protein content range was 47 to 73,2% and the tryptophan was the limiting aminoacid for all isolates.

Introdução

A vinhaça ou resíduo das destilarias de álcool está disponível em grandes quantidades e apresenta problemas quanto à sua eliminação.

De composição química muito heterogênea, que varia com as diferenças entre processos de obtenção de etanol e procedência e o tipo de mosto empregado, a vinhaça apresenta açúcar residual e outras substâncias fermentáveis que, segundo Aguinaldo (1) podem ser usadas pelos microrganismos, reduzindo o seu efeito poluidor. A produção de gás e fertilizantes, os processos biológicos de estabilização anaeróbia em lagoas, o lodo ativado, a produção de biomassa e de outras substâncias bioquímicas, são exemplos de processos que envolvem microrganismos e são propostos para o tratamento ou aproveitamento da vinhaça (14).

O aproveitamento de resíduos de destilarias como substrato para produção de leveduras, principalmente do gênero *Candida* tem sido recomendado (10, 16, 18). Além de leveduras, outros fungos tais como: *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma viride* (3), *Fu-*

sarium oysporum var. *liri* (15) entre outros, já foram indicados para produção de biomassa em vinhaça.

Na literatura consultada não foi encontrada nenhuma referência ao estudo de bactérias para produção de proteína de unicelulares na vinhaça. Mas estes organismos são usados com a mesma finalidade em inúmeros outros substratos (8, 12).

Este trabalho constitui um estudo preliminar, objetivando a utilização de bactérias cultivadas em vinhaça como fonte de proteína.

Material e Métodos

Isolamento - Para o isolamento das bactérias foi usado como meio de cultura a vinhaça de mosto de melão de cana-de-açúcar, coletada à saída das colunas de destilação, adicionada de 1,5% de ágar-ágár, com pH corrigido de 4,0 para 6,5 - 7,0 com NaOH 5N e esterilizada a 121°C por 15 minutos. Aliquotas de 0,1ml de amostras de vinhaça coletadas às margens da represa de estabilização da Usina São João, em Visconde do Rio Branco, MG, foram espalhadas na superfície do ágar vinhaça. Após incubação a 37°C por 48 horas, foram selecionadas as colônias que se destacaram pelo maior tamanho. A purificação das culturas foi feita em ágar vinhaça e ágar nutritivo (Peptona, 5g; extrato de carne, 3g; NaCl, 3g; Na₂HPO₄, 2g; ágar-ágár, 15g e água destilada, 1 litro). As culturas isoladas foram denominadas de V₁, V₂, V₃ e V₄.

Caracterização - Foram estudadas as características morfológicas e as bioquímicas diferenciais recomendadas pelo Manual de Bergey (6) e por Laskin & Lechevalier (9) para identificação de gênero e espécie. Os meios de cultura, os reagentes e técnicas utilizados nas provas bioquímicas foram segundo recomendações de Harrigan & McCance (7), exceto para os testes de produção de ácido, a partir de diferentes fontes de carbono e produção de gás em glucose, onde foram utilizados meios sugeridos por Gibson & Gordon (6).

Determinação da faixa de pH e temperatura de crescimento - Para determinar o pH ótimo de crescimento utilizaram-se Erlenmeyers de 125ml com 40ml de caldo nutritivo (mesma formulação do ágar-nutritivo, excetuando-se o ágar-ágár) com tampão acetato de sódio 0,2M e ácido acético glacial para obter a faixa de pH entre 4,0 a 5,5; e tampão fosfato 0,2M (Na₂HPO₄ e NaH₂PO₄) para 6,0 a 7,5 (4). Para determinar a temperatura ótima, utilizaram-se Erlenmeyers de 125ml com 40ml de caldo nutritivo e incubados a temperatura de 15, 22, 28, 35, 45, 50, 55 e 60°C.

O crescimento em ambos os experimentos foi determinado em colorímetro Klett Summerson com filtro azul (420nm).

Análise proteica e de aminoácidos - As células para análise do teor protéico e da composição em aminoácidos foram obtidas cultivando-se as bactérias em Erlenmeyers de 100ml com 400ml de caldo nutritivo, mantidos submersos em banho-maria à temperatura ótima de cada isolado, e agitados continuamente em agitador recíproco de braços Burrell, mod. BB. As células foram recolhidas por centrifugação e aproximadamente 2000 x g por 10 minutos, à temperatura ambiente, lavadas 2 vezes em solução salina estéril (NaCl 0,85%) e liofilizadas. A determinação do teor de nitrogênio total e a porcentagem de proteína por Kjeldahl foi segundo os métodos descritos no AOAC (2). A avaliação quantitativa dos aminoácidos foi feita de acordo com técnica da cromatografia de troca iônica, em analisador automático de aminoácido Beckman, mod. 121 segundo Spackman & col. (17) e a dosagem de triptofano segundo método descrito por Miller (11). O valor nutritivo das proteínas das bactérias isoladas foi avaliado de acordo com os valores de cômputo químico e índice de aminoácidos essenciais (13).

Resultados

Foram selecionadas quatro culturas bacterianas, que se destacaram pelo maior crescimento em ágar vinhaça.

As características de bastonetes retos, Gram positivos, crescimento em condições de aerobiose com formação de endosporos e a produção de catalase observadas nas bactérias isoladas (Tabela 1) permitiram classificá-las como membros do gênero *Bacillus*. A comparação dos demais resultados observados nos testes de identificação (Tabela 1) com as características-padrão das espécies do gênero *Bacillus* (6, 9) sugere ser o isolado V₁, *Bacillus licheniformis*; o isolado V₂, *Bacillus sphaericus*; o isolado V₃, *Bacillus cereus* e o isolado V₄, *Bacillus polymyxa*.

O melhor desenvolvimento do isolado V₁ foi observado a pH 6,5 e temperatura de 35°C, do isolado V₂ a pH 7,0 e temperatura de 35°C, do isolado V₃ a pH 6,8 e temperatura de 40°C e isolado V₄ a pH 7,0 e temperatura de 45°C. Nenhuma das espécies isoladas foi capaz de crescer em pH inferior a 5,5.

As bactérias isoladas apresentaram variação no conteúdo protéico (Tabela 2) e a avaliação quantitativa dos aminoácidos por cromatografia de troca iônica mostrou que, com relação aos aminoácidos essenciais, suas proteínas são deficientes em triptofano e aminoácidos sulfurados, quando comparadas com a proteína de referência da FAO/WHO (Tabela 3). Exceção é feita para o isolado V₃ que mostrou altos valores no conteúdo em aminoácidos sulfurados.

Discussão

Os testes bioquímicos aplicados às culturas bacterianas isoladas não forneceram informações suficientes para uma identificação precisa da espécie. Entretanto, é sugerida uma identificação preliminar que poderá ser alterada após testes mais específicos que permitem diferenciar espécies muito relacionadas.

A vinhaça utilizada como substrato apresentou pH igual a 4,0, sendo incapaz de promover o crescimento das bactérias isoladas sem a devida correção do pH. Leveduras e outros fungos estudados para produção de proteína microbiana neste resíduo

Tabela 1 - Resultados dos principais testes aplicados para a caracterização das espécies de *Bacillus*. Símbolos: + = teste positivo; - = teste negativo

	Isolados			
	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
	<i>licheniformis</i>	<i>sphaericus</i>	<i>cereus</i>	<i>polymyxa</i>
Coloração de Gram	+	+	+	+
Forma da célula	bastonete	bastonete	bastonete	bastonete
Crescimento em caldo nutritivo	película superficial	turvo	sedimento	película superficial
Colônias em agar nutritivo	esférica, opacas e rugosas	translúcidas e esféricas	irregulares e opacas	mucoides
Esporos:				
- forma predominante	oval	esférica	oval	oval
- posição predominante	central	terminal	central	subterminal
Dilatação do esporângio	-	+	-	
Crescimento anaeróbio	+	-	+	+
Ácido de glicose	+	-	+	+
Gás de glicose	-	-	-	+
Redução de nitrato	+	-	+	+
Reação Voges Proskauer	+	-	+	+
Produção de indol	-	-	-	-
Hidrólise de amido	+	-	+	+
Hidrólise de caseína	+	-	+	-
Hidrólise da gelatina	+	-	+	+
Crescimento em 5% de NaCl	+	-	+	+
Crescimento em 7% de NaCl	+	-	+	+
Crescimento em 10% de NaCl	+	-	-	+
Produção de catalase	+	+	+	+
Ácido de arabinose, xilose e manitol	+	-	-	+
Crescimento em 10 unidades de penicilina G	+	+	+	-

mostraram-se capazes de crescer, sem a necessidade da correção do pH (3, 15, 18). Todas as bactérias isoladas apresentaram-se com a habilidade de crescer em vinhaça sem diluição.

A faixa de temperatura ótima para o crescimento das bactérias isoladas, variando de 35 a 45°C apresenta vantagens, uma vez que, à temperaturas mais elevadas, pode-se retardar ou inibir o crescimento de leveduras e outros fungos contaminantes, caso venham a ser feitos estudos em vinhaça não esterilizada.

Os valores protéicos das bactérias isoladas apresentaram-se mais elevados que os valores citados para fungos, 31 a 50%, e para leveduras 47 a 53% (8), exceto para o isolado V₃ com aproximadamente 47% de proteína. Observou-se, pelos valores de índice de aminoácidos essenciais, que o isolado V₂, apesar de mostrar um conteúdo protéico maior que as demais bactérias, apresentou o menor índice de aminoácidos essenciais, o que sugere uma proteína de menor valor nutritivo. O isolado V₁ foi, dentre as bactérias isoladas, o que apresentou maiores valores de cômputo químico e índice de aminoácidos essenciais, mostrando deficiência apenas em triptofano e aminoácidos sulfurados, quando comparado com a referência da FAO/WHO.

Tabela 2 - Teor protéico das bactérias isoladas, baseado na análise de nitrogênio total e na soma das porcentagens dos resíduos de aminoácidos (g proteína/100g matéria seca)

Isolados	Proteína	
	N x 6,25	Soma das porcentagens dos resíduos de aminoácidos
V ₁	63,60	56,60
V ₂	80,29	73,20
V ₃	47,10	47,00
V ₄	57,13	57,10

Tabela 3 - Comparação do conteúdo em aminoácidos essenciais das proteínas das bactérias isoladas com os da proteína de referência (FAO/WHO) e os do ovo, apresentando os valores de cômputo químico e índice de aminoácidos essenciais (g aminoácido/100g proteína).

Símbolos: * = Pellet & Young, 1980 (13); ** = FAO, 1970 (5)

Aminoácidos essenciais	Isolados				Proteína referência da FAO/WHO*	Ovo**
	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄		
Isoleucina	5,80	4,33	4,94	4,72	4,00	6,30
Leucina	10,51	6,67	8,76	9,23	7,00	8,80
Lisina	6,32	7,14	6,54	7,35	5,50	7,00
Aminoácidos sulfurados	2,10	1,81	6,95	1,87	3,50	5,80
Aminoácidos aromáticos	8,90	7,91	5,60	8,25	6,00	9,90
Treonina	4,75	3,92	4,50	4,70	4,00	5,10
Triptofano	0,45	trago	0,14	0,33	1,00	1,50
Valina	8,45	5,60	7,38	8,45	5,00	6,80
Total	47,28	37,38	44,81	44,90	-	51,20
Cômputo	30,00	não determinado	9,33	22,0	-	100,00
Aminoácido limitante	Triptofano	Triptofano	Triptofano	Triptofano	nenhum	nenhum
Índice de aminoácidos essenciais	76,07	41,23	67,70	69,73	-	100,00

A possível utilização das bactérias isoladas como proteína de unicelulares dependerá de estudos que possam avaliar a toxicidade destas espécies e segurança para uso na alimentação animal.

Referências Bibliográficas

1. Aguinaldo, J.L. - Utilization of distillery slops for continuous propagation of *Torula* yeast. Sugar News, 51:354-357, 1975.
2. AOAC - Association of Official Analytical Chemists - Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 12.ed. Washington, 1975.
3. Araújo, N.Q.; Visconti, A.S.; Castro, H.F.; Silva, H.G.B.; Ferraz, M.H.A. & Salles Filho, M. - Produção de biomassa fúngica de vinhoto. In: - Anais do Seminário Internacional sobre Tratamento do Vinhoto, Rio de Janeiro, 1976.
4. Bacila, M. - Curso de fisiologia de microrganismos. Curitiba, Instituto de Bioquímica da Universidade do Paraná, 1980.
5. FAO - Aminoacids content of foods. FAO Nutritional Studies nº 24, 1970.
6. Gibson, T. & Gordon, R.E. - Endospore: forming rods and cocci. In: - Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E., eds. - Bergey's manual of determinative bacteriology. 8.ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1974.
7. Harrigan, W.F. & McCance, M.E. - Laboratory methods in food and dairy microbiology. New York, Academic Press, 1976.
8. Kharatyan, S.C. - Microbe as food for humans. Ann. Rev. Microbiol., 32:301-327, 1978.
9. Laskin, A.I. & Lechevalier, H.A. - Handbook of microbiology. 2.ed. Cleveland, CRC Press, 1977.
10. Lin, S.F. - Studies on the production of fodder yeast from alcohol distillation slops of cane molasses. Rep. Taiwan Sugar Exp. Sta., 51:1-18, 1970.
11. Miller, E.E. - Determination of the tryptophan contents of feedstuffs with particular reference to cereal. J. Sci. Food. Agric., 18:381-386, 1967.
12. Nanson, N.J. & Fields, M.L. - Effect of *Lactobacillus fermentum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* and *Pseudomonas maltophilia* singly and in combination on the relative nutritive value of fermented corn meal. J. Food Sci., 47:1294-1295, 1982.
13. Pellet, P.L. & Young, V.R. - Nutritional evaluation of protein foods. Tokyo, The United National University, 1980.
14. Sheehan, G.L. & Greenfield, P.F. - Utilization treatment and disposal of distillery wastewater. Water Res., 14:257-277, 1980.
15. Silva, M.E.S.T. - Produção de proteína de *Fusarium oxysporum* var. *lini* no vinhoto. São Paulo, Universidade de São Paulo, 1980. (Tese M.S.).
16. Souza, L.G. & Lima, V.A. - Produção de levedura alimentar a partir de *Candida tropicalis*. Brasil Açuc., 83:23-35, 1974.
17. Spackman, D.H.; Stein, W.H. & Moore, S. - Automatic recording apparatus for use in the chromatography of aminoacids. Anal. Chem., 30:1190-1206, 1958.
18. Tauk, S.M. - Estudo preliminar da vinhaça como substrato para leveduras. Rev. Microbiol., 7:92-97, 1976.

PURIFICATION OF PHYTOPLANKTON CULTURES WITH DAKIN'S SOLUTION*

Armando Augusto Henriques Vieira

Federal University of São Carlos
Department of Biological Sciences
Via Washington Luiz, Km. 235
13560 São Carlos SP, Brazil

Summary

The use of Dakin's solution (sodium hypochlorite, 0,5%), for purification of cultures of freshwater phytoplankton, involving washings with centrifuge, proved to be an efficient simple method and can be easily used in laboratory routine. The method was tested in cultures of eight species of algae with success.

Resumo

Purificação de culturas do fitoplâncton com solução de Dakin

Utilização da solução de Dakin (hipoclorito de sódio a 0,5%), associada a lavagens por centrifugação, na purificação de culturas unicelulares do fitoplâncton de água doce. O método provou ser de fácil emprego em rotina de laboratório. Foram obtidas oito culturas de espécies diferentes, em condições axênicas.

Introduction

Washings with sodium hypochlorite solution is a method commonly used for high plant tissues and macrophyte algae cultures. However, it is not used in the purification of phytoplankton cultures directly.

In some studies of phytoplankton physiology and in those where unicellular cultures are employed it is essential that algae are grown in axenic condition. However, the obtention of axenic cultures is difficult and time consuming. Several classical methods are used for culture purification: mechanical washings of cells by centrifugation and pipetting under microscope observation (5); antibiotics solutions at different concentrations and exposure time (1, 4, 7 e 8); ultra-violet radiations for blue-green algae cultures (2).

Mechanical washings is probably the most used method, although time consuming. Additionally the results are rather variable. Furthermore, the method requires plating on agar medium. As to antibiotics, there are some disadvantages since mutagenic effects may occur (6).

Material and Methods

Dakin's solution (sodium hypochlorite solution 0,5%) is low cost and easily

* Supported by FAPESP (Grant 80/400).

found. The solution was added to the cultures which are growing in Woods Hole (WH) media (3) for some time in the laboratory under non-axenic conditions. Culture to be purified was previously washed four times by centrifugation in 10ml of WH fresh medium plus 1ml of Dakin's solution. The sodium hypochlorite solution was left in contact with the culture for 5, 10, 15 and 30 minutes. At the intervals, an aliquot was removed with a sterile Pasteur pipette and inoculated in test tubes containing WH medium + peptone (1%) + dextrose (5%) to check fungus and bacterial growth. The tubes were incubated at $23 \pm 2^\circ\text{C}$ under 5.000 lux for five days and then examined for possible contamination. Tubes not exhibiting turbidity were sampled and the culture reinoculated on test tubes with more specific media for fungus and bacteria growth (Sabouraud and Beef Extract Agar, respectively) and incubated at $30 \pm 2^\circ\text{C}$. A control test was run and the cultures washed by centrifugation and no Dakin's solution was added. The method was applied to eight unicellular cultures of fresh water algae.

Results and Discussion

Exposure time of algae to Dakin's solution, for rendering axenic cultures varied from 5 to 15 min. (Table 1). In axenic conditions the algae grow well in WH + peptone + dextrose medium, which favours the technique.

Replicates of a single algal species have shown that the exposure time to Dakin's solution necessary to obtain pure cultures may vary. This may be due to the efficiency of the washings by centrifugation or to the type of contamination. Therefore the minimum exposure time will depend on the state of the culture before any treatment. It was also observed that 30 min. exposure was lethal for some species in some experiments; in the replicates of the same experiments lethality was not observed. Therefore tolerance to 30 min. exposure time will probably depend on the physiological state of the cells. However this does not interfere with the efficiency of the method, since axenic cultures are obtained with 5-15 minutes of exposure. Heavy growth of bacteria and fungus was observed in the control tubes with WH + peptone + dextrose medium after 24-72 hours. It seems that the present method may be of help in the quick obtention of axenic algae cultures using only Dakin's solution and washings by centrifugation and a series of samples for half an hour.

References

1. Droop, M.R. - A procedure for routine purification of algal cultures with antibiotics. *Brit. Phycol. Bull.*, 3:295-297, 1967.
2. Gerloff, G.C.; Fitzgerald, P. & Shook, F. - The isolation purification and culture of blue-green algae. *Am. J. Bot.*, 37:216-218, 1950.
3. Nichols, H.W. - Growth media: freshwater. In: - Stein, J.R., ed. - *Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements*. Cambridge, University Press, p.53-67, 1973.
4. Paredes, J.F. - Some methods used to obtain bacteria-free culture of marine phytoplankton. *Mem. Inst. Invest. Cient. Moçamb.*, 9(A):127-141, 1967.
5. Pringsheim, E.G. - Pure culture of algae. London, Cambridge Press, 119p., 1946.
6. Sager, R. - Nuclear and cytoplasmatic inheritance in green-algae. In: - Stewart, W.P.D., ed. - *Algae physiology and biochemistry*. Oxford, Blackwell, p.314-345, 1974.
7. Spencer, C.P. - On the use of antibiotics for isolating bacteria-free cultures of marine phytoplankton organisms. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 31:97-106, 1952.
8. Vieira, A.A.H. - Métodos de culturas de algas do plâncton marinho: estudos realizados nas regiões de Cananéia e Ubatuba. *Bol. Inst. Oceanogr. São Paulo*, 26:303-338, 1977.

Table 1 - List of species (in unicellular cultures) treated with the Dakin's solution and the exposure time needed to obtain bacteria-free culture with 1ml of Dakin's/10ml medium

Species	Time (minutes)
<i>Ankistrodesmus fusiformis</i>	5
<i>Ankistrodesmus gracilis</i>	5
<i>Chlamydomonas</i> sp.	15
<i>Monoraphidium contortum</i>	10
<i>Scenedesmus bijugatus</i>	5
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	5
<i>Staurastrum brasiliense</i>	15
<i>Staurastrum irregularis</i>	10

INFLUÊNCIA DE FATORES ABIÓTICOS NA DISPERSÃO AÉREA DE FUNGOS NA CIDADE DE SÃO PAULO, BRASIL

Walderez Cambale
Adhemar Purchio
& Claudete Rodrigues Paula

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

Resumo

Através do método da placa-de-petri foram realizadas 360 coletas de fungos do ar (120 às 9 horas, 120 às 15 horas e 120 às 21 horas), entre março de 1978 e março de 1979. Simultaneamente, foram assinalados valores de temperatura, pressão barométrica, precipitação pluviométrica, umidade relativa e velocidade do vento, a fim de verificar sua influência na frequência dos fungos do ar na cidade de São Paulo. Verificou-se que bolores esporulados e não esporulados aumentam quando aumenta a velocidade do vento e diminuem quando aumenta a umidade relativa do ar; leveduras diminuem quando aumenta a temperatura. Considerando-se as gêneros mais frequentes no ar de São Paulo, as seguintes relações foram observadas: relação negativa entre temperatura e *Cladosporium* e *Rhodotorula* e positiva com *Alternaria*; positiva entre pressão barométrica e *Epicoccum* e negativa com *Penicillium*; negativa entre precipitação pluviométrica e *Epicoccum* e *Alternaria*; negativa entre umidade relativa e gêneros *Epicoccum*, *Alternaria* e *Aureobasidium*; positiva entre velocidade do vento e gêneros *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Alternaria*, *Fusarium* e *Aureobasidium*.

Summary

Action of abiotic factors on airborne fungi in the city of São Paulo, Brazil

From March 21st, 1978 to March 21st, 1979, it was studied the airborne fungi through the exposition of 360 petri dishes containing Sabouraud dextrose agar plus chloramphenicol - 100 μ g/ml (120 at 9 A.M. at 3 P.M. and 120 at 9 P.M.). Simultaneously, measurements of some abiotic factors (temperature, barometric pressure, rainfall, humidity and wind velocity) were taken in order to verify their influence upon those microorganisms in São Paulo city. Through statistic analysis by linear regression, it could be observed: the sporulated and non sporulated mold frequency increase when the wind velocity increases and decrease when the humidity decreases; the yeasts decrease when the temperature increases. In relation to the most common fungi genera in the city of São Paulo it could be

observed: negative relation between temperature and *Cladosporium* and *Rhodotorula* and positive relation with *Alternaria* genus; positive relation, between barometric pressure and *Epicoccum* and negative relation with *Penicillium*; negative relation between rainfall and *Epicoccum* and *Alternaria* genera; as to between humidity and *Epicoccum*, *Alternaria* and *Aureobasidium*; positive relation between wind velocity and *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Alternaria*, *Fusarium* and *Aureobasidium* genera. Depending on the considered hour of the experiment (9 A.M. or 3 P.M. or 9 P.M.) the abiotic factors showed different relations (positive, negative or no relation at all) with the fungi studied. In some specific cases, different action on the same fungus could be observed.

Introdução

A partir das suspeitas de Blakley, em 1873, de que os esporos dos fungos denominados anemófilos eram responsáveis por manifestações alérgicas no aparelho respiratório, surgiram investigações para esclarecer o assunto. Adicionalmente, houve preocupação para o conhecimento qualitativo da microbiota fúngica "anemófila", em diferentes regiões. Os resultados acumulados indicam que determinados fungos, pela alta frequência na troposfera terrestre, são considerados dominantes universais (34). Esses fungos, pertencentes aos gêneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Aureobasidium*, *Phoma*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Helminthosporium*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Epicoccum* e *Cephalosporium*, foram encontrados em sua maioria, em altas frequências, na Grande São Paulo.

Além do conhecimento qualitativo da microbiota fúngica do ar, os seguintes aspectos têm sido abordados: periodicidade diária, variação sazonal, influência da altitude, das radiações solares, de alguns fatores abióticos e outros aspectos. Alguns são baseados apenas em observações empíricas acumuladas.

No estudo de fungos anemófilos, são utilizadas várias técnicas de coleta. Com pequenas variações, quatro métodos são empregados até hoje (43): método da gravidade, da lavagem do ar, dos coletores aeroscópicos, e da exposição de lâminas e placas em aviões. O primeiro deles é o mais utilizado.

Uma das primeiras relações entre a influência dos fatores abióticos e frequência de fungos no ar, foi feita em 1933 (14), em Port Sudan, observando-se que esses fungos eram mais abundantes nas épocas úmidas. A literatura ampliou-se abrangendo, entre outros países, Argentina (10, 45), Alemanha (41), Brasil (15, 19, 28, 31), Cuba (4, 5), Dinamarca (16), Egito (2), Espanha (3), Grécia (8), Inglaterra (24), Índia (1), Kuwait (35), Nigéria (11), Romênia (12), USA (20, 21) e Venezuela (37).

Vários autores salientaram a ausência de relação entre a umidade relativa do ar e a frequência de fungos (30, 35, 45). Por outro lado, outros observaram relação positiva (8, 14, 21, 26, 39, 41) ou negativa (5, 15).

Com referência à temperatura, foram observadas relações positivas (5, 36, 40), negativas (8, 15, 21, 39) e ausência de relação (2, 30, 45). Outros pesquisadores (1, 35) no entanto, ressaltaram a diminuição de fungos no ar, aquém ou além de determinados limites de temperatura.

Para alguns autores, a maior velocidade dos ventos resulta em aumento no número de esporos no ar (4, 5, 15, 37) enquanto que outros (2, 3, 21, 30, 35) não encontraram relação alguma.

Em alguns estudos, os valores de pressão barométrica apresentaram relação negativa (5) ou positiva (15).

A radiação solar apresenta efeito adverso à concentração de fungos no ar (39). Alguns gêneros são altamente resistentes a esse fator, como *Stemphylium* e *Alternaria*. Outros são sensíveis, como *Aspergillus* e *Penicillium*. Alguns, como *Cladosporium*, são altamente sensíveis, indicando que a radiação solar, ao contrário da temperatura e velocidade do vento, tem efeito adverso na população fúngica do ar (2).

Para as precipitações pluviométricas, foi assinalada a relação negativa (1, 10,

15) ou ausência de relação (23, 33). Entretanto, foi observado também, aumento da frequência de fungos no ar em períodos chuvosos (31). Ainda em relação a esse aspecto, foram encontrados resultados específicos, como o aumento de frequência de *Fusarium* (37, 38) e *Penicillium* (27) após as chuvas e o aumento (22, 25, 31, 33) e diminuição (24) de *Cladosporium* durante as mesmas.

Apesar de tentarem relacionar o efeito dos fatores abióticos sobre a frequência de fungos no ar, outros autores não chegaram a resultados conclusivos (20, 28).

Dentre os fatores abióticos, a temperatura e a umidade relativa do ar foram indicadas como sendo as principais condicionantes da variação de fungos no ar (11, 12). Na tentativa de verificar a ação desses dois fatores simultaneamente, foi observada relação positiva entre o número de colônias de *Cladosporium* sp. e um índice aleatório obtido da multiplicação desses fatores (16). Com os gêneros *Alternaria*, *Aureobasidium* e *Penicillium*, verificou-se ausência de relação (16).

A influência de alguns fatores abióticos sobre gêneros fúngicos considerados isoladamente, também têm sido objeto de pesquisa. Os maiores índices de *Alternaria* ocorreram nos períodos secos, com ventos tempestuosos e temperaturas altas; enquanto os menores, com pressão barométrica alta (24). Observou-se ainda, aumento de *Epicoccum* e *Aureobasidium* com elevação de temperatura e da umidade relativa do ar; para o gênero *Penicillium*, não houve influência dos fatores estudados. Com a elevação da umidade relativa do ar, houve aumento de *Penicillium* e de *Aspergillus*, além da diminuição de *Cladosporium* (3); o aumento desse último gênero foi registrado em altas temperaturas e baixa umidade relativa do ar (11). Alguns fungos são influenciados pela temperatura e umidade relativa do ar, enquanto que outros não o são (26). A influência desses fatores abióticos, na ocorrência de várias espécies de fungos, assim como no número de colônias isoladas é ressaltada na literatura (44).

Quando a variação de frequência de determinados gêneros fúngicos é considerada isoladamente, não foi estabelecida a relação com fatores abióticos (8). Porém, com relação ao total de fungos isolados, conclui-se que sua variação depende desses fatores em níveis de 75,35% assim distribuídos: 11,8% com a temperatura, 59,5% com a umidade relativa do ar, 4% com a precipitação pluviométrica e os restantes 24,7% atribuídos a outros fatores desconhecidos (8).

Por outro lado, há afirmações de que o conteúdo de esporos na troposfera não está relacionado com qualquer desses fatores abióticos (33, 35).

O presente trabalho teve por objetivo, verificar a influência de alguns fatores abióticos na dispersão aérea de fungos mais frequentes (18) no ecossistema de São Paulo.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no campus da Universidade de São Paulo, a 23°34' S de latitude e 46°44' W de longitude, altitude de 795 metros. Foi utilizado o método de exposição, durante 15 minutos, de placas-de-petri contendo agar-Sabouraud-dextrose adicionado de 100µg/ml de cloranfenicol. As coletas foram realizadas sempre no mesmo local, a 60 centímetros de altura do solo, no período de 21 de março de 1978 a 21 de março de 1979, totalizando 360 coletas assim distribuídas: a cada espaço de três dias eram feitas três coletas; uma às 9 horas (manhã), uma às 15 horas (tarde) e uma às 21 horas (noite). Após as exposições, as placas foram incubadas a 25-27°C durante 5 dias, anotando-se em seguida, o número total de colônias de bolores e levaduras. Incluído nesse total, foram identificadas colônias de gêneros mais frequentes em São Paulo: *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Rhodotorula*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Alternaria* e *Fusarium*, assim como dos que não apresentaram esporos (FNE) em três meios de cultura "Difco" (agar Sabouraud-dextrose, agar-batata e corn meal agar). As identificações foram baseadas nos métodos correntes de identificação (6, 7, 32).

Através de estação localizada a 100 metros do local do experimento, foram coletados, nos mesmos horários das exposições, os seguintes dados: pressão barométrica (PB), Temperatura (TE), umidade relativa do ar (UR), precipitação pluviométrica (PP), insolação horária (IH) e velocidade dos ventos (VV).

Para verificação da eventual existência de relação entre o número de colônias de fungos isolados e os fatores acima citados, utilizou-se a regressão linear, presumindo-se que as variáveis dependentes tenham distribuição normal com valor médio $\bar{y} = B_0 + B_1x$ e desvio padrão σ para todos os x (9).

Os dados obtidos foram processados em computador B6700 (Programa ST 35N), sendo todo o trabalho baseado num nível de significância $\alpha = 0,05$.

Resultados

Com 360 exposições de placas-de-petri, foram obtidas 8.256 colônias de fungos, sendo 7.547 de bolores e 709 de leveduras. Na Tabela 1 são apresentadas as médias dos gêneros estudados, dos fungos totais e dos fatores abióticos em relação aos períodos de coleta.

Com 360 observações gerais (às 9, 15 e 21 horas), e parciais (120 observações às 9, 120, às 15, 120, e às 21 horas) dos fatores abióticos e frequências de fungos, procedeu-se à análise de regressão linear para verificação da existência ou não de relação entre essas variáveis. Por impossibilidade técnica, não foram realizadas análises estatísticas com o fator insolação horária.

Considerando-se a variação de temperatura entre 6,4 e 33,2°C. verificou-se relação linear negativa com *Cladosporium*, *Rhodotorula* e leveduras totais e positiva com *Alternaria*; às 9 horas, relação negativa com FNE, bolores e leveduras totais, *Cladosporium* e *Rhodotorula*; às 15 horas, relação negativa com FNE, bolores e leveduras totais e gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhodotorula* e *Cladosporium*; às 21 horas não houve nenhuma relação significativa (Figura 1).

Sob pressão barométrica entre 914,5 e 937 milibares, observou-se relação positiva com *Epicoccum* e negativa com *Penicillium*; às 9 horas, relação positiva com FNE e *Epicoccum*; às 15 horas, relação positiva com leveduras totais e gêneros *Epicoccum* e *Rhodotorula*; às 21 horas, relação positiva somente com o gênero *Epicoccum* (Figura 2).

Com níveis de precipitação pluviométrica entre zero e 54 milímetros, verificou-se relação negativa com os gêneros *Epicoccum* e *Alternaria*; às 9 horas, relação positiva com *Penicillium*; às 15 horas e 21 horas, não houve relação significativa (Figura 3).

Com percentuais de umidade relativa do ar entre 28 e 99%, observou-se relação negativa com FNE, bolores totais, *Epicoccum*, *Alternaria* e *Aureobasidium*; às 9 horas, relação negativa com *Epicoccum* e *Alternaria* e positiva com o gênero *Penicillium*; às 15 horas, relação positiva com *Aspergillus* e negativa com *Epicoccum*; às 21 horas, relação negativa com leveduras totais e gêneros *Aspergillus*, *Rhodotorula* e *Aureobasidium* (Figura 4).

Com valores de velocidade dos ventos variando entre zero e treze metros por segundo, verificou-se relação positiva com FNE, bolores totais e gêneros *Cladospor-*

Tabela 1 - Média de colônias de fungos isolados do ar e de fatores abióticos em diferentes períodos do dia.

Símbolos: * = número de coletas; ** = total de bolores isolados, incluindo os gêneros discriminados na tabela; *** = total de leveduras isoladas, incluindo os gêneros discriminados na tabela

Fungos	Manhã (120)*	Tarde (120)*	Noite (120)*
Não esporulados	5,50	7,00	4,13
<i>Cladosporium</i>	4,52	5,67	3,68
<i>Epicoccum</i>	2,57	4,28	1,19
<i>Alternaria</i>	0,86	1,53	0,50
<i>Penicillium</i>	0,48	1,41	0,81
<i>Aspergillus</i>	0,78	0,51	0,40
<i>Fusarium</i>	0,58	0,70	0,23
<i>Rhodotorula</i>	0,48	0,67	0,53
<i>Aureobasidium</i>	0,33	0,45	0,18
Bolores totais**	20,75	27,57	14,58
Leveduras totais***	1,68	2,28	1,95
Fatores abióticos			
Temperatura (°C)	18,44	22,91	17,78
Pressão barométrica (mb)	927,47	925,15	927,08
Precipitação pluviométrica (mm)	1,94	0,40	1,90
Umidade relativa (%)	79,94	62,91	86,43
Velocidade do vento (m/s)	3,22	5,36	3,00
Insolação horária (horas)	51 min	4 horas	1 hora

rium, *Epicoccum*, *Alternaria*, *Fusarium* e *Aureobasidium*; às 9 horas, relação positiva com bolores, leveduras totais e gêneros *Fusarium* e *Rhodotorula*; às 15 horas, relação positiva com FNE, bolores totais e gêneros *Aspergillus*, *Alternaria*, *Rhodotorula* e *Aureobasidium*; às 21 horas, relação negativa com bolores e leveduras totais (Figura 5).

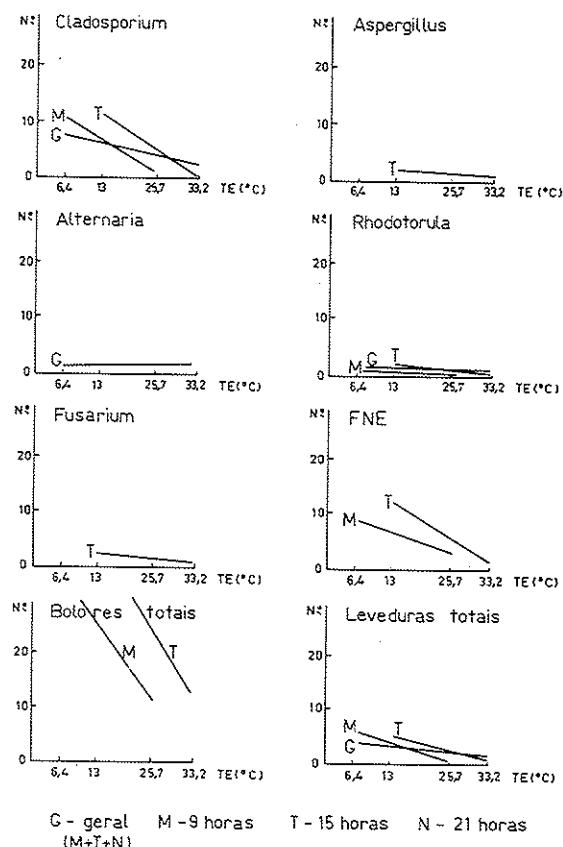
Discussão

A análise da literatura revela que os resultados obtidos pela maioria dos autores são, de certa maneira, discrepantes. Além das diferenças de localização geográfica, os dados podem ser analisados sob outros aspectos. Nem sempre, os experimentos foram realizados próximos a estações coletoras de dados abióticos e na grande maioria deles, a coleta de fungos foi extemporânea, dessa forma, os resultados podem conduzir a relações não verdadeiras. Por outro lado, alguns estudos foram baseados em pequeno número de observações, levando em conta apenas as médias e não os dados extremos. Em ecologia, os extremos é que afetam a distribuição dos organismos vivos. De fato, verifica-se na Tabela 1, que a ocorrência de maior número de fungos é às 15 horas e que as médias dos fatores abióticos sugerem que a dispersão dos fungos, pelo ar, aumenta com a elevação da temperatura, da velocidade do vento e da insolação horária, e com a diminuição da pressão barométrica e da umidade relativa. A análise estatística dos resultados, levou, algumas vezes a conclusões diversas (Figuras 1 a 5 e Tabela 2).

Observa-se, em determinados casos (Tabela 2) ação diferencial dos fatores abióticos sobre alguns fungos como, por exemplo, a umidade relativa em relação aos gêneros *Alternaria* e *Penicillium* às 9 horas e *Aspergillus* às 15 e 21 horas. Na dependência do horário de coleta, determinados fungos não foram afetados pela ação de alguns fatores. Esses fatos sugerem que, dependendo da predominância de um ou outro gênero de fungo em determinado local, e dos períodos do dia em que foi realizado o experimento, obter-se-á ação predominante, ou até diferente de cada fator abiótico, refletindo-se isso na ação final dos fatores sobre os fungos totais.

Os dados poderiam explicar, de modo geral, a razão dos resultados contraditórios, relatados pela maioria dos autores; e a sua especificidade torna nossos resultados aplicáveis apenas ao ecossistema da cidade de São Paulo e talvez a outros com características semelhantes. Por essas razões dispensaremos as comparações com outros estudos semelhantes, à exceção do realizado em Belo Horizonte (15), pois a microbiota fúngica do ar assemelha-se à de São Paulo (18). Utilizando-se de metodologia adequada, o autor observou que o número de colônias de fungos diminui com o aumento da temperatura e da umidade relativa do ar e com a diminuição da velocidade dos

Figura 1 - Correlações entre temperatura (TE) e número de colônias de fungos (Nº) isolados do ar. ($y = B_1x + B_0$)



G - geral M - 9 horas T - 15 horas N - 21 horas
(M+T+N)

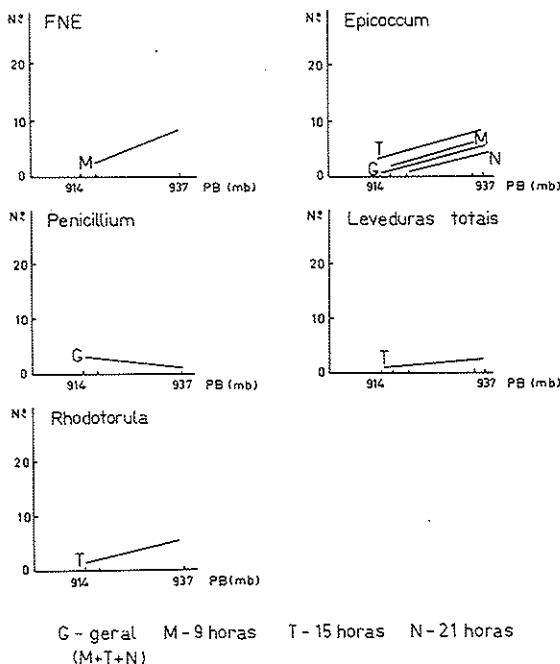
ventos. Esses resultados são semelhantes aos obtidos no presente trabalho, em relação aos bolores totais.

Nosso experimento foi realizado em apenas um local da cidade de São Paulo. Do ponto de vista climatológico, a bacia de São Paulo é caracterizada como tropical, temperado pela altitude e sob domínio de duas grandes massas: a Equatorial Continental e a Tropical Atlântica (sob domínio maior desta). A vegetação natural é rasteira, arbustiva e as variações desses fatores abióticos são muito pequenas entre os diferentes locais de São Paulo (17). Por outro lado, em trabalho anterior (18), verificamos a pequena variação entre os gêneros de fungos existentes no ar, em 11 locais da Grande São Paulo. Portanto, se não há variações significativas nos fatores abióticos e nos fungos estudados, é perfeitamente válido considerar os resultados, obtidos em apenas um local, para o ecossistema de São Paulo.

Não foram realizados estudos estatísticos com a insolação horária, por serem impossíveis as observações comparativas entre os horários de coleta e respectivas insolações, mas a iluminação parece ser fator importante na variação de fungos no ar, pelo fato de ser estimulante na esporulação desses microrganismos (29, 42). O período entre 9 e 15 horas foi o que se apresentou com maior número de horas de sol (Tabela 1). Segundo-se esse raciocínio, haveria, nesse horário, maior quantidade de esporos no solo ou em outro substrato; pela atuação de um outro fator abiótico, por exemplo, o vento, os esporos teriam sua concentração aumentada no ar. O período noturno será, portanto, adequado para que os fungos realizassem o crescimento vegetativo. Leach (29) verificou que radiações com comprimento de onda próximas do ultravioleta iniciaram ou estimularam a esporulação em vários fungos como: *Alternaria*, *Epicoccum*, *Phoma* e *Fusarium*. Concluiu que essas radiações constituem-se num dos mais importantes fatores que afetam a esporulação dos fungos. Esses resultados estão de acordo com os do presente trabalho, pois se sabe que no período matutino, até aproximadamente 10 horas, os raios solares contêm maior número de radiações próximas do ultravioleta. Como houve poucas diferenças significativas na frequência dos fungos, entre o período de 21 e 9 horas (19), podemos supor que o mesmo é propício para o crescimento vegetativo dos fungos. A partir desse período, haveria produção crescente de esporos, refletindo-se, consequentemente, na maior incidência observada às 15 horas.

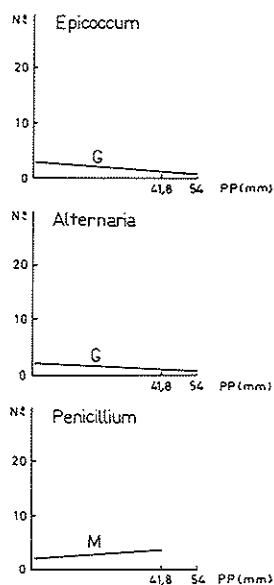
A temperatura e umidade relativa são tidas como os mais importantes condicionantes da frequência de fungos no ar atmosférico (8, 11, 12, 16). O climatograma (Figura 6) revela que há uma certa diferença entre os índices obtidos nos vários horários, sendo que o relativo às 15 horas difere em maior grau, quando comparado ao de outros horários. Às 15 horas, foi obtido maior número de fungos e, na maioria das vezes, diferindo significativamente daquele obtido às 21 horas (19). Observa-se ainda que os climatogramas de 9 e 21 horas se sobrepõem, em determinados pontos e, na maioria das vezes, não foram verificadas diferenças significativas entre as frequências de fungos, nesses dois horários (19).

Figura 2 - Relação entre Pressão Barométrica (PB) e número de colônias de fungos (Nº) isolados do ar. ($y = B_1x + B_0$)



G - geral M - 9 horas T - 15 horas N - 21 horas
(M+T+N)

Figura 3 - Relação entre Precipitação Pluviométrica (PP) e número de colônias de fungos (Nº) isolados do ar. ($y = B_1x + B_0$)



G - geral M - 9 horas T - 15 horas N - 21 horas
(M+T+N)

Dentro das concepções ecológicas, esses fatores citados atuam como reguladores na manutenção do equilíbrio dos seres vivos na natureza (13); no caso dos fungos, condicionariam, de maneira natural, sua frequência, tornando-a ora alta, ora baixa.

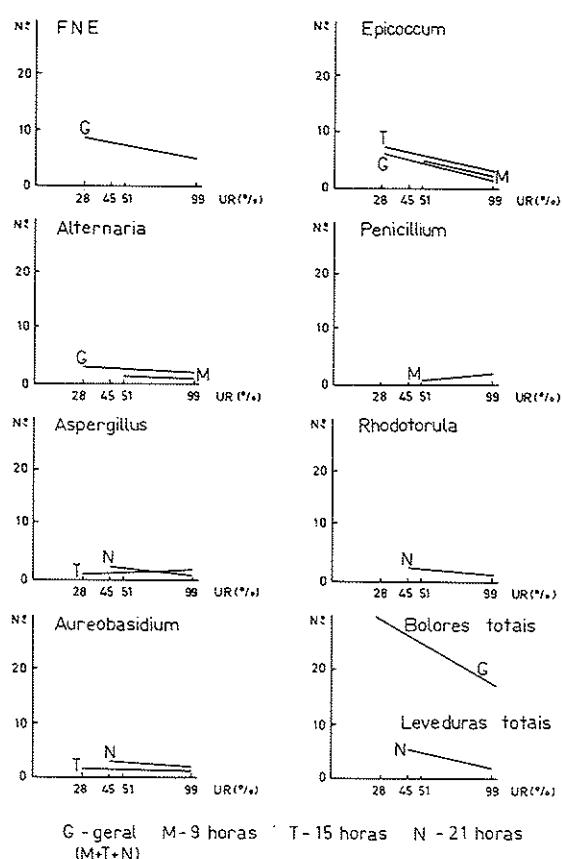
Apesar da falta de consenso, quanto à ação do fator vento, sobre os fungos, parece-nos muito importante, na dispersão dos mesmos. De acordo com nossos resultados, a maior velocidade dos ventos aumentou substancialmente a concentração de bolores no ar. Isso está de acordo com as considerações ecológicas de que esse fator, quando introduzido abruptamente num ecossistema, é responsável por alterações profundas no número de microrganismos (13).

A Tabela 2 mostra a influência qualitativa dos fatores abióticos, sobre cada grupo dos fungos estudados, nos diversos horários e no cômputo geral.

A distribuição de *Cladosporium*, no total de observações, demonstrou diferentes influências dos fatores temperatura e velocidade do vento. Às 15 horas, horário de maior frequência desse gênero (19), foi observada influência somente da temperatura, através de relação negativa. Nesse horário, sempre se verificou maiores temperaturas, sugerindo, portanto, a existência de outros fatores responsáveis pela elevação dos índices desse fungo, como a insolação, ou mesmo a ação dos ventos.

Considerando-se os resultados gerais dos três períodos, o gênero *Epicoccum* comportou-se da mesma maneira que bolores totais, frente à umidade relativa e velocidade dos ventos, tendo ainda influência de dois outros fatores: pressão barométrica e precipitação pluviométrica. Nos três períodos, observou-se relação positiva com a pressão barométrica, mas a variação desse fator, entre esses períodos (Tabela 1), foi insignificante, não explicando a frequência crescente desse gênero a partir das

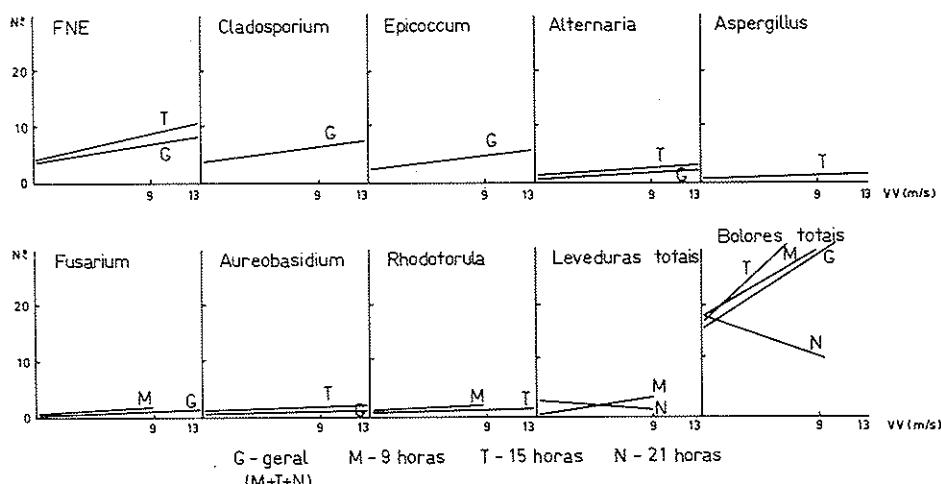
Figura 4 - Relação entre Umidade Relativa (UR) e número de colônias de fungos (Nº) isolados do ar. ($y = B_1x + B_0$)



G - geral M - 9 horas T - 15 horas N - 21 horas
(M+T+N)

21 horas (19). Em trabalho realizado em Santos e Cubatão (40) foram observadas frequências menores de *Epicoccum* em relação às verificadas em São Paulo (18). Os dois primeiros municípios estão situados ao nível do mar, tendo portanto pressão barométrica notadamente maior que a de São Paulo sugerindo que a influência desse fator sobre *Epicoccum* não é expressiva.

Figura 5 - Relação entre Velocidade dos Ventos (VV) e número de colônias de fungos (Nº) isolados do ar. ($y = B_1x + B_0$)



Nas 360 observações, *Alternaria* teve influência da temperatura e velocidade do vento (relação positiva) e da precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar (relação negativa). Às 15 horas, horário de maior frequência desse gênero, verificou-se somente influência do vento (relação positiva), que apresentou valores de velocidade semelhantes nos outros dois horários. Do mesmo modo, não se observou diferença significativa nas frequências desse gênero às 21 e 9 horas (19), sugerindo, portanto, que a ação dos ventos foi o fator preponderante no aumento de *Alternaria*, às 15 horas.

Fusarium ocorreu com frequências semelhantes de manhã e à tarde, tendo relação positiva de manhã, com o vento, e negativa, à tarde, com a temperatura. A exemplo do fato já citado e ocorrido com *Cladosporium*, dever-se-ia verificar menor incidência às 15 horas. Como isso não ocorreu e as frequências significativamente maiores foram verificadas somente entre os dois horários diurnos em relação ao noturno, parece-nos que a luz solar seja o fator preponderante na maior frequência diurna obtida, resultado coincidente com os de Leach (29) para esse gênero.

Aureobasidium ocorreu em menor número às 21 horas, horário em que houve os maiores valores de umidade relativa (relação negativa) e em maior frequência às 15 horas, pela maior velocidade do vento (relação positiva); sendo esses, portanto, os principais fatores que influenciaram a ocorrência desse gênero.

Os outros gêneros estudados, apesar de terem sido influenciados por um outro fator, não tiveram variação significativa, entre as frequências dos três períodos (19).

Com relação a FNE e bolores totais, verificou-se que, nas observações gerais, tiveram influência da umidade relativa (relação negativa) e velocidade do vento (relação positiva). Ocorreram em maior número às 15 horas (19), pela ação dos ventos, uma vez que houve resultados concordantes com as retas de regressão (Figura 5). Curiosamente, observou-se, às 21 horas, resultado contraditório, quando se obteve diminuição de bolores totais em relação ao aumento da velocidade do vento. Esse fato foi verificado igualmente com as leveduras totais. De acordo com nossos resultados,

parece-nos válido supor que a ação dos fatores, sobre os bolores e leveduras totais, deva-se à resultante das ações sobre cada gênero existente num ecossistema considerado.

Tabela 2 - Influência qualitativa de fatores abióticos na frequência de fungos no ar.

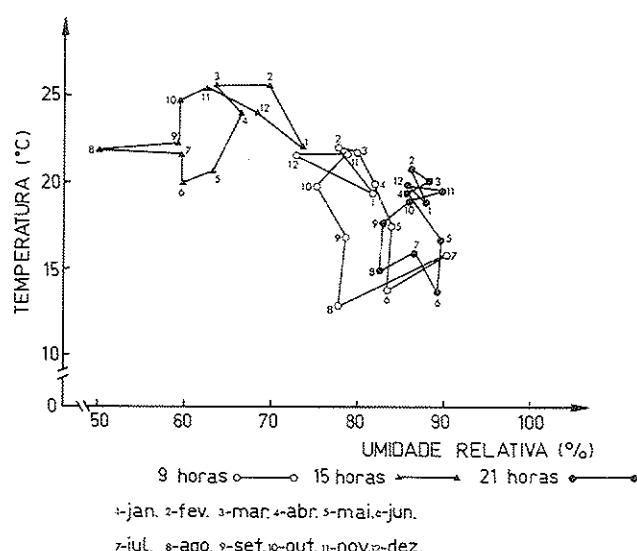
Símbolos: G = observações totais dos três períodos; ↑ = relação positiva; ↓ = relação negativa; - = ausência de relação

Fungos	Fatores abióticos/Período de coleta															
	Pressão barométrica				Precipitação pluviométrica				Umidade relativa				Velocidade do vento			
	9	15	21	G	9	15	21	G	9	15	21	G	9	15	21	G
FNE	↓	↓	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	↓	-	-	-	↑
Cladosporium	↓	↓	-	↓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑
Epicoccum	-	-	-	-	↑	↑	↑	↑	-	-	-	↓	-	-	-	-
Alternaria	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	↓	↓	↓	-	-	-	↑
Penicillium	-	-	-	-	-	-	-	↓	-	-	↓	↑	-	-	-	↑
Aspergillus	-	↓	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	↓	-	-	-	-
Fusarium	-	↓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	-	-	↑
Rhodotorula	↑	↑	-	↓	-	↑	-	-	-	-	-	-	+	-	↑	-
Aureobasidium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	-	↑	-	↑
Bolores totais	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leveduras totais	↓	↓	-	↓	-	↑	-	-	-	-	-	↓	-	↑	-	↓

Agradecimentos

Aos Doutores Benedito Correia e Rita de Cássia Salomão, aos técnicos Wagner Barbieri, Oswaldo Prieto, Maria Helena de Oliveira e Maria de Alencar, pela colaboração na execução prática. À Divisão de Hidrologia do Departamento de Águas e Energia Elétrica, Secretaria de Obras do Meio Ambiente, pelo fornecimento dos dados abióticos. Ao Prof. Charalambos D. Stamopoulos, pela orientação na análise estatística e computacional dos resultados.

Figura 6 - Climatograma dos períodos diários



Referências Bibliográficas

1. Agarwal, M.K.; Shrivpuri, D.N. & Mukherji, K.G. - Studies on the allergenic fungal spores of Delhi, India metropolitan area. *J. Allergy*, 44:193-203, 1969.
2. Ali, M.I.; Salama, A.M. & Ali, M.T. - Possible role of solar radiation on the viability of some air fungi in Egypt. *Zbl. Bakt. Abt.*, 131:529-534, 1976.
3. Aller, B.; Rey, M. & Martinez, R. - Estudio de la incidencia de los hongos en el aire de Leon durante un año. *Rev. Clin. Espan.*, 121:457-460, 1971.
4. Alvarez, J.C. & Castro, J.F. - Quantitative studies of airborne fungi of Havana in each of the twenty four hours of the day. *J. Allergy*, 23:259-264, 1952.
5. Alvarez, J.C. & Fossas, J.M.Q. - Investigaciones demonstrativas de las variaciones horarias que sufre el conteudo de hongos del aire atmosferico en relacion con las influencias meteorologicas: su influencia en ciertos crisis de asma y de rinitis. *Rev. Med. y Cir. Habana*, 44:411-453, 1939.
6. Arx, J.A. von - Fungi sporulating in pure culture. Germany, J. Cramer, 1970.
7. Barron, G.L. - The genera of *Hypocreales* from soil. New York, R.E. Krieger Pub., 1971.
8. Bartzokas, C.A. - Relationship between the meteorological conditions and the air-borne fungal flora of the Athens metropolitan area. *Mycopathologia*, 57:35-38, 1975.
9. Bowker, A.H. & Lieberman, G.J. - Handbook of industrial statistics. New Jersey, Prentice Hall, 1955.
10. Cagnani, C.B. - Alergia a hongos. Argentina, Córdoba, Libreria Científica Olocco, 1962.
11. Cammack, R.H. - Seasonal changes in three common constituents of the air spora of Southern Nigeria. *Nature*, 176:1270-1271, 1955.
12. Capetti, E.; Popesco, I.G.; Gheorghiu, T.; Dobre, I. & Natase, G. - Contribution a l'étude du pollen et des moisissures atmosphériques des villes de B. et de G.B. (region souscarpatique meridionale de la Roumania). *Acta Allergol.*, 24:39-48, 1969.
13. Dajoz, R. - Ecologia geral. Petrópolis, Vozes, 1978.
14. Ellis, D. - The incidence of asthma in Port Sudan with special reference to influence of molds. *Guy's Hosp. Rep.*, 83:102, 1933.
15. Faria, A. - Aspectos ecológicos e clínicos da flora micótica anemófila de Belo Horizonte. Belo Horizonte, Fac. de Med. Univ. Fed. Minas Gerais, 1967. (Tese de Doutoramento).
16. Flensburg, E.W. & Samsoe-Jensen, T. - Studies in mold allergy: mould spore counts in Copenhagen. *Acta Allergol.*, 3:49-65, 1950.
17. França, A. - Estudo sobre o clima da Bacia de São Paulo. São Paulo, USP, 1945. (Tese de Doutoramento).
18. Gambale, W.; Purchio, A. & Croce, J. - Flora fúngica anemófila da Grande São Paulo. *Rev. Microbiol.*, 8:74-79, 1977.
19. Gambale, W.; Purchio, A. & Paula, C.R. - Periodicidade diária de fungos anemófilos na cidade de São Paulo, Brasil. *Rev. Microbiol.*, 12:176-181, 1981.
20. Goodman, D.H.; Northey, W.T.; Leathers, G.R. & Savage, T.H. - A study of airborne fungi in the Phoenix, Arizona, metropolitan area. *J. Allergy*, 38:56-62, 1966.
21. Gordon, M.A. - Airborne mold flora of the Atlanta Area, 1953-1954. *Ann. Allergy*, 15:400-408, 1957.
22. Gregory, P.H. - The construction and use of a portable volumetric spore trap. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 37:390-404, 1954.
23. Griffith, B.T. - Mycological studies in the Savannah. *J. Allergy*, 22:461-465, 1951.
24. Hamilton, E.D. - Studies on the air spora. *Acta Allergol.*, 13:143-175, 1959.
25. Hirst, J.M. - Changes in atmospheric spore content: diurnal periodicity and the effects of weather. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 36:375-393, 1953.
26. Ingold, C.T. - Spore liberation. Oxford, Clarendon Press, 1965.
27. Kramer, C.L.; Pady, S.M. & Rogerson, C.T. - Kansas aeromycology. V - *Penicillium* and *Aspergillus*. *Mycologia*, 52:545-551, 1960.

28. Lacaz, C.S.; Mendes, E.; Pinto, R.J.R.; Cardoso, T. & Lucchetti, L.C.H. - Fungos anemófilos na cidade de São Paulo e Santos (Brasil). Rev. Hosp. Clin., 13:187-193, 1958.
29. Leach, C.M. - Sporulation of diverse species of fungi under near-ultraviolet radiation. Can. J. Botany, 40:151-161, 1962.
30. Lima, A.O. - Os fungos do ar em alergia respiratória. IV - Os esporos de *Alternaria* e Helmintosporos na atmosfera da cidade de Belo Horizonte. Brasil Med., 46:759, 1941.
31. Machado, G.M.R. - Fungos anemófilos de áreas do Grande Recife. Recife, Universidade Federal de Pernambuco, 1979. (Tese de Mestrado).
32. McGinnis, U.R. - Laboratory handbook of medical mycology. New York, Academic Press, 1980.
33. Medrano, C.E. - Determinación genérica de los hongos aislados del aire de Ciudad Bolívar durante el periodo comprendido entre los meses de noviembre de 1978 a octubre de 1979. Venezuela, Universidad de Oriente, 1979. (Tese de Doutoramento).
34. Morrow, M.B.; Meyer, G.H. & Prince, H.E. - A summary of airborne mold surveys. Ann. Allergy, 22:575-587, 1964.
35. Moustafá, A.F. & Kamel, S.M. - A study of fungal spore populations in the atmosphere of Kuwait. Mycopathologia, 59:29-35, 1976.
36. Ogunlana, E.O. - Fungal air spora at Ibadan, Nigeria. Appl. Microbiol., 29:458-463, 1975.
37. Pady, S.M. - Quantitative studies of fungus spores in the air. Mycologia, 49:339-353, 1957.
38. Pady, S.M. - A continuous spore samples. Phytopathology, 49:757-760, 1959.
39. Pathak, V.K. & Pady, S.M. - Numbers and viability of certain airborne fungus spore. Mycologia, 57:301-310, 1965.
40. Purchio, A. - Ecossistemas fúngicos da Baixada Santista. São Paulo, Inst. Ciências Biomédicas USP, 1978. (Tese de Livre-Docência).
41. Reiss, J. - Aeromycological investigations in West Germany. II - Seasonal and diurnal periodicity in the period 1971 - 1972. Zbl. Bakt. Abt., 130:157-160, 1975.
42. Rich, S. & Waggoner, P.E. - Atmospheric concentrations of *Cladosporium* spores. Science, 137:962-965, 1962.
43. Silveira, V.E. - Flora microbiana do ar atmosférico. Bol. Soc. Bras. Agro., 9:9, 1946.
44. Tomsiková, A. & Novácová, D. - Zum studium opportunistischen Pilze. I - Pilzflora in der atmosphere von Pilsen (CSSR). Mykosen, 14:93-101, 1971.
45. Zapater, R.G. & Halbinger, R. - Concentration diaria durante un año, de cuatro especies de hongos alergógenos en la atmosfera de la ciudad de Buenos Aires. J. Méd., 6:519, 1952.

FLORA FÚNGICA DO AR E DO PISO NO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, BELO HORIZONTE, BRA-
SIL*

Maria das Graças Silva

Deptº de Patologia
Centro Biomédico da UFES
Av. Maruípe, s/n
29000 Vitória ES, Brasil

Yassca Kassai Moreira
& Eduardo Osório Cisalpino

Deptº de Microbiologia
Instituto de Ciências Biológicas UFMG
Caixa Postal 2486
30000 Belo Horizonte MG, Brasil

Resumo

Em 11 setores do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, previamente selecionados quanto às condições de contaminação e controle de acesso ao público, subdivididos em 49 ambientes de coleta, foram analisados material do ar e do piso, nos horários da manhã e da tarde, com auxílio de placas de Petri com Agar-Sabouraud-Glicose e cotonetes esterilizados para a colheita do material do piso, no período de 17 de abril a 29 de maio de 1980, intercalados de 3 em 3 dias, perfazendo um total de 2940 colheitas. Dentre 9064 colônias isoladas foram identificados 48 gêneros; 26,90% dos fungos não apresentaram órgão de frutificação e foram classificados como *Mycelia sterilia*. Os gêneros mais frequentes foram: *Cladosporium* (65,03%), *Aspergillus* (37,08%), *Fusarium* (22,10%), *Penicillium* (19,86%), *Aureobasidium* (18,40%), *Curvularia* (16,20%), *Nigrospora* (15,30%). No ar e no horário da manhã, foi observada uma maior quantidade de fungos. Os ambientes considerados contaminados, apresentaram maior concentração dos mesmos. Entretanto, na clínica cirúrgica, onde se deveria esperar uma menor quantidade de esporos fúngicos, ocorreu o inverso.

Summary

Fungic flora in the air and floor at the "Hospital das Clínicas" of the Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Samples were collected twice a day (morning and afternoon) from the air and floor in 49 environments of 11 sections from the "Hospital das Clínicas - UFMG" for culture in

* Resumo da Tese de Mestrado, realizada no Deptº de Microbiologia, ICB/UFMG, com auxílio do CNPq, FINEP e CNP da UFMG.

Petri dishes containing Sabouraud-Glicose-Agar. The areas sampled were selected to the contamination conditions and to the movement people. This was performed from April, 17th until May, 29th, 1980, every three days. During this period of time, 2940 samples were collected and 48 genera of fungi were identified from 9064 cultures. Non-sporulated specimens were classified as *Mycellia sterilia* (26,90%). The most frequent genera were: *Cladosporium* (65,03%), *Aspergillus* (37,08%), *Fusarium* (22,10%), *Penicillium* (19,86%), *Aureobasidium* (18,40%), *Curvularia* (16,20%), *Nigrospora* (15,30%). The largest number of fungi was found during the morning in the air. The surgery area was one of the most contaminated.

Introdução

O grande número de doenças adquiridas em hospitais vem se constituindo um problema preocupante, para pesquisadores e profissionais da área da saúde.

O assunto tem interessado aqueles que se dedicam ao estudo dos aspectos microbiológicos, profiláticos e terapêuticos das infecções oportunistas, especialmente a partir do momento em que ficou estabelecido que um microrganismo, normalmente considerado como saprófita, pode, em condições adversas do hospedeiro, desenvolver doença (28, 30, 63, 67, 68).

A flora fungica ambiental tem sido estudada nos seus aspectos qualitativos e quantitativos (3, 14, 27, 36, 45, 48, 49, 51, 54, 55) como também este estudo tem sido correlacionado com variações horárias e metereológicas (5, 19, 47); e também com a presença da flora anemófila participando nos quadros de alergia respiratória (6, 10, 11, 12, 17, 32, 35, 42, 43, 51, 52, 53, 62).

O grande número de doenças, causadas por microrganismos denominados oportunistas, levaram a trabalhos onde os pesquisadores demonstraram a presença de determinados fungos do ar e sua correlação com infecções micóticas (1, 20, 25, 26, 46, 67, 61).

Nos hospitais, com a finalidade de impedir e/ou reduzir a proliferação de microrganismos ambientais, são adotados diversas medidas profiláticas. Contudo, essa tarefa de controle constitui um problema complexo, em virtude da existência de fatores, como uso indiscriminado de antibióticos, drogas imunossupressoras, técnicas inadequadas de desinfecção, antisepsia, assepsia e esterilização; além de problemas de debilidade orgânica do paciente e dos de ordem econômica e cultural, que favorecerão o aparecimento e manutenção das infecções hospitalares (1, 30, 61). A literatura mais recente aponta vários estudos sobre fungos oportunistas causando infecções, denotando assim a crescente preocupação com o problema (8, 16, 23, 24, 33, 34, 40, 44, 56, 64, 66).

Na busca de elementos, que pudessem ser utilizados como indicadores de poluição ambiental, foram escolhidos os fungos, que apresentarem características que permitem a realização de um estudo simples, rápido e de baixo custo. Pela ubiquidade, eles podem ser pesquisados em quaisquer ambientes (50).

Observa-se também, a necessidade de conhecer a flora fungica hospitalar (38, 41, 46) e a importância em se utilizar meios para proteger indivíduos debilitados, de possíveis contaminações de ambientes hospitalares (38, 39, 57, 61).

Os fatores que levaram à escolha do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais foram devidos às suas características de hospital geral e de instituição de ensino, além da diversidade de ambientes e da intensa movimentação humana existente. A pesquisa teve como objetivo, determinar: qualidade da flora fungica de diferentes ambientes e frequência da flora fungica de acordo com o ambiente estudado hora de colheita, temperatura, umidade, velocidade do vento, grau de limpeza e trânsito humano.

Material e Métodos

Características gerais da área estudada - O Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais é um hospital escola, localizado no Campus da Saúde, em Belo Horizonte entre a Avenida Alfredo Balena e a Avenida Bernardo Monteiro. Com número de leitos, estimado entre 318, são realizados Tratamento Ambulatorial, Triagem Médica, Internações e Cirurgia.

Locais de colheita do material do ar e do piso - Dos 11 setores escolhidos no Hospital, foram selecionados 49 ambientes, levando-se em consideração o tipo de contaminação existente, a saber: na Lavanderia - recepção, sala de secagem, esteiras; na cozinha - três frigoríficos (verduras, carnes e laticínios), elaboração de dietas para sondas, depósito de vasilhames, entrada (cozinha), fogões, corredor; na Esterilização - monta carga, sala estéril, expurgo; no C.T.I. - corredor (recepção), circulação, enfermaria, instalação sanitária, preparo de medicamentos, material esterilizado, expurgo, quarto de isolamento; na Clínica Médica - enfermaria, instalação sanitária, expurgo, material esterilizado, sala de curativos, preparo de medicamentos; na Clínica Cirúrgica - enfermaria, sala de curativos; no Bloco Cirúrgico - vestiário, material esterilizado, sala de cirurgia (do 7º e do 8º andar); no Lactário - cozinha, ante sala; na Pediatria ala "A" - enfermaria, sala de curativos, recreação, berçários, material esterilizado; na Pediatria ala "B" - expurgo, enfermaria, sala de curativos, quarto de isolamento, equipamentos, material esterilizado.

Período de colheita e metodologia utilizada - As colheitas do material, do ar e do piso, foram realizadas no período de 17 de abril a 29 de maio de 1980, intercaladas de três em três dias, nos horários da manhã (9:00 hs), antes da limpeza habitual e, à tarde (15:00 hs), após a limpeza, totalizando, ao final, 2940 amostragens. Não se observou alterações metereológicas acentuadas no período (Tabela 1), nem precipitação pluviométrica.

O material do ar era colhido através da exposição de placas contendo Agar-Sabouraud-Glicose (31), por 10 minutos a uma altura de 1 metro, e o material do piso com o auxílio de cotonetes esterilizados, em movimentos de ziguezague em toda a superfície de um guardanapo, com uma abertura padronizada de 100cm², que era posteriormente semeado em meio de Agar-Sabouraud-Glicose (31), após um intervalo que variou de 8 a 18 horas. Todas as placas eram incubadas à temperatura ambiente.

Identificação das amostras de fungos - O crescimento das colônias era observado diariamente e, após cinco dias, iniciou-se a identificação dos fungos. No exame quantitativo, considerou-se apenas uma colônia para cada gênero ou grupo de fungos que cresciam na placa, devido ao fato de que determinados fungos, ao se desenvolverem, dão origem a colônias invasivas.

O isolamento dos fungos filamentosos foi feito em meios de Agar-Sabouraud-Glicose (31), Agar-Sabouraud-Glicose em cloranfenicol (31) e Mycose-Agar (Baltimore Biological Laboratory, Cockeysville, Maryland, U.S.A.). A identificação foi realizada através do exame macroscópico da colônia, exame microscópico entre lâmina e laminu-

Tabela 1 - Observações metereológicas na cidade de Belo Horizonte no período de colheita das amostras nos horários da manhã e da tarde. (Fonte - Instituto Regional de Metereologia, Belo Horizonte, 1980).

Símbolos: U.R. = Umidade Relativa

Dia/mês	Temperatura (°C)				U.R. (%)	Vento (m/s)				
	9hs	15hs	Max.	Min.		9hs	15hs	9hs		
17/04	22,5	25,2	26,9	18,0	86	89	S	E	3,3	5,0
20/04	21,0	26,2	28,1	13,8	79	84	E	E	1,6	0,8
23/04	21,0	26,2	27,1	17,6	86	72	E	E	1,6	0,8
26/04	19,9	24,8	26,3	15,7	87	72	SE	E	2,0	1,6
29/04	21,2	24,8	25,9	14,8	88	75	SE	E	0,5	2,5
02/05	23,4	26,4	28,3	15,9	80	69	NE	W	1,0	2,5
05/05	22,4	27,6	28,4	14,4	80	69	NE	N	1,0	2,5
08/05	21,8	26,0	27,4	16,8	84	76	E	E	1,0	2,0
11/05	21,0	26,8	28,2	15,4	84	82	E	NE	1,6	2,8
14/05	20,8	25,8	26,4	15,6	84	76	E	S	1,5	4,1
17/05	21,1	25,8	27,2	15,8	90	84	E	N	1,5	0,5
20/05	21,8	26,8	27,4	17,2	80	74	SE	N	1,8	2,3
23/05	20,9	24,6	26,2	16,6	91	84	E	E	2,0	2,6
26/05	20,0	24,2	25,6	15,4	84	24	SE	NE	2,0	3,0
29/05	19,6	24,0	26,3	17,6	87	81	S	E	1,0	3,3

la de fragmentos de colônia e a técnica de microcultivo em lâmina (58). Os fungos que não apresentaram órgão de frutificação foram repicados para tubos contendo Agar-Batata (60), Agar-Fubá (BB1- Corn meal agar-11132), Agar-Czaapeck (Difco-Laboratories Detroit, Michigan, U.S.A.). Quando o estado de não esporulação persistia nesses meios, eles foram classificados como *Mycelia sterilia*.

O estudo dos fungos filamentosos foi realizado de acordo com diversos autores (2, 7, 13, 18, 21, 31, 60, 65). O isolamento e identificação das leveduras obedeceu a metodologia descrita por Lodder (37).

O grande número de bactérias resistentes a antibióticos e existentes nos ambientes hospitalares analisados dificultou a identificação genérica de algumas leveduras.

Resultados e Discussão

Através de 2940 exposições, foram isoladas 9064 colônias de fungos, compreendendo a presença de amostras do grupo *Mycelia sterilia*, de leveduras brancas e de 48 gêneros distintos, cujas frequências encontram-se na Tabela 2.

A frequência média dos fungos isolados do ar e do piso dos setores analisados, revelou que a maior quantidade de esporos fúngicos se concentrou na clínica cirúrgica, seguido da cozinha, pediatria ala "B", lavanderia, lactário, clínica médica, pediatria ala "A", esterilização, centro de terapia intensiva, bloco cirúrgico 8º andar e bloco cirúrgico 7º andar, conforme os resultados contidos na Tabela 3.

Os fungos encontrados nos 49 ambientes são ubiquitários, podendo causar infecções oportunistas em condições especiais do hospedeiro (8, 9, 15, 16, 23, 24, 29, 34, 40, 41, 56, 59, 64, 66).

O gênero mais frequentemente isolado foi *Cladosporium*, concordando com os resultados de alguns pesquisadores (3, 4, 17, 43). Pode-se considerar aí a existência de um fator favorecendo a prevalência dos esporos destes fungos nestes locais. Por outro lado, estes resultados mostram-se diferentes daqueles alcançados por alguns autores (14, 22, 27, 48, 49, 54, 55). A diferença nos resultados pode ser atribuída a características diversas, como: local de exposição, técnicas de coleta, fatores meteorológicos, épocas e estações do ano (5, 17, 19, 38, 45, 47, 48, 62).

Os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Curvularia* foram frequentemente isolados de todos os ambientes analisados. Já foi observada a predominância destes gêneros, na cidade de Belo Horizonte e a sua correlação com processos alérgicos (17).

A frequência de fungos do ar e do piso, nos diferentes ambientes estudados, revela que nos blocos cirúrgicos, locais considerados de baixa contaminação, a frequência de fungos parece ter sido menor, quando comparada a de outros setores. Setores como cozinha e clínica cirúrgica apresentaram maior quantidade de fungos. A tarefa de eliminar todas as formas viáveis de microrganismos de um determinado ambiente hospitalar é bastante complexa e difícil, pois, apesar da aplicação das técnicas usuais de desinfecção e assepsia, existem fatores que contribuem para a permanência ou penetração de microrganismos, como: fluxo humano, ventilação, temperatura e umidade ambiente (25, 30, 31, 35, 46, 61).

Tabela 2 - Frequência dos fungos isolados de diferentes setores do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, no período de 17 de abril a 29 de maio de 1980.

Símbolos: Abs. = Absoluta; Rel. = Relativa; * = Cálculo baseado em 2940 exposições

Grupo de fungos	Frequência	
	Abs.	Rel.*
<i>Cladosporium</i>	1912	65,30
<i>Aspergillus</i>	1112	37,80
<i>Mycelia sterilia</i>	791	26,90
<i>Fusarium</i>	650	22,10
<i>Penicillium</i>	584	19,86
<i>Aureococcidioides</i>	542	18,40
<i>Curvularia</i>	476	16,20
<i>Nigrospora</i>	451	15,30
<i>Phoma</i>	292	9,90
<i>Streptomyces</i>	270	9,20
<i>Spizopus</i>	235	8,00
<i>Trichoderma</i>	219	7,44
<i>Rhodotorula</i>	192	6,50
<i>Acremonium</i>	191	6,40
<i>Epicoccum</i>	177	6,00
<i>Monilia</i>	138	4,70
<i>Alternaria</i>	125	4,30
<i>Diplodiaceum</i>	117	4,00
<i>Macror</i>	97	3,30
<i>Helminthosporium</i>	95	3,20
<i>Candida</i>	77	2,60
<i>Paecilomyces</i>	77	2,60
<i>Levedura branca</i>	51	1,70
<i>Oligodadium</i>	51	1,70
<i>Syncephalastrum</i>	44	1,50
<i>Scopulariopsis</i>	39	1,30
<i>Geotrichum</i>	31	1,10
<i>Botryosporium</i>	22	0,70
<i>Oidium</i>	20	0,68
<i>Verticillium</i>	16	0,54
<i>Helicomyces</i>	10	0,30
<i>Trichosporum</i>	8	0,30
<i>Botrytis</i>	6	0,20
<i>Torulopsis</i>	6	0,20
<i>Arrobootrys</i>	6	0,20
<i>Sporothrix</i>	4	0,10
<i>Pestalotiopsis</i>	4	0,10
<i>Brachysporium</i>	3	0,10
<i>Cospora</i>	3	0,10
<i>Heliccon</i>	3	0,10
<i>Hansenula</i>	3	0,10
<i>Burritiderma</i>	2	0,06
<i>Bispora</i>	2	0,06
<i>Ramulispora</i>	2	0,06
<i>Circinella</i>	1	0,03
<i>Diplosporium</i>	1	0,03
<i>Chaetomium</i>	1	0,03
<i>Metarrhizium</i>	1	0,03
<i>Popularia</i>	1	0,03
<i>Torula</i>	.1	0,03
Total	50	100,00

Nas enfermarias do Centro de Terapia Intensiva, usualmente emprega-se normas, com a finalidade de diminuir as fontes externas de contaminação, através do uso compulsório de capote e o controle do trânsito de pessoas. Quando se observa a frequência dos fungos neste setor, nota-se uma diminuição do seu número. Entretanto, alguns gêneros como *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Penicillium* e o grupo *Mycelia sterilia*, ocorreram com frequência semelhante a de outros setores, como por exemplo, o da clínica médica.

O grupo *Mycelia sterilia*, presente em todos os setores analisados, apresentou maior percentual no Centro de Terapia Intensiva. A frequência deste fungo em Belo Horizonte parece ser elevada (17). Na Baixada Santista, observou-se que nas praias poluídas este grupo de fungo estava em maior percentual que em praias não poluídas (54). É provável que existam fatores semelhantes nestes ambientes, favorecendo o maior desenvolvimento deste tipo de fungo.

O berçário é o único ambiente da Pediatria com controle semelhante ao C.T.I. Contudo, a diminuição da frequência de fungos não foi observada neste local, quando comparada aos demais ambientes deste mesmo setor. Observa-se que este ambiente comunica-se com um corredor adjacente da pediatria, não permitindo o devi- do controle de trânsito humano, o que reforça, mais uma vez, a importância do papel dos agentes externos, veiculados através do homem, que vão propiciar a penetração e permanência de microrganismos nos diversos ambientes (30, 46).

Com relação à colheita do material, em diferentes horários, os resultados indicam que parece existir maior quantidade de fungos no período da manhã, em todos os setores analisados tanto no ar como no piso. A limpeza habitual dos ambientes hospitalares era realizada sempre após a primeira colheita, o que pode ter contribuído para diminuir o número de esporos fúngicos isolados a tarde.

Existe maior concentração de esporos de fungos no ar que no piso. Esta diferença, observada entre a frequência dos fungos isolados, pode ser também atribuída a fatores, como: fluxo humano, ação de desinfetantes e limpeza habitual destes ambientes hospitalares. O tempo gasto entre a colheita e a sementeira do material do piso pode também ter favorecido estes resultados.

Agradecimentos

Agradecemos a Alvimar da Silva Cravo, Gicelia Pinto e a Mirian Silva Lage, pela colaboração na montagem do trabalho e ao acadêmico Nelder Figueiredo Contijo, pela participação incansável na parte técnica da pesquisa.

Referências Bibliográficas

1. Aisner, J.; Schimpff, S.C.; Bennete, J.E.; Young, V.M.; Wiernik, P.M. - *Aspergillus infections in cancer patients: association with pireproofing materials in a new hospital.* J. Am. Med. Assoc., 235:411-412, 1976.
2. Alexopoulos, C.J. - Introductory mycology. 2.ed. New York, John Wiley, 1962.
3. Almeida, F.P. & Fava Netto, C. - Observações sobre a flora micológica do ar na cidade de São Paulo. Fichário Me. Ter. Labofarma, 9:1-3, 1947.
4. Almeida, F.P.; Brandão, C.H.; Monteiro, E.L. & Moura, R.A. - Flora micológica do ar: sua significação e importância. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 11:5-12, 1951.
5. Alvarez, J.C. & Possas, J.M.Q. - Investigaciones demonstrativas de las variaciones horarias que sufre el contenido de longos del aire atmosférico en relación con las influencias meteorológicas; su influencia in ciertas crises de asma y de rinites. Rev. Med. Cir. Habana, 8:411-453, 1939.

Tabela 3 - Frequência média dos fungos isolados dos setores analisados no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, no período de 17 de abril a 29 de maio de 1980.

Símbolos: M = Manhã; T = Tarde

Setor	Ar		Piso	Total	
	M	T	M		
Clin. Cirúrgica	53	53	53	48	207
Cozinha	53	52	49	47	201
Pediatria "B"	48	46	52	50	196
Lactário	54	41	53	47	195
Lavanderia	62	50	45	38	195
Clin. Médica	48	45	49	46	188
Pediatria "A"	50	45	49	44	188
Esterilização	54	42	41	43	180
C.T.I.	43	38	48	44	173
Bl. Cirúrgico/8º	51	37	33	26	147
Bl. Cirúrgico/7º	46	38	29	26	141

6. Ancona, G. - Lo sperimental, 76:270, 1922. Apud: - Costa, C.A. - A contribuição ao estudo qualitativo da flora micótica do ar da cidade de Belém: sua possível relação com a asma brônquica e rinites alérgicas. Belém, Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Pará, 1960. (Tese de Doutoramento).
7. Barnet, H.L. & Hunter, B.B. - Illustrated genera of imperfect fungi. 3.ed. Minneapolis, Burgess, 1972.
8. Bazex, A.; Parant, M.; Ferriere, J.; Basex, J. & Berger, M. - Infections a *Scopulariopsis brevicaulis*: mise en evidence de son rôle pathogène. Ann. Dermatol. Venerol., 104:254-255, 1977.
9. Benjamin, R.P.; Callawa, Y.J.L. & Connant, M.F. - Facial granuloma associated with *Fusarium* infection. Arch. Dermatol., 101:598-600, 1970.
10. Bernton, H.S. - Asthma due to a mold *Aspergillus fumigatus*. J. Am. Med. Assoc., 95:185, 1930.
11. Blackley, C.H. - Experimental researches on the causes and nature of catarrhus aestivus. London, Baillière-Tindal & Cox-Reprinted, 1959.
12. Cobe, H.M. - Asthma due to a mold. J. Allergy, 3:389, 1932.
13. Connant, N.F.; Smith, D.T.; Baker, R.D. & Callaway, J.L. - Manual of clinical mycology. Philadelphia, W.B. Saunders, 1971.
14. Costa, C.A.A. - Contribuição ao estudo qualitativo da flora micótica do ar de Belém, sua possível relação com a asma brônquica e rinites alérgicas. Belém, Faculdade de Medicina da Universidade do Pará, 1960. (Tese de Doutoramento).
15. Dillon, M.L. & Sealy, W.C. - Surgical aspects of opportunistic fungus infections. Lab. Invest., 11:1231-1236, 1962.
16. Drexler, L.; Keelan, M.M.; Bonchek, L.I. & Olinger, G.N. - *Aspergillus terreus* infective endocarditis or a porcine heterograft valve. J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 79:269-274, 1980.
17. Faria, A. - Aspectos ecológicos e clínicos da flora micótica anemófila de Belo Horizonte. Belo Horizonte, Faculdade de Medicina da UFMG, 1967. (Tese de Doutoramento).
18. Funder, S. - Practical mycology: manual for identification of fungi. 3.ed. rev. New York, Hafner, 1968.
19. Gambale, W. - Ação de fatores abióticos na dispersão aérea de fungos. São Paulo, Instituto de Ciências Biológicas da USP, 1980. (Tese de Doutoramento).
20. Gatling, E.R. - Gastric mucor mucosis in a new-born infant. Arch. Pathol., 67:249-255, 1959.
21. Gilman, J.S. - A manual of soil fungi. 2.ed. Iowa, Iowa State University Press, 1957.
22. Godoy, G.F. - Contribuição ao estudo da flora micótica anemófila em Curitiba. Setor de Licença da Saúde da Universidade Federal do Paraná, 1976. (Tese de Livre Docência).
23. Grigoriun, D.; Bambule, J. & Delacrétaz, J. - *Aspergillus sinusutis*. Postgrad. Med. J., 55:619-621, 1979.
24. Gridorium, D.; Bambule, J. & Delacrétaz, J. - La sinusite maxillaire fongique. Dermatologica, 159:180-186, 1979.
25. Hall, W.J. - *Penicillium* endocardite following open Heart surgery and prosthetic valve insertin. Am. Heart J., 87:501-506, 1974.
26. Hart, P.D.; Russel Jr.; Renington, J.S. - The compromised host and infections. 2 - Deep fungal infection. J. Infect. Dis., 120:169-191, 1969.
27. Homrich, M.H. - Observações sobre a ocorrência de esporos fúngicos alergógenos no ar de Porto Alegre e arredores. Rev. Bras. Biol., 21:149-153, 1961.
28. Josefia, E.J.; Foushee, S.J.H.; Smith, L.C. - Cutaneous mucormycoses. Am. J. Clin. Pathol., 30:547-552, 1958.
29. Kaufman, S.M. - *Curvularia* endocarditidis following cardiac surgery. Am. J. Clin. Pathol., 54:466-470, 1970.
30. Lacaz, C.S. - Infecções por agentes oportunistas. São Paulo, Edgar Blucher, 1977.
31. Lacaz, C.S. - Micologia médica. 5.ed. São Paulo, Instituto Nacional do Livro, 1973.
32. Lacaz, C.S.; Mendes, E.; Pinto, R.J.R.; Cardoso, T. & Lucchetti, L.C.H. - Fungos anemófilos das cidades de São Paulo e Santos. Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Univ. São Paulo, 13:187-193, 1958.

33. Lahroucad, M. & Texier, L. - A propos d'un cas original de céphalosporiose cutanée superficielle provoquée par *Cephalosporium acremonium*. Bull. Soc. Fr. Mycol. Med., 5:127-133, 1976.
34. Lampert, R.P.; Hutto, J.H.; Donnelly & Shulman, S.T. - Pulmonary and cerebral mycetoma caused by *Curvularia pallens*. J. Pediatr., 91:503-505, 1977.
35. Leewen, S.V. - Allergic diseases in relation to climate. Proc. R. Soc. Med., 17:19, 1924.
36. Lima, A.O. - Os fungos do ar em alergia respiratória. IV - Os esporos de *Alternaria* e *Helminthosporium* na atmosfera da cidade de Belo Horizonte. Bras. Med., 55:759-760, 1941.
37. Lodder, J. - The yeast. 2.ed. Amsterdam, North Holland, 1970.
38. Lumpkins, E.D.; Corbit, S.L. & Tiedeman, G.M. - Airborne fungi survey. I - Culture plate survey of the environment. Ann. Allergy, 31:351-370, 1970.
39. Mac Millan, B.G. - Symposium on surgical infections: infections following burn injury. Surg. Clin. N. Am., 60:185-196, 1980.
40. Mangurten, H.H. & Fernandez, B. - Neonatal aspergillosis accompanying fulminant necrotising *Enterocolitis*. Arch. Dis. Child., 54:559-562, 1979.
41. Mead, J.H.; Lupton, G.P.; Dillavou, C.L. & Odom, R.B. - Cutaneous *Rhizopus* infection: occurrence as a postoperative complication associative with an elasticized adhesive dressing. J. Am. Med. Assoc., 242:272-274, 1979.
42. Medina, M.S. & Ortiz, L. - Hongos alergógenos en la ciudad de Bogotá. Alergia, 9:31-35, 1961.
43. Mendes, E. & Lacaz, C.S. - Fungos anemófilos da cidade de São Paulo. Rev. Paul. Medi., 41:270-271, 1952.
44. Hutchinson, M.J. - The inhalation of leguminous particles. J. Pathol., 107:221-222, 1972.
45. Negroni, P. & Fisher, I. - Flora micótica del aire en Buenos Aires y sus alrededores: contribución al conocimiento de la flora alergogena. Rev. Inst. Bacteriol. Dr. Carlos G. Malbran, 11:228-242, 1942.
46. Noble, W.C. & Clayton, Y.M. - Fungi in air of Hospital Wards. J. Gen. Microbiol., 32:397-402, 1963.
47. Ochoa, A.G. & Orozco, C. - Los hongos del aire en la ciudad de Mexico: sus relaciones con los factores atmosféricos. Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop., 4:259-264, 1943.
48. Passarelli, N.; Miranda, M.P.; Castro, C. - Cogumelos do ar na cidade do Rio de Janeiro. Rev. Med. Cir. Brasil, 52:173-183, 1944.
49. Patto, O. - Iniciação à alergia. Rio de Janeiro, Guanabara, 1943.
50. Paula, C.R. - Contribuição ao estudo das leveduras em praias da Baixada Santista. São Paulo, Instituto de Ciências Biológicas da USP, 1978. (Tese de Mestrado).
51. Pinheiro, L.F.L.; Neder, R.N.; Azevedo, J.L. - Flora micológica e bacteriana do ar da cidade de Piracicaba. Hospital (Rio de Janeiro), 69:627-630, 1966.
52. Pinto, R.J.R. - Alergia em Santos. Hospital (Rio de Janeiro), 41:757-771, 1952.
53. Pinto, R.J.R. - Rinopatias alérgicas. Hospital (Rio de Janeiro), 47:125-140, 1955.
54. Purchio, A. - Ecossistema fúngico da Baixada Santista. São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas da USP, 1978. (Tese de Livre Docência).
55. Rabello, G.M. - Fungos anemófilos de áreas do grande Recife: estudo qualitativo e quantitativo. Recife, Universidade Federal de Recife, 1979. (Tese de Mestrado).
56. Restrepo, A. & Uribe, L. - Isolation of fungi belonging to the genera *Geotrichum* and *Trichosporon* from human dermal lesions. Mycopathologia, 59:3-9, 1976.
57. Reyes, A.C.; Punshang, A.P. & Sulit, H.L. - Mycosis flora of the conjunctiva. Philipp L. Ophtahl., 2:119-122, 1970.
58. Riddell, R.W. - Permanent stain of mycological preparations obtained by slide culture. Mycologia, 42:265-270, 1950.
59. Rifkind, D.; Marchioro, T.L.; Schneck, S.A. & Hil, R.B. - Systemic fungal infections complicating renal transplantation and immunosuppressive therapy. Am. J. Med., 43:28-37, 1967.

60. Rogers, A.L. & Beneke, E.S. - Medical mycology manual. 3.ed. Minneapolis, Burgess, 1970.
61. Rose, H.D. - Mechanical control of hospital ventilation and *Aspergillus* infections. Am. Rev. Respir. Dis., 105:306-307, 1972.
62. Salvaggio, J.; Seabury, J. & Schoenhardt, E.A. - New Orleans asthma. V - Relationship between charity hospital asthma admission rates, semiquantitative pollen and fungal spore counts, and total particulate aerometric sampling data. J. Allergy Clin. Immunol., 48:96-114, 1971.
63. Segal, E.; Romano, A.; Bylan, E. & Stein, R. - Yeasts associated with ocular infections. Mycopatol. Mycol. Appl., 54:31-34, 1974.
64. Sheehy, T.W.; Honeucutt, B.K. & Spencer, T. - *Geotrichum septicemia*. J. Am. Med. Assoc., 235:1035-1037, 1976.
65. Silveira, V.D. - Lições de micologia. 3.ed. Rio de Janeiro, José Olympio, 1968.
66. Sweeney, P.J.; Hahn, J.F.; Machenry, M.C. & Mitsumoto, H. - Mucomycosis presenting as positinal nystagmus and hidrocephalus. J. Neurosurg., 52:270-272, 1980.
67. Tzmouranis, N. - Sur un cas de Geotrichose cutanée. Arch. Inst. Pasteur Hell, 8:49-54, 1962.
68. Young, N.A.; Kwon-Chung, K.J. & Freeman, J. - Subcutaneous abcess caused by *Phoma* sp: resembling *Pyrenophaeta Romerol*: unique fungal infection occurring in immunosuppressed recipient of renal allograft. Am. J. Clin. Pathol., 59:810-816, 1973.

INFORMAÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA SBM

Alexopoulos, C.J. & Mims, C.W. - *Introductory mycology*. 3.ed. revis. New York, John Wiley & Sons, XVIII + 632p., ilustr., 1979.

Trata-se de edição atualizada do muito difundido texto de Alexopoulos (1ª edição, 1952, 2ª em 1962). Nestes últimos 20 anos, desde a publicação da 2ª edição desta obra, a taxonomia dos fungos desenvolveu-se muito e vários conceitos foram mudados. O uso da microscopia eletrônica de transmissão e de varredura veio trazer uma contribuição valiosa à compreensão de microestruturas, somente vagamente percebidas com o emprego do microscópio comum. Os autores utilizaram-se de ilustrações obtidas com essas novas técnicas, que muito valorizam a obra.

O estranho formato do volume (19,3 x 23,3cm) prejudica um pouco o seu manuseio, porém, mostrou-se conveniente à diagramação do texto em duas colunas. A leitura é facilitada também pela tipologia empregada. Esta edição apresenta cerca de 30% de texto a mais que a edição anterior, apesar do número de páginas não ter sido substancialmente ampliado (613-632), o que deve ser creditado ao novo formato utilizado.

O papel utilizado é de excelente qualidade, sem brilho, encorpado, o que permitiu reproduções antológicas de fotografias. Apenas para exemplificar citamos: figuras 4.6, 4.23, 8.9, 9.5, 13.7, 14.6, 20.4, 27.18, 8.9, 9.5. Por outro lado, a redução e/ou diagramação das figuras causou também redução na qualidade da ilustração ou desperdício de espaço, exemplo: 8.11, 12.11, 13-11, 13-12, 19-4, 26-12 e 26-13, 26-15, etc.

Alguns capítulos foram sensivelmente ampliados. Por exemplo, o capítulo referente aos líquens possui 12 páginas; *Trichomycetes* tem agora 5 páginas. Apesar do balançamento adequado no tratamento dos vários grupos, há um certo aprofundamento maior no capítulo referente aos mixomicetos (compreensível, face à especialização dos autores). No nosso entendimento deveria haver maior ênfase no tratamento de *Endogonaceae*, pela importância deste grupo na atualidade.

O acesso às informações é facilitado pela presença de dois índices: de autor e de assunto. Além disso, o glossário, também presente na edição anterior, foi atualizado.

Na diagramação, as chaves aparecem destacadas, o que no nosso entender, facilita bastante ao neófito. Todavia, em alguns casos, a diagramação não conseguiu superar certos problemas e as chaves e/ou ilustrações aparecem distanciadas do texto.

Os autores citam o trabalho de Whittaker & Margulis (1978, "Protist classification and the kingdom of organisms", Bio Systems, 10:3-18), cujo sistema adotam. Todavia, não ilustraram esse sistema. Obra escrita tendo em vista, principalmente, o estudante (conforme afirmam os autores), deixa-o principalmente um tanto confuso, sem dúvida, portanto, fica sem saber quais são os "super reinos" e quais os cinco "reinos" e os super-reinos Eukaryonta, entre os quais se encontra o *Mycetidae* (*Fungi*). Assim, fica inexplicada a localização dos fungos dentro da biota, sua diferenciação não só das plantas verdes e animais superiores, mas também dos protozoários, das cianofíceas, das bactérias e outros organismos chamados "inferiores". Isso, sem dúvida, dificulta a compreensão do grupo, pelo neófito.

Taxonomia é, até certo ponto, puramente subjetiva (cada cabeça uma sentença). Essa a razão da afirmação dos autores da obra, de que estavam adotando um certo sistema de classificação, conscientes de que o mesmo não era aceito por muitos micólogos. Por ser trabalho produzido "primariamente para propósitos pedagógicos", deveria ser bem claro na apresentação do sistema de classificação adotados, permitindo, principalmente aos estudante, ter uma opção bem definida, fácil de entender e seguir, até que, com a maturidade dada por anos de estudo e prática, pudesse (e quizesse) mudar de caminho. O esquema apresentado à página 37, com explicações até a página 40, em nada ajudam o neófito.

No que diz respeito aos fungos zoospóricos, há alguns reparos que devem ser feitos, aqui ilustrados em duas situações:

- a) o ciclo de *Saprolegnia* contém dois desenhos que podem levar um neófito a falsas conclusões. O zoosporângio típico desse gênero é renovado por proliferação interna. Ocionalmente de outras maneiras. Ainda, o desenho de cospores é do tipo excêntrico, o menos comum entre 20 das espécies de *Saprolegnia* reconhecidas por R.L. Seymour (1970), autor de revisão mais recente sobre o gênero;
- b) estranhamente deixou de ser citado o trabalho de K.L. Howard "Oospores types in the *Saprolegniaceae*. Mycologia, 63(3):679-686, 1971", que atualiza os conceitos de coplasto e coplasma, em função dos trabalhos de microscopia eletrônica, propondo uma classificação diferente dos tipos de cospores: cêntricos, subcêntricos, excêntrico, subexcêntrico e expersado.

Outros poderão encontrar problemas semelhantes nos demais grupos, porém, como um todo, o livro pode ser recomendado a todos os iniciantes no estudo dos fungos. Uma restrição é feita à manutenção da abordagem morfo-taxonômica, restringindo-se informações sobre a fisiologia, bioquímica e ecologia dos fungos.

Alcides Ribeiro Teixeira
Chácara Botânica
Caixa Postal 85
13300 Itu SP

& Adauto Ivo Milanez
Instituto de Botânica
Caixa Postal 4005
01000 São Paulo SP

Ciência, 1(1):1-12, 1983.

Foi lançado o primeiro número da "Ciência" - Boletim de informação da Associação Brasileira "A Hebraica" de São Paulo.

O editor, Salomão Schwartzman, propõe que este informativo mensal aumente a comunicação entre o Brasil e Israel.

Neste primeiro número, a reportagem principal relaciona-se a experiência didática na área médica, acompanhada pelo atual Diretor da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, na Escola de Medicina Beer-Shera, da Universidade Ben Gurion. Na segunda reportagem, o Prof. Michael Sela, Presidente do Instituto Weizmann de Ciências, apresenta as principais linhas de trabalhos em andamento naquele importante centro de pesquisa. Seguem-se pequenas notícias, encerrando as doze páginas de informações sobre Israel.

Flávio Alterthum
Instituto de Química USP
Caixa Postal 20780
01000 São Paulo SP

Fiechter, A., ed. - Microbes and engineering aspects. In: - Advances in biochemical engineering. New York, Springer-Verlag, Vol.21, 230p., 1982.

Este vigésimo primeiro volume da Coleção "Advances in biochemical engineering" apresenta exaustiva revisão sobre quatro tópicos de grande importância em Biotecnologia.

O primeiro capítulo, intitulado "Microbial biomass from renewables: Review of alternatives", de autoria de Carlos Rolz e Arthur Humphrey, com 700 referências bibliográficas, descreve e discute alternativas na produção de biomassa microbiana como fonte de alimentos. Os autores examinam e apontam vários tipos de matérias-primas (caldos, concentrados, resíduos líquidos e sólidos, substratos sólidos, gases), diferentes processos de produção (descontínuo, contínuo, cultivo em meio semi-sólido), a possibilidade de cultivar espécies isoladas ou misturas de espécies diferentes (leveduras, bolores, bactérias, algas) e diversos processos de separação

do produto final. Destacam a crescente importância do assunto e ressaltam a escassez de estudos econômicos a respeito das muitas alternativas existentes. Neste particular, deixam claro que, dependendo das condições locais, o aspecto econômico pode não ser o fator decisivo de escolha. Referindo-se à produção de biomassa para alimentação humana, vêem os autores, neste momento, apenas duas opções: cogumelos e leveduras residuais de fermentação alcoólica.

No segundo capítulo, intitulado "Application of simple structured models in bioengineering", com 161 referências bibliográficas, os autores, A. Hardes & J.A. Roels, depois de destacar a importância de modelos matemáticos em engenharia e de classificá-los, fazem rápida referência aos modelos corpusculares e dedicam sua atenção aos modelos estruturados contínuos, ressaltando a importância das constantes de tempo na tentativa de explicação dos fenômenos biológicos. Referindo-se aos modelos estruturados contínuos, discutem a necessidade de simplificá-los a fim de poder chegar a resultados aplicáveis na prática. Neste particular, estudam os modelos chamados de dois compartimentos (no primeiro compartimento o substrato é transformado em substâncias que vão formar macromoléculas, enquanto o segundo compartimento é constituído pelo material armazenado) e de três compartimentos (o primeiro sendo constituído pelo RNA, o segundo pelas proteínas e o terceiro englobando o restante da biomassa). Apresentam dois exemplos com vistas a explicar a dinâmica da síntese de enzimas e o fenômeno da diauxia no cultivo de microrganismos em mistura de substratos.

No terceiro capítulo ("Energetics of microbial fixation of dinitrogen", Vicent P. Gutschik, 269 referências bibliográficas) o autor analisa o processo de fixação de nitrogênio sob o ponto de vista de consumo de substrato e demonstra que a demanda é muito alta. As implicações são várias. Microrganismos fixadores são pouco competitivos em decorrência da necessidade de fonte de carbono em grandes quantidades. O complexo enzimático que constitui a nitrogenase é praticamente o mesmo em todos os organismos que o possuem, apresentando sempre grandes exigências para sua atividade. Há entretanto, diferenças nos processos de fixação de nitrogênio quando se compararam organismos diferentes. A causa deste fato reside principalmente na diversidade de metabolismos, mais especificamente no auto ou heterotrofismo, na aero ou anaerobiose (facultativa ou obrigatória). Estas diversidades metabólicas são caracterizadas, entre outras, pelas vias produtoras de energia e de poder redutor que são imprescindíveis para a fixação. O autor discute as potencialidades energéticas de cada tipo metabólico, com a preocupação de enfatizar os organismos fixadores de vida livre, analisando sua importância nos ecossistemas. Calcula o aproveitamento energético tanto em processos metabólicos gerais, quanto no da fixação de nitrogênio. Analisa o uso de ATP em todo ciclo vital considerando sua utilização como energia de ativação, na síntese da nitrogenase e estruturas das quais a enzima depende; calcula os custos da manutenção (reciclagem, proteção contra O₂ e estoque na célula) da nitrogenase e da assimilação da amônia incluindo outros fatores ligados à fixação e que sobrecarregam energeticamente a célula. Por ser altamente dispendioso, o processo é controlado em vários níveis, o que acarreta ainda, maior consumo de energia. Após a análise dos rendimentos da fixação nos vários tipos de microrganismos, o autor determina os custos experimentais "in vivo" e suas consequências, terminando com a análise da atual condição nos campos e as perspectivas de estudos.

Finalmente, o último capítulo ("Foam in microbiological processes", U.E. Vesters, M.Z. Kristapsone e E.S. Levitans, 201 referências bibliográficas) trata de assunto de grande interesse prático, mas de alta complexidade. Depois de comentar as características dos sistemas em que há formação de espuma, a influência da composição e das propriedades dos meios nessa formação e as consequências tecnológicas do fenômeno, os autores examinam as condições de formação de espuma em reatores biológicos. Discutem o emprego de substâncias anti-espumantes, de quebradores mecânicos de espuma (rotativos; ciclones; jatos de ar ou de líquido; vácuo), de métodos chamados físicos (ultra-som; métodos térmicos; métodos elétricos) e as dificuldades do controle automático da quantidade de espuma em reatores. Examinam as tentativas de modelagem e de projetos de quebradores de espuma. Concluem pela acentuada escassez de estudos a respeito do assunto e a precariedade dos conhecimentos atuais, chamando a atenção para a possibilidade de aproveitar um aspecto positivo do fenô-

meno, qual seja a elevada velocidade de transferência de oxigênio na interfase gás-líquido.

Heloiza Ramos Barbosa
& Walter Borzani
Instituto de Pesquisas Tecnológicas
Caixa Postal 7141
01000 São Paulo SP

Informes - Vida. São Paulo, 1(1):1-6, 1983.

Boletim mensal, despretensioso mas bastante interessante. Quatro páginas, distribuição gratuita, e sem direitos reservados.

Discute temática ambiental, divulga eventos, principalmente na área de ecologia e preservação do meio ambiente.

Endereço para correspondência: Caixa Postal 6984, 01051 São Paulo SP.

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

Instituto Brasileiro de Informação em Ciência e Tecnologia - Fonte de informação em energia no Brasil. Brasília, 174 p., 1982.

Foi louvável a iniciativa conjunta do CNPq e FINEP, em realizar, sob contrato com o IBICT, o levantamento das Fontes de Informação em Energia no Brasil, trabalho realizado em regime de consultoria por Maria Lúcia Andrade Garcia. Toda e qualquer listagem, que reuna os vários grupamentos envolvidos com uma área tão palpitante como Energia no Brasil, será sempre bem-vinda para aqueles que aí operam.

Este guia está dividido em cinco seções, a saber: Entidades; Centros e Serviços de Informação e Bibliotecas; Publicações - periódicas e referências; Bases de Dados Estrangeiras; e Entidades, Centros e Serviços de Informação e Documentação e Bibliotecas no Exterior.

Ao catalogar os grupamentos, pretendeu-se que fossem entidades de reconhecida atuação na área de energia, gerando e/ou mantendo documentação sobre o assunto, e pertencente a um dos seguintes setores: administração pública, pesquisa e desenvolvimento, produção e distribuição de energia e ensino a nível de pós-graduação. É uma divisão bastante abrangente, mas creio que não deveriam ter sido excluídas as entidades de ensino a nível de graduação, uma vez que são vários os exemplos de grupos fortemente envolvidos com pesquisa e desenvolvimento na área de energia, em universidades não credenciadas para o ensino de pós-graduação, inclusive gerando farta documentação, seja de referência ou na forma de relatórios técnicos de serviços prestados a terceiros ou resultantes de projetos internos.

Estão catalogados oitenta e oito entidades, entendidas como organizações ou parte destas, constando informações como: endereço, constituição jurídica, área de atuação, tipo de documentação gerada, facilidades de acesso a esta documentação e publicações editadas quando existirem.

Na seção de Centro e Serviços de Informação e Documentação e Bibliotecas, estão catalogados setenta grupamentos, constando informações sobre a sistemática de utilização de seu acervo e publicações editadas quando existirem.

Na seção Publicações Periódicas e de Referência, estão catalogadas cento e vinte publicações, desde as meramente informáticas, até aquelas de conteúdo técnico-científico com enfoque acadêmico.

Na seção Base de Dados Estrangeiros, estão catalogadas quarenta e sete instituições, constando o endereço, área de atuação, forma de acesso e sistema de recuperação de informação a que está filiada. Sua inclusão neste guia, vem bem a propósito, já que certamente irá facilitar o acesso do pesquisador nacional a esse imenso po-

tencial de recuperação de informações, ao qual, via de regra, ele não está afeto.

Finalmente, consta uma seção com setenta e dois agrupamentos estrangeiros, de caráter similar aos nacionais anteriormente expostos, o que também se constitui em informação de grande utilidade.

Cada agrupamento, em cada seção, está tabulado com seus congêneres em outras seções ou inclusive na mesma (no caso de serem partes de uma mesma organização), o que facilita bastante o manuseio do guia. Este manuseio é ainda mais facilitado por um sistema de índices remissivos alfabético, de assunto e de siglas.

O levantamento não foi completo e não pretendeu ser, mas sua importância é relevante. No caso de se pretender continuar o trabalho, como está insinuado pelo editor, as próximas edições creio deverão, além de serem mais completas, contar com algum levantamento "in loco" das instituições, visando aferir sua importância no setor e esboçar a qualidade da informação ali gerada e/ou mantida.

Leonardo Perego Jr.
Av. São Gabriel, 18
01435 São Paulo SP

Majchrowicz, E. & Noble, E.P., eds.- Biochemistry and pharmacology of ethanol. New York, Plenum Press, vol. 1, 704 p., 1979.

O volume 1 do livro intitulado "Biochemical and pharmacology of ethanol", editado pelo Edward Majchrowicz e Ernest P. Noble é uma excelente obra de revisão sobre o etanol, sob aspectos bioquímicos e farmacológicos. O volume contém 704 páginas e é constituído de 28 capítulos, cada qual escrito por um ou mais especialistas de nome.

Os primeiros capítulos descrevem a cinética do etanol, onde há desde comparação de nível sanguíneo da substância entre as diferentes espécies animais, até complexos mecanismos de ação, assim como, as possíveis funções fisiológicas das enzimas envolvidas na biotransformação do etanol. A influência direta ou indireta do etanol sobre o metabolismo de diversas substâncias endógenas é exaustivamente discutida. A segunda parte do livro, dedica-se à revisão dos aspectos patológicos do etanol, dando enfoque às diversas anormalidades que acompanham o alcoolismo, tais como alterações gastrintestinais e imunológicas, além de efeitos mutagênico e teratogênico.

O texto é rico em tabelas e figuras que auxiliam a compreensão dos fenômenos e, no final de cada capítulo, encontram-se numerosas referências bibliográficas. A obra é valorizada não só pelo seu conteúdo, mas também pela sua forma de apresentação, que é clara, concisa e bastante didática.

Seizi Oga
Instituto de Ciências Biomédicas USP
Caixa Postal 4365
01000 São Paulo SP

Moses, V. & Springham, D.G. - Bacteria and the enhancement of oil recovery. London, Applied Science Publishers, 178p., 1982. £ 16.00.

Um dos grandes temas de interesse sócio-econômico, neste final de século, é procurar resolver o problema da escassez de combustíveis fósseis, através de técnicas alternativas de produção de energia. O desenvolvimento científico e tecnológico, da última década, evidencia que, a curto prazo pode-se substituir o petróleo, em algumas áreas de consumo. Por outro lado, o grande leque industrial petroquímico não pode prescindir, pelo menos a médio prazo, desta matéria prima, já que implicaria na mudança de toda uma infraestrutura político-econômico-tecnológica, no segmento.

A taxa média mundial, de produção nos poços de petróleo, através dos métodos tradicionais de prospecção, é de 30%. Logo, 70% ainda permanece no sub-solo, constituindo-se aumentar a eficiência de extração, um grande desafio.

O óleo pode vir à superfície de maneira espontânea, através da energia do próprio reservatório, num processo denominado recuperação primária. Quando, porém, são usados métodos artificiais para maior produção, estamos diante de uma recuperação secundária.

As principais técnicas de recuperação secundária consistem na injeção de água, gás natural, vapor, álcool ou, ainda misturas químicas especiais com o objetivo de forçar a saída do petróleo. Tais substâncias, ao ocuparem os poços vazios da rocha matriz do reservatório, acabam empurrando o óleo para o poço.

A injeção de misturas químicas nos poços oferece grande potencial para pesquisa aplicada e expansão tecnológica no campo de substâncias com propriedades surfactantes e viscosificantes. Tais produtos podem ser produzidos industrialmente por sínteses químicas e fermentações ou "in situ" por microrganismos introduzidos diretamente nos poços, cujo conteúdo serviria de "meio de cultivo".

A microbiologia do petróleo representa, pois, tecnologia de ponta em fase de expansão e que, na literatura de língua inglesa é referida por "Microbial enhanced oil recovery", ou MEOR. Segundo seus defensores, é técnica promissora para o aumento da extração nos poços. Entretanto, um trabalho de pesquisa iniciado hoje, daria resultados a longo prazo, dada as dificuldades da pesquisa envolvida nesta área da biotecnologia.

Bactérias modificadas, através de técnicas de engenharia genética converteriam-se em "fábricas" de produção contínua de biopolímeros, cujas características surfactantes e de alteração da viscosidade facilitariam o fluxo do óleo por entre os poros da rocha matriz, através da diminuição da viscosidade do óleo cru, ou do aumento da viscosidade da fase aquosa. O aumento da pressão interna no reservatório, causado pelo CO₂ produzido pelo metabolismo bacteriano, também contribuiria para maior eficiência do deslocamento do petróleo.

Moses & Springham relacionam as características fundamentais dos microrganismos adequados para MEOR: o substrato hidrocarbonílico deve constituir a fonte de energia para que os produtos do seu metabolismo microbiano sejam, energeticamente, ou menos dispendiosos possíveis; o microrganismo deve ser capaz de permear por toda a rocha do reservatório, sem bloquear os poros, nem produzir precipitados químicos que possam causar entupimentos; o microrganismo deve ser tolerante às condições físico-químicas nos reservatórios e às substâncias injetadas, como agente floculantes, biocidas, inibidores de corrosão, entre outras; a população microbiana deve manter a estabilidade genética, retendo, portanto, as propriedades iniciais ao longo dos anos de utilização.

Os microrganismos hoje conhecidos, geralmente bactérias, não preenchem todas aquelas condições, embora uns poucos apresentem algumas das características desejadas. No entanto o problema é ainda mais complexo dado que há diferenças acentuadas entre os diversos poços produtores exigindo uma poço-especificidade dos microrganismos. Surge, portanto, uma indagação: Como concentrar em uns poucos microrganismos todas as propriedades necessárias para a eficácia da técnica de MEOR?

Propõe os autores que a seleção destas propriedades seria obtida através de culturas já conhecidas e do isolamento e estudo de novas espécies ou cepas, que possuam maior número possível de atributos para MEOR. A combinação das qualidades desejáveis, seria alcançada pelo aperfeiçoamento das técnicas de seleção de cepas, melhoramento e seleção de mutantes, através de culturas contínuas ou por meio de técnica de tecnologia do DNA recombinante.

Estas e outras indagações são respondidas no livro que, ao final, relata pesquisas que vêm sendo já realizadas em vários países, e sugere condições para que programas governamentais possam ser ativados. É importante enfatizar que somente no Mar do Norte (Reino Unido) há cerca de 480 bilhões de dólares em petróleo não recuperado que, tem motivado tanto o governo quanto a indústria de petróleo britânicos.

Aparentemente, o livro dirige-se à microbiologistas e engenheiros interessados em tecnologia de ponta na indústria do petróleo. Entretanto, pelo estilo fácil e didático dos autores, "Bacteria and the enhancement of oil recovery" servirá a todas as pessoas interessadas nas formas em que a biotecnologia pode contribuir para a economia mundial nas próximas décadas.

Mauricio Novaes
& Miguel Fazzanella Filho
EMBRABIO - Empresa Brasileira de
Biotecnologia
R. Marquês de Itú, 58/59 - Conj. B
01223 São Paulo SP

Sherman, F.; Fink, G.R. & Hicks, J.B. - Methods in yeast genetics: laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratories, 120p., 1982.

Este manual adotado no consagrado Curso de Genética de Leveduras ministrado pelos autores no Cold Spring Harbor Laboratory, é atualmente, o mais consultado texto sobre experimentação na área. Hoje as leveduras são tidas como o organismo eucarioto simples ideal para estudos genéticos e bioquímicos. Embora as leveduras possuam maior complexidade genética que as bactérias, permitem a aplicação de muitas das técnicas de experimentação com bactérias e além disso, ocorre nas fases haplóide e diplóide (ou poliplóide), é favorável à clonagem, etc., propriedades estas que tornam as leveduras capazes de serem estudadas geneticamente com sucesso em várias áreas como a mutagênese, recombinação, regulação e ação gênica, diferenciação e ciclo celular, herança mitocondrial, etc. Adicionalmente, considere-se que se trata de organismo com importância econômica, o que amplia enormemente as opções de estudos tanto acadêmicos como aplicados.

O manual praticamente é dedicado a experimentação com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, o que não limita as possibilidades de aplicação das técnicas a outras leveduras e fungos. De um modo geral pode ser afirmado que o manual contribui de maneira efetiva para um conhecimento de todas as técnicas básicas comumente empregadas pelo geneticista de leveduras. Ao todo são apresentados protocolos para vinte e três experimentos, dois experimentos suplementares, além de literatura sobre todas as técnicas, meios de cultivo utilizados, corantes, forma de preservação, equipamentos, enzimas, etc. Os experimentos atendem a genética clássica, citologia e genética molecular.

Áreas de pesquisa clássica em genética de leveduras como a herança mitocondrial, recombinação intragênica, reparo, ação gênica, etc. encontram no manual, protocolos que permitem dominar as técnicas básicas, bem como seguir a literatura com maior facilidade. Embora alguns protocolos tenham sido condensados e eventualmente não sejam diretamente aplicados a problemas de pesquisa, tem o valor de ilustrar princípios gerais e métodos, capacitando assim, quem venha a usá-lo, desenvolver pesquisa em praticamente todas as áreas da Genética de Leveduras.

Flávio C.A. Tavares
Instituto de Genética ESALQ
Caixa Postal 83
13400 Piracicaba SP

Toozé, J., ed. - The molecular biology of tumor viruses. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 743p., 1973.

O livro "Molecular biology of tumor viruses - RNA tumor viruses" é correspondente à segunda edição do "The molecular biology of tumor viruses". Editado em 1982 por Robin Weiss; Natalie Teich; Harold Varmus & John Coffin, trata-se de mais uma excelente publicação do conceituado "Cold Spring Harbor Laboratory". É constituído por onze capítulos e 6 apêndices. Segundo a apresentação de seus editores, o desenvolvimento que se observou no espaço de tempo entre as duas edições foi de tal ordem, que a compilação das informações disponíveis exigiram quase 1400 páginas, particularmente resultantes após as aproximações metodológicas do DNA recombinante e sequenciação de nucleotídeos.

A extraordinária Introdução de 24 páginas descortina a origem da pesquisa dos vírus RNA do tipo-C, assim como, apresenta uma visão dos conhecimentos atuais. Inicia

com a simplista conotação dos tumores como sendo um processo dos organismos eucarióticos traduzido pela desordem do crescimento celular e diferenciação, com participação de fatores específicos. Apresenta algumas questões para as quais são conhecidas apenas respostas parciais, tais como: De onde vêm os genes tumorais? Como são os genes introduzidos, reproduzidos e expressos? Que tipo de interferência, direta ou indireta exerce as proteínas virais no metabolismo da célula hospedeira? O capítulo 2 "Taxonomy of retroviruses", cuidadosa indexação e catalogação dos retrovírus, é mais completa relação de espécies e mutantes, assim como, contém suscinta descrição de propriedades. O capítulo 3 "Experimental biology and assay of RNA tumor viruses" conserva muitas das características do texto apresentado na primeira edição por Booze (1973). Indubitavelmente, o capítulo 4 assim como o capítulo 5, constituem um dos pontos altos do texto, em que estão amplamente discutidas as interações entre o genoma viral e o complexo sistema da célula hospedeira. Apresenta discussões acerca das características do genoma dos retrovírus, replicação, a particularíssima enzima transcriptase reversa; elevada frequência de recombinação intermolecular; capacidade de aquisição de novos genes responsáveis pela transformação e a significância dos vírus endógenos. As 14 (catorze) figuras são a consequência direta dos informes colhidos pela metodologia de engenharia genética, assim como a proposição do provável mecanismo envolvido na síntese do DNA e sua integração no cromossoma da célula. O capítulo 6 aborda amplamente as vias biosintéticas incluindo desde a etapa de transcrição até as propriedades de cada proteína estrutural. O capítulo 7 "Genetics" trata do isolamento, caracterização de mutantes e suas interações genotípicas e fenotípicas. O capítulo 8 "Pathogenesis" aborda a multiplicidade dos sintomas patológicos devidos à atividade dos retrovírus, com particular ênfase às leucemias e linfomas. O capítulo 9 "Transforming genes" trata do tão controvertido aspecto dos genes transformantes, formulando algumas questões, pois nenhuma assertiva é disponível face aos conhecimentos atuais. No capítulo 10, os vírus endógenos são considerados como um dos intrigantes aspectos dos tumores, pois os cromossomas de células não infectadas podem abrigar sequências idênticas ou relacionadas ao vírus infecciosos. O capítulo 11 "The search for human RNA tumor viruses" argumenta a busca de marcadores bioquímicos em infecções humanas pelo fato das células tumorais não liberarem partículas infecciosas. O gene transformante onc aparentemente é derivado do gene celular normal. Inclui vasta informação bibliográfica acerca das discussões, achados e possibilidades dos retrovírus serem agentes transdutores da oncogênese humana.

Indubitavelmente, a presente publicação de WEISS & col. (1982), reflete o alto padrão científico de seus colaboradores. Infelizmente, dada a complexidade da matéria, a leitura de alguns capítulos exige a máxima concentração, pois além da problemática, o texto é pleno de referências bibliográficas. O livro é fartamente ilustrado, extraordinariamente meticuloso na inclusão de referências pertinentes e atualíssimas. Sinto-me perfeitamente à vontade em indicar este exemplar como uma "Bíblia" e merecedor da incondicional admiração de todos nós que respondemos ao desafio de tentar compreender o peculiar processo tumoral à vírus em suas implicações quer de ordem imunológica, química, bioquímica, biológico-cellular, genética, patológica, farmacológica, epidemiológica, preventiva ou terapêutica.

Tomoko Higuchi
Instituto de Química
Deptº de Bioquímica
Caixa Postal 20780
01000 São Paulo SP

Universidade Estadual de Londrina - Curso sobre Enzimas Imobilizadas. Londrina, 31 de janeiro a 11 de fevereiro de 1983.

A Universidade de Londrina ofereceu, com apoio financeiro da FINEP e de empresas da região, de 31/01/83 a 11/02/83, curso sobre "Enzimas Imobilizadas". O curso esteve a cargo do Prof. Dr. Joaquim Pereira Cardoso, com ampla vivência industrial no setor.

O programa teórico do curso após uma introdução sobre os aspectos básicos de enzimas imobilizadas abordou:

- a) Métodos de imobilização - adsorção, oclusão, ligação cruzada intermolecular, ligação covalente em suportes orgânicos e inorgânicos, ligação iônica em suportes inorgânicos. Seleção de suportes.
- b) Difusão e cinética de enzimas imobilizadas - Estabilidade de enzimas imobilizadas. Cinética e efeitos difusionais internos e externos.
- c) Reatores enzimáticos - Reatores para enzimas solúveis e imobilizadas. Tipos: comparação de performance. Equações representativas de processos.
- d) Aplicações industriais, analíticas e médicas de enzimas imobilizadas.

A parte prática do curso abrangeu:

- a) Preparação de suportes e imobilização de enzimas;
- b) Estudo da atividade e estabilidade da enzima imobilizada;
- c) Comparação de reatores. Desenvolvimento de modelos.

A programação do curso, como se pode constatar, cobriu adequadamente o tema central proposto. A imobilização de enzimas e de microrganismos, que apresenta grande interesse potencial para o Brasil, tem carecido de cursos como estes de iniciação de pessoal técnico.

A abordagem teórica dos métodos de imobilização associada aos estudos cinéticos e difusionais foi complementada pela consideração de tipos de reatores e respectivas equações de dominação do processo.

Apesar do curto espaço de tempo alocado ao curso, na parte prática foram abordados os parâmetros essenciais para o desenvolvimento inicial de implantação técnica e de modelagem de processo e reatores.

Bruno Carlos de A. Cunha
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
USP
Caixa Postal 30786
01000 São Paulo SP

Fotolitos e Impressão

 **GRÁFICA
EDITORAS
HAMBURG**

Avenida Bogaert, 64
Vila das Mercês São Paulo
Fone: 914-0233
CEP 04238