

# Revista de Microbiologia

*Pagina*



# SBM

Sociedade  
Brasileira de  
Microbiologia

São Paulo — Brasil

Volume 15 Número 2 Abr. Jun. 1984

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

**NOMENCLATURA DE MICRORGÂNISMOS** — A combinação binomial, nome do gênero seguido do da espécie, é adotada e a nomenclatura apresentada no "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (8.<sup>a</sup> ed., 1974) obedecida. Se o Autor tiver desse nomenclátor, 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) os(només) 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 secção Referências Bibliográficas as citações devem ser por ordem alfabética de autor (ou da mesma combinação de autores) e, para um mesmo autor, em ordem cronológica, numeradas sequencialmente. Os artigos em periódicos devem ser citados na seguinte ordem: nome(s) do(s) autor(es) em maiúsculas e minúsculas, 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" poderão ser adequadamente mencionadas no texto, mas não serão aceitas como referências bibliográficas.

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

**ILUSTRAÇÕES** — Cada uma das duas vias do manuscrito deverá ser acompanhada de um conjunto completo de ilustrações (preferivelmente como fotografias). Os gráficos e desenhos devem ser concluídos, não requerendo qualquer montagem ou rearranjo. Nenhuma parte do gráfico deverá ser datilografada, devendo ser usado um e o mesmo normógrafo. As fotografias de ilustrações a traço devem ser feitas em papel de alto contraste apropriado. É recomendável submeter gráficos e desenhos no dobro da impressão final da Revista, prevendo-se todos os elementos da figura para as escalas de redução. Fotografias com reticulas devem ser feitas em papel brillante, com contrastes adequado para a reprodução na escala 1:1, observando 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

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

Pertence à:

REVISTA DE MICROBIOLOGIA - SBM  
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374  
Cid. Universitária - USP  
05508-900 — São Paulo/SP

**Diretor Associado** 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: 2 ORTN's 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  
Jpão S. Furtado  
Instituto de Botânica  
Caixa Postal 4005  
01000 São Paulo SP

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

Vice-Presidente  
Paulo Pinto Gontijo Filho  
Instituto de Microbiologia UFRJ  
Centro de Ciências da Saúde  
Bloco I — Ilha do Fundão  
20000 Rio de Janeiro RJ

Tesoureiro  
Milton Mangini  
01000 São Paulo SP

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

## **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 Lily do Brasil Ltda.

Embrabio - Empresa Brasileira de Biotecnologia Ltda.

Indústrias Químicas e Farmacêuticas Schering S.A.

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

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

**REVISTA DE MICROBIOLOGIA**  
**PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA**  
**VOLUME 15 ABRIL-JUNHO 1984 NÚMERO 2**  
**REV. MICROBIOL. (S. PAULO), 15(2)**

	<b>CONTEÚDO</b>	<b>CONTENTS</b>	
Durigon, Edison Luiz Mós, Eduardo do N. & Santos, Manoel Armando dos	41	Similaridade de resultados com diferentes métodos de coloração diferencial de viabilidade em <i>Mycobacterium bovis</i>	<i>Similarity of the results with different staining methods in the viability of Mycobacterium bovis</i>
Barcellos, David Emilio S.N. de Oliveira, Sérgio J. de & Borowski, Sandra Maria	45	Classificação sorológico de amostras de <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> , isoladas de suínos, no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil	<i>Serologic classification of Erysipelothrix rhusiopathiae strains from pigs in the State of Rio Grande do Sul, Brazil</i>
Plotkowsky, Maria Cristina & Suassuna, Italo	48	Fenômeno de Dienes em <i>Proteus</i> : ausência de correlação com a estrutura antigenica e a produção de metabólitos difusíveis	<i>Dienes phenomenon in Proteus: lack of correlation to antigenic structure and to production of diffusible metabolites</i>
Ferreira, Maria das D. Pinto, Vera Lúcia L.T. & Hofer, Ernesto	54	Manipuladores de alimentos em restaurantes de Belo Horizonte, portadores de <i>Salmonella</i>	<i>Food handlers as Salmonella carriers in restaurants of Belo Horizonte, Minas Gerais</i>
Oliveira, Maria Cecília F.L. de & Kiyan, Choiti	60	Ação da difenilamina (DPA) sobre <i>Candida utilis</i> em condições proliferativas	<i>The effects of diphenylamine on Candida utilis under proliferating conditions</i>
Araujo, Janete Magali de Lyra, Francisco D. de A. & Kurylowicz, Włodzimierz	67	Recombinação em <i>Streptomyces</i> produtores de antibióticos por fusão de protoplastos	<i>Recombination in antibiotic producing Streptomyces by protoplast fusion</i>
Campos-Takaki, Galba Maria Takaki, Massanori Rios, Eugênio M. & Araújo, Janete Magali	82	Glucose isomerase de <i>Zymomonas mobilis</i>	<i>Glucose isomerase from Zymomonas mobilis</i>
Ferreira, Suelly V. Servulo, Eliana F.C. Silva, Iracema M. da & Martelli, Hebe L.	86	Isolamento de bactérias produtoras de hidrogênio em biodigestores	<i>Isolation of H<sub>2</sub>-producing enterobacteria from biodigestors</i>

França, Francisca P. de Castro, Angela Christina D. de & Leite, Selma G.F.	89	Desempenho de <i>Aspergillus niger</i> A1 na fermentação cítrica	<i>Citric acid fermentation with Aspergillus niger A1</i>
Martins, Maria Therezinha Alves, Maria Neusa Sanchez, Petra S. & Sato, Maria Inês Z.	94	Avaliação da relação coliformes fecais/estreptococos fecais na caracterização da poluição fecal em um rio subtropical	<i>Evaluation of the fecal coliform/fecal streptococci ratio in the characterization of fecal pollution in a subtropical river</i>
Informação Técnico-Científica SBM	103		

## SIMILARIDADE DE RESULTADOS COM DIFERENTES MÉTODOS DE COLORAÇÃO DIFERENCIAL DE VIABILIDADE EM *MYCOBACTERIUM BOVIS*

Edison Luiz Durigon  
 Eduardo do Nascimento Mós  
 & Manoel Armando Azevedo dos Santos

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

### Resumo

Comparação de resultados de métodos diferenciais, para células viáveis e inviáveis, propostos por Murohashi & Yoshida, Lack e Biryukova, com *Mycobacterium bovis* (BCG), utilizando-se a técnica para bacilos álcool ácido resistentes como controle. Emprego de esfregacos, com e sem tratamento físico (autoclavagem a 120°C durante 20 min; aquecimento em banho-maria, a 80°C, durante 30 min. seguidos de rápido resfriamento) ou químico (formol diluído a 1:10; hidrólise em 1NHCl a 60°C, durante 10min.). Todos os métodos deram resultados semelhantes: micobactérias coram-se em verde e as inviáveis em rosa.

### Summary

*Similarity of the results with different staining methods in the viability of Mycobacterium bovis*

A comparative study of the results of differential methods, for viable and non viable cells, proposed by Murohashi & Yoshida, Lack e Biryukova, with *Mycobacterium bovis* (BCG), was performed using the technic for the alcohol acid resistant bacilli as control. Smears with and without physical treatment (autoclavation at 120°C for 20 min; immersion in a water-bath at 80°C for 30 min., followed by quick cooling) or chemical treatment (formaldehyde 1:10 and hydrolysis with HCl-1 N 60°C for 10 min.). All these methods presented similar results: viable mycobacteria were stained greenish whereas no viable ones stained pink.

### Introdução

Métodos de coloração, para distinguir células viáveis e não-viáveis, em micobactérias, deram os seguintes resultados: células vivas coram-se em azul e mortas em rosa (7); viáveis em verde e inviáveis em rosa, quando coradas, respectivamente, por verde malaquita e safranina (3); paralelismo, entre as proporções de células coradas em verde e as capazes de se multiplicar em cultivo, embora tivesse sido observado que, quando mortas pelo calor, os bacilos (BCG) permaneciam corados em verde, por algum tempo, até adquirirem a coloração rosa, pela safranina (9). Este último resultado deixou dúvidas quanto ao método de Lack (3), para avaliação de vacina.

Estudo citoquímico na diferenciação, em micobactérias, pela técnica de Lack (3) modificada (4), demonstrou que o verde de malaquita cora o ADN altamente polimerizado e que a saframina ou a fucsina coram as estruturas celulares restantes, após a despolimerização do ácido nucléico. Resultados bastante satisfatórios foram obtidos com métodos de coloração semelhantes aos de Murohashi & Yoshida (4), em *Mycobacterium leprae* (1).

O presente contém dados sobre a comparação dos métodos propostos por Murohashi & Yoshida (4), Lack (3) e Biriukova (1), usando-se como controle, o de Ziehl-Neelsen (2, 8), para bacilos álcool-ácido resistentes.

#### Material e Métodos

**Suspensão bacteriana** - Amostras de *Mycobacterium bovis* (BCG), provenientes do Instituto Butantan, São Paulo, semeadas em meio de Loewenstein Jensen (BBL) e incubadas a 37°C por 30 dias. Com auxílio de alça de platina, o crescimento foi ressuspenso em 5ml de água destilada estéril, ajustando-se a turvação da suspensão, de acordo com o tubo 2 da escala de Mac-Farland. Após padronização, foram feitas diluições seriadas em razão de 10, até o tubo  $10^{-6}$ , semeando-se 0,01ml de cada diluição em tubos contendo o meio de Loewenstein Jensen, que foram incubados a 37°C por 30 dias. Após este período, o número de colônias de cada tubo foi contado, de acordo com as respectivas diluições, escolhendo-se a diluição  $10^{-2}$ , que corresponde aproximadamente a  $300 \times 10^2$  unidades formadoras de colônias por ml. A partir de suspensões assim padronizadas, foram retiradas cinco aliquotas divididas da seguinte forma: uma sem nenhum tratamento, duas tratadas por agentes físicos e, duas por agentes químicos. A partir das aliquotas sem tratamento, assim como após o tratamento das outras quatro, foram feitos esfregáculos como descrito para a coloração de Ziehl-Neelsen (8) que, após secagem e fixação pelo calor, foram coradas pelos métodos propostos.

Além das colorações, foram semeados cinco tubos de Loewenstein Jensen, para cada amostra estudada, a fim de se estabelecer relação entre a contagem bacteriana de viáveis por bacterioscopia e o número de unidades formadoras de colônias em meio de Loewenstein Jensen.

**Tratamento físico das suspensões** - Uma das aliquotas, para tratamento físico, foi submetida à autoclavagem a 120°C por vinte minutos, sendo então realizados esfregáculos, fixados pelo calor, em número de 10, para cada método de coloração, imediatamente após a autoclavagem, e outros 10, para cada método de coloração, após manutenção da aliquota autoclavada, por sete dias, a temperatura ambiente. Outra parte da aliquota foi aquecida a 80°C, em banho-maria, por 30 minutos e, após resfriamento rápido, a 4°C, foram realizados 10 esfregáculos, para cada método de coloração.

**Tratamento químico das suspensões** - Uma das aliquotas foi centrifugada a 2.000rpm por 10 minutos e o sedimento foi ressuspenso para o volume inicial em formaldeído 1:10, tendo-se realizado 10 esfregáculos para cada método de coloração, imediatamente após o tratamento e outros 10, após sete dias, mantendo-se a amostra a temperatura ambiente. Outra parte da aliquota foi centrifugada a 2.000rpm por 10 minutos e o sedimento foi ressuspenso para o volume inicial em HCl-1N e aquecido a 60°C por 10 minutos e, imediatamente após, foram realizados 10 esfregáculos para cada método de coloração.

**Método de Lack** - A lâmina é coberta com uma solução de verde malaquita a 1%, aquecida a 70°C, por cinco minutos, sendo substituída por corante novo, aquecido a 70°C por mais cinco minutos. O corante é despejado, lavando-se o esfregáculo, delicadamente em água corrente, cobrindo-se com solução aquosa de saframina a 5%, por 10 minutos, a temperatura ambiente. lava-se delicadamente, em água corrente, e deixa-se a temperatura ambiente. As bactérias viáveis coram-se em verde e as não viáveis em rosa.

*Método de Murohashi & Yoshida* - A lâmina é coberta com solução de verde malaquita a 1% aquecida a 70°C, por cinco minutos. Derrama-se o corante, lavando-se o esfregamento, delicadamente, em água corrente e sobre-se com solução de fucsina de Ziehl diluída a 1:10, por cinco minutos, a temperatura ambiente. Descora-se o excesso de fucsina com ácido nítrico a 2% por alguns segundos. lava-se, delicadamente, em água corrente e seca-se a temperatura ambiente. As bactérias viáveis coram-se em verde e as não viáveis em rosa.

*Método de Biriyukova* - A lâmina coberta com solução de verde malaquita a 1%, aquecida a 70°C, por cinco minutos. Derrama-se o corante, lavando-se delicadamente em água corrente, e sobre-se com solução aquosa de fucsina a 1% por cinco minutos a temperatura ambiente. Descora-se o excesso de fucsina, com ácido nítrico a 8%, por alguns segundos. lava-se, delicadamente, em água corrente, e seca-se a temperatura ambiente. As bactérias viáveis coram-se em verde e as não viáveis em rosa.

*Método de Ziehl-Neelsen* - Utilizou-se a técnica convencional (8).

## Resultados e Discussão

Imediatamente após a autoclavagem ou o tratamento em banho-maria, a proporção de bacilos corados em verde não se alteram, em relação à amostra, sem prévio tratamento. Mas, quando se manteve a mesma amostra autoclavada, por sete dias a temperatura ambiente, a maioria dos bacilos se cora em rosa (Tabela 1). Esta diferença, na coloração das células bacterianas, depende, principalmente do grau de polimerização do ADN em seu corpo e estruturas, e que, após a morte pelo aquecimento, um processo químico semelhante a despolimerização do ADN parece ocorrer nas células bacterianas dentro de vários dias de preservação em uma suspensão (4).

Apesar da fixação e colorações serem a quente, ocorrendo em razão disto possíveis mortes dos microrganismos, tais fatos não alteraram os resultados obtidos; as bactérias viáveis tiveram alteradas suas colorações, imediatamente após a morte pelo calor, uma vez que seu ADN permaneceu polimerizado, conferindo ao bacilo a coloração verde (Tabela 1).

Outro resultado relevante é que as amostras, tratadas com formaldeído, diluído a 1:10 mantiveram a coloração verde, mesmo após sete dias a temperatura ambiente, assemelhando-se muito às amostras tratadas pelo calor. Isto não ocorreu com as amostras tratadas por HCl-1N a 60°C, que tiveram todas suas células coradas em rosa, devido à hidrólise do ADN pelo HCl, causando despolimerização imediata ao ADN, ao contrário do tratamento pelo calor, no qual a despolimerização do ADN é lenta e gradativa.

Em resumo, os três métodos mostraram-se muito semelhantes, em relação à sensibilidade de coloração, pois a diferença percentual foi mínima (Tabela 1).

Embora os três métodos utilizassem corantes celulares diferentes, para evidenciar os bacilos mortos, não se verificou diferença significativa em relação à percenta-

Tabela 1 - Relação entre o percentual de bacilos corados em verde e rosa e o número de unidades formadoras de colônias, frente aos diferentes tratamentos físicos e químicos, pelas técnicas de Murohashi & Yoshida (4), Biriyukova (1) e Lack (3).

Símbolos: \* = os números entre parênteses representam os resultados da contagem de células viáveis para cada método, expresso em unidades formadoras de colônias

Amostras	M & Y (4)		B (1)		L (3)	
	% corada verde	% corada rosa	% corada verde	% corada rosa	% corada verde	% corada rosa
Sem tratamento	94	06 (320)*	90	10 (301)	95	05 (340)
120°C/20 minutos	98	02 (0)	99	01 (0)	93	07 (0)
120°C/20 minutos após sete dias a temp. ambiente	02	98 (0)	03	97 (0)	05	95 (0)
80°C/30 minutos seguido de rápido resfriamento	91	09 (0)	94	06 (0)	93	07 (0)
Formaldeído 1:10 imediatamente e após sete dias do tratamento	75	25 (0)	79	21 (0)	74	26 (0)
HCl-1N a 60°C durante 10 minutos	00	100 (0)	00	100 (0)	00	100 (0)

gem dos bacilos corados em rosa, nem aumento significativo, em seus efeitos de coloração.

A utilização do ácido nítrico, para retirada de excesso de corante, nos métodos de Murohashi & Yoshida e de Biriukova, não revelou diferença significativa nos três métodos. Todavia, o ácido nítrico foi considerado indispensável para a diferenciação dos bacilos provenientes de materiais biológicos (4), o que não foi utilizado, no presente trabalho.

Os bacilos corados em rosa são, com certeza, considerados como mortos, pelos três métodos, tomando-se certo cuidado quanto à interpretação dos bacilos corados em verde. Por manterem, em alguns casos, o ADN polimerizado, por algum tempo após sua morte, podem levar à interpretação falsa de viabilidade, embora tivesse sido demonstrada, em materiais biológicos, a existência de paralelismo regular, entre os bacilos curados em verde e o número de células viáveis (1, 3, 5, 6).

#### Referências Bibliográficas

1. Biriukova, S.V. - Détermination de la viabilité des mycobactéries de la lèpre à l'aide du procédé cytochimique. *Trop. Dis. Bull.*, 65:769-770, 1968.
2. Breed, R.S.; Murray, E.G.D. & Smith, N.R. - Bergey's manual of determinative bacteriology. 8.ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1974.
3. Lack, C.H. - Observations on the staining and culture of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Path. Bact.*, 65:278, 1953.
4. Murohashi, T. & Yoshida, K. - Cytochemical studies on the differentiation of living and dead acid-fast bacilli. *Acta Tuberculosea Scandinav.*, 34:208-225, 1957.
5. Murohashi, T. - Application of malachite green fuchsin staining to the evaluation of the therapeutic effect of kanamycin administration on the rats of murine leprosy. *Acta Tuberculosea Scandinav.*, 38:11-23, 1960.
6. Murohashi, T. - Differential staining of leprosy bacilli by malachite green fuchsin method. Leprosy Research Committee, 6:28-33, 1963.
7. Proca, G. - Coloração diferencial das bactérias mortas. *Rev. Med. (São Paulo)*, 13:218, 1910.
8. Runyon, E.H.; Karlson, A.G.; Kubik, G.P. & Waying, L.G. - *Mycobacterium*. In: - Kenette, E.H.; Spaulding, E.H. & Truant, J.P. - Manual of clinical microbiology. 2.ed. Washington, D.C., American Society for Microbiology, 1974.
9. Sievers, O. - Swedish BCG vaccine. *The Scandinavian J. Clin. Lab. Invest.*, 6:11, 1954.

CLASSIFICAÇÃO SOROLÓGICA DE AMOSTRAS DE *ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE*, ISOLADAS DE SUÍNOS, NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

David Emilio S. Neves de Barcellos  
 Sérgio J. de Oliveira  
 & Sandra Maria Borowski

Laboratório de Patologia Suína  
 Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor"  
 (IPVD)  
 Caixa Postal 2076  
 90000 Porto Alegre RS, Brasil

**Resumo**

Classificação sorológica de 133 amostras de *Erysipelothrix rhusiopathiae*, pela técnica de imunodifusão dupla em gel, contra uma bateria de 16 antíseros, produzidos a partir de amostras padrões. Houve reação entre os抗ígenos usados e sete antíseros. Foram analisadas bactérias de 21 animais, com quadro clínico de doença septicêmica, e de 112 animais portadores sadios. Foram encontrados, com maior frequência, nas duas situações, os sorotipos 1a, 1b, e 2b. O sorotipo 11 é descrito pela primeira vez, em associação com quadro clínico de doença septicêmica, em suíno.

**Summary**

*Serologic classification of Erysipelothrix rhusiopathiae strain from pigs in the State of Rio Grande do Sul, Brazil*

133 strains of *Erysipelothrix rhusiopathiae* were serotyped, using the gel double immunodiffusion test, against a set of 16 antisera. There was reaction of the antigens with seven antisera. Bacteria isolated from 21 pigs with septicemic disease and 112 healthy carriers were analysed. In both cases, the most prevalent serotypes were 1a, 1b, and 2b. Serotype 11 is described for the first time in association with a septicemic disease in pigs.

**Introdução**

A erisipela suína foi descrita, pela primeira vez no Brasil, em 1957 (3), em materiais coletados em matadouro. A primeira descrição da ocorrência da doença, a campo, foi feita no mesmo ano (5).

A estrutura antigenica do *E. rhusiopathiae* é complexa. Existem抗ígenos termolábeis, comuns à maioria das amostras da bactéria, e抗ígenos termoestáveis, tipospecíficos, que permitem a diferenciação sorológica entre amostras de *E. rhusiopathiae*. Algumas amostras não apresentam抗ígenos termoestáveis, sendo classificados como amostras "N" (10).

Inicialmente, foram reconhecidos dois grupos sorológicos de *E. rhusiopathiae* (8). A partir de então, foram identificados 20 tipos sorológicos (9).

No Brasil, foram classificadas, sorologicamente, 110 amostras de *E. rhusiopathiae* (2), isoladas de amígdalas de suínos e superfície corporal de peixes, demonstrando a presença dos grupos 1, 2, 3, 4, 9, 10, 11 e N, além de três grupos adicionais, I, II e III.

A classificação das bactérias em sorotipos é importante, do ponto de vista imunológico, pelos seguintes fatores (9): (a) somente certas amostras de *E. rhusiopathiae* apresentam características imunogênicas, adequadas à produção de vacinas e (b) diferentes sorotipos apresentam características peculiares, na relação com o hospedeiro (suíno), principalmente, considerando-se as diferentes manifestações clínicas da doença.

O objetivo deste trabalho foi classificar, sorologicamente, amostras de *E. rhusiopathiae*, isoladas de suínos, portadores ou com a forma septicêmica da erisipela.

#### Material e Métodos

*Amostras de E. rhusiopathiae* - 133 cepas, das seguintes origens: 103 de amígdalas de suínos sadios; 21 de baços de suínos com doença septicêmica; e nove de fezes de suínos sadios. A técnica para o isolamento de amostras já foi publicada (11).

*Testes sorológicos* - Imunodifusão dupla em gel, com antisoros produzidos em coelhos, contra 16 sorotipos padrões (6), a saber: 1a, 1b, 2a, 2b, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14 e 15.

*Antígenos* - Obtidos a partir de crescimento, em meio tryptose soro (4).

#### Resultados e Discussão

Foram detectados sete sorotipos, entre os 16 padrões testados (Tabela 1). As amostras diagnosticadas, com maior frequência (2b, 1b e 1a), representaram 40,6%, 19,5% e 5,2% dos isolamentos, respectivamente. Estes dados coincidem com estudos realizados em outros países (4, 7).

Somente os sorotipos 1 e 2 são isolados com frequência, a partir de suínos doentes (11). Além destes, Cross & Claxton (4) descreveram a associação dos sorotipos 4 e 7, com casos de artrite. No presente trabalho, é demonstrada, pela primeira vez, a presença do sorotipo 11, em suíno com quadro de doença septicêmica.

A partir de suíno sadios, no Brasil, haviam sido isolados anteriormente os sorotipos 1, 2, 3, 4, 9, 10, 11, 12, 13, 14 (2). Em nosso trabalho, entre estes sorotipos, foram identificados os de número 1, 2, 3, 11, sendo o primeiro isolamento do sorotipo 5.

Alguns抗ígenos reagiram com mais de um antízoro. Além da reação cruzada, entre os sorotipos 1a e 1b, já referida (4), há a possibilidade de que as culturas, usadas na produção dos抗ígenos, representassem mais de um sorotipo de *E. rhusiopathiae*, caracterizando uma infecção mista.

Os sorotipos 1a, 1b, 2b e 11 ocorreram tanto em animais sadios, como naqueles que apresentaram sinais clínicos e/ou lesões de doença septicêmica, o que ressalta a importância do suíno portador, na epidemiologia da enfermidade.

Foi observado que 41 amostras não reagiram frente aos antízoros testados, não tendo sido possível classificá-las como formas "N". Para tanto, seria necessária a demonstração de que estas amostras realmente não possuem抗ígenos termoestáveis. Além desta possibilidade, as amostras que não reagiram, frente aos antízoros usados no presente trabalho, poderiam pertencer a algum dos sorotipos, não incluídos na

Tabela 1 - Classificação sorológica de amostras de *E. rhusiopathiae* isoladas de suínos

Origem das amostras	Sorotipo															Não tipáveis	Total
	1a	1b	2a	2b	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	15	
Amígdalas	6	21	1	47	1	-	2	-	-	-	-	1	-	-	-	24	103
Baço	1	4	-	5	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	12	21
Fezes	-	1	-	2	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	5	9
Totais	7	26	1	54	1	-	2	-	-	-	-	4	-	-	-	41	133

bateria do teste, ou representar um sorotipo ainda não classificado.

Pequeno número de抗igenos reagiu contra mais de um soro. As combinações obtidas foram: 1a+1b: 10抗igenos; 1a+2b: 2抗igenos; 2a+2b: 1抗igeno; 2b+3+5: 1抗igeno. Nestes casos, foi considerado que a população bacteriana estudada estava representada por mais de um sorotipo, sendo computadas, para fim de classificação sorológica, as diferentes reações positivas dentro de um mesmo抗igeno.

#### Agradecimentos

Agradecemos ao Dr. Peter Claxton, do Department of Agriculture of New South Wales, Glenfield Station, Australia, pela cessão dos sorotipos padrões de *E. rhusiopathiae*.

#### Referências Bibliográficas

1. Barcellos, D.E.S.N. - Infecção de suínos por *Erysipelothrix rhusiopathiae* no Rio Grande do Sul. Bol. IPVDF, 6:19-27, 1979.
2. Castro, A.F.P.; Trabulsi, L.R.; Campedelli, F.O., & Troise, C. - Characteristics of strains of *E. rhusiopathiae* isolated in Brazil. Rev. Microbiol. (São Paulo), 3:11-24, 1972.
3. Crocco, A. - Primeiros casos de "Erisipela" em suínos autóctones no Brasil. Arquivos do IPVDF, 2:70-76, 1957.
4. Cross, G.M.J. & Claxton, P.D. - Serological classification of Australian strains of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from pigs, sheep, turkeys and man. Australian Veterinary Journal, 55:77-81, 1979.
5. Dias, L.C.M. - Erisipela suína em Três Passos. Bol. DIPAN, 10:27-29, 1957.
6. Ouchterlony, O. - Immunodiffusion and immunelectrosmophoresis. In: - Weir, M. - Handbook of experimental immunology. Oxford, Blackwell, cap.19, p.655-706, 1967.
7. Perrin, G. - Étude de 48 souches d'*Erysipelothrix rhusiopathiae*: détermination des sérotypes. Revue Méd. Vet., 133:347-350, 1982.
8. Watts, P.S. - Studies on *Erysipelothrix rhusiopathiae*. J. Path. Bact., 50:355-369, 1940.
9. Wood, R.L. & Harrington, R. - Serotypes of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from swine and from soil and manure of swine pens in the United States. Am. J. Vet. Res., 39:1833-1840, 1978.
10. Wood, R.L. - Erysipelas. In: - Leman, A.D.; Glock, R.D.; Menegeling, W.L.; Penny, R.H.C.; School, E. & Straw, B. - Diseases of swine. 5.ed. Ames, Iowa State University Press, cap.43, p.457-470, 1981.
11. Wood, R.L. & Shuman, R.D. - Erysipelas. In: - Dunne, H.W. & Leman, A.D. - Disease of swine. 4.ed. Ames, Iowa State University Press, cap.30, p.565-620, 1975.

## FENÔMENO DE DIENES EM PROTEUS: AUSÊNCIA DE CORRELAÇÃO COM A ESTRUTURA ANTIGÊNICA E A PRODUÇÃO DE METABÓLITOS DIFUSÍVEIS

Maria Cristina Plotkowski  
& Ítalo Suassuna

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

### Resumo

O fenômeno de Dienes consiste na formação de linha de demarcação no local de encontro do crescimento invasivo de duas amostras de estirpes diferentes de *Proteus*, quando se defrontam na superfície de um meio sólido. O estudo de amostras de *P. mirabilis* e de *P. vulgaris* não revelou correlação entre estrutura antigênica e a antibiose bacteriana evidenciada pelo teste de Dienes. Também não foi possível detectar substâncias tóxicas às quais se pudesse atribuir a inibição do espraiamento, no confronto de cepas incompatíveis.

### Summary

*Dienes phenomenon in Proteus: lack of correlation to antigenic structure and to production of diffusible metabolites*

The Dienes phenomenon among *Proteus* cultures was investigated aiming to determine any possible causative correlation between it and the antigenic structure of *P. mirabilis* and *P. vulgaris* what could not be established since the demarcation line was produced among strains of the same somatic or flagellar antigen. On the other hand, a compatible result of the Dienes test was found between O and H serologically distinct strains. No evidence was found of toxic products which could be responsible for the swarming inhibition among different strains.

### Introdução

Quando duas amostras de *Proteus*, de mesma estirpe, crescem na superfície de meios sólidos, o espraiamento, que as caracteriza, mostra-se confluente. Quando as cepas são diferentes, no local de encontro forma-se uma linha de demarcação, separando os crescimentos, evidenciando antagonismo entre elas. Tal fenômeno foi descrito por Dienes (3, 4).

Ao microscópio, vê-se que, na linha de separação, o meio abriga fina camada de microrganismos de ambos os tipos. A princípio, as duas linhas de "swarming" permanecem sem limites e se interpenetram. Com o tempo, a proliferação bacteriana é inibida, na área de contato dos crescimentos. A seguir, as longas formas filamentosas oponentes, típicas do crescimento invasor, transforma-se em corpúsculos redondos, característicos de ciclo L incompleto (1, 14, 18).

Wolstenholme (20) comprovou que os corpúsculos viáveis pertencem a apenas uma das duas amostras, ressaltando o antagonismo entre elas. O contato entre as duas estípites oponentes parece ser essencial, porém, algumas vezes, os corpúsculos redondos formam-se à distância do ponto de união, o que levou Dienes (3, 4) a concluir que haveria difusão de substâncias antagônicas no meio.

Diversas hipóteses foram levantadas, com vistas a explicar a formação de linha de demarcação. Alguns autores crêem que ela resulte da difusão de substâncias tóxicas, não voláteis (16). Embora, em meio líquido, não seja possível demonstrar o antagonismo entre amostras diferentes (1), filtrados de cultura líquida de *Proteus mirabilis* podem induzir a transformação em fase L de amostras incompatíveis (5).

Outros autores relacionam a linha de demarcação com a estrutura antigênica, principalmente flagelar. Amostras com抗igenos H diferentes são inibidas, mesmo que seus抗igenos O sejam iguais (2, 9).

O presente estudo teve por objetivos determinar a correlação entre Fenômeno de Dienes e sorotipagem, assim como, detectar a presença de substâncias tóxicas difusíveis, responsáveis pela formação da linha de demarcação.

#### Material e Métodos

Foram estudadas 60 amostras, sendo 42 de *P. mirabilis* e 28 de *P. vulgaris*, correspondentes a amostras tipo do esquema de classificação sorológico Kauffmann & Perch (8) e de Perch (11), portanto, de composição antigênica conhecida.

Para a realização do teste foram utilizadas placas com agar simples a 1,4%, em camada com cerca de 6mm de espessura. As placas foram montadas, com papel absorvente na tampa e mantidas a 37°C, por 48hs, para eliminação da umidade excessiva do meio. A semeadura das amostras na placa foi feita com agulha (formação de "spots"). Seguiu-se incubação a 37°C, por 24hs e leitura do teste, com auxílio de lâmpada de luz branca, contra fundo escuro. Quando o crescimento confluinte era homogêneo, o fenômeno de Dienes foi considerado negativo (biotipos idênticos). O teste positivo caracterizou-se pelo aparecimento de linha de demarcação.

Entre as 42 amostras disponíveis de *P. mirabilis*, 17 foram selecionadas como indicadoras de biotipos, com base no aparecimento das linhas de demarcação. As escolhidas foram aquelas que, após confronto do número total de cepas, entre si, apresentaram compatibilidade com pelo menos uma outra. Posteriormente, essas indicadoras foram confrontadas com as 42 totais, para determinação do "grupo Dienes". A composição antigênica dessas indicadoras era conhecida (Tabela 1). Posteriormente, todas as amostras pertencentes ao mesmo grupo Dienes foram confrontadas entre si.

O critério adotado para a seleção das indicadoras de *P. vulgaris* foi a diferença na composição antigênica, no que diz respeito aos抗igenos flagelares (Tabela 2).

Na tentativa de detectar substâncias difusíveis, responsáveis pela inibição do espraiamento de *Proteus*, foram realizados os seguintes experimentos:

**Ensaios 1** - 10 amostras de *P. mirabilis* e 10 de *P. vulgaris* foram semeadas, por simples toque de agulha, no centro de placas de agar simples, a 2,5%, a menor concentração de agar capaz de inibir os seus espraiamentos. Seguiu-se incubação por 48hs a 37°C, a fim de haver envelhecimento da cultura e adição de nova camada de agar simples, a 1,4%. Metade das placas, assim obtidas, foram utilizadas, imediatamente. As demais apenas após nova incubação, a 37°C

Tabela 1 - Composição antigênica de amostras indicadoras de *Proteus mirabilis*, de coleção internacional

Amostra nº	Composição antigênica
1	O 3 a, b H 1 a, c, e
2	O 3 a, b H 2 a, b, e, f
3	O 6 a H 1 a, c, e
4	O 7 a, c H 3 a, b
5	O 10 a H 3 a, b
6	O 10 a H 5 a
7	O 11 a, d H 2 a, b, e, f
8	O 12 a H 2 a, c, e
9	O 16 a, b H 9 a
10	O 19 a, c, d H 1 a, c, e
11	O 20 a H 2 a, c, e
12	O 26 a, 3b H 2 a, c, e
13	O 27 a H 2 a, c
14	O 29 a H 13 a
15	O 35 H 2
16	O 38 H 1
17	O 49 H 2

por 48hs. Algumas foram inoculadas, em algum ponto localizado na periferia, com amostras diferentes daquela semeada no centro. Outras placas, com a mesma cepa, inoculada inicialmente, foram utilizadas como controle. Seguiu-se nova incubação, a 37°C por 24hs e leitura do teste.

**Ensaios 2 - Semelhante ao anterior, diferindo apenas pela adição de fina camada de agar salina, a 2,5%, sobre o agar simples, de igual concentração, utilizado para bloquear a penetração da amostra, na terceira camada acrescentada, correspondente a agar simples, a 1,4%.**

**Ensaios 3 -** Foram preparados filtrados, de culturas líquidas de 48hs (caldo simples), de cinco amostras de *P. mirabilis* e cinco de *P. vulgaris*, em filtro Seitz, esterilizante. Os filtrados foram colocados em orifícios, de cerca de 16mm de diâmetro, feitos no centro de placas de agar simples, a 1,4%. Seguiu-se, imediatamente à semeadura, na periferia de cada placa, de amostra igual ou diferente à que dera origem ao filtrado. Após incubação, a 37°C por 24 horas, foi feita a leitura.

**Ensaios 4 -** Foram preparados filtrados de cinco amostras de *P. mirabilis* e cinco de *P. vulgaris*, de forma idêntica à descrita acima. Tais filtrados, brutos e nas proporções de 1/4, 1/2 e 3/4, com caldo simples, foram utilizados como meios básicos, para preparação de placas de agar simples, a 1,4%. No centro de cada uma, foi semeada amostra, igual ou diferente da que dera origem ao filtrado.

**Ensaios 5 -** 10 amostras de *P. mirabilis* e 10 de *P. vulgaris* foram semeadas, por picada, em 2,5ml de agar extrato de levedura a 0,3% (agar Merck), contidas em tubos 13x100mm, sendo esta a maior concentração de agar que ainda permitiu a observação da mobilidade de *Proteus*, assim semeados. Após 48hs a 37°C, adicionou-se fina camada de agar salina, a 2,5%, para bloquear a penetração da amostra, na terceira camada de meio acrescentada. Esta correspondeu a 3ml de agar extrato de levedura, a 0,3%, acrescido de cloreto de trifenil tetrazólio, a 0,01%. Seguiu-se semeadura, por picada curta, de amostra igual ou diferente à inoculada, inicialmente. Após 48hs a 37°C, procedeu-se à leitura.

## Resultados

Após o confronto das amostras de *P. mirabilis* com as indicadoras, apenas 17 (40,5%) puderam ser classificadas em Grupos Dienes, isto é, apresentaram identidade com uma ou mais das indicadoras. Das amostras de *P. vulgaris*, somente três (11,5%) foram classificadas, sendo que os testes negativos corresponderam ao confronto de uma amostra consigo mesma.

**Tabela 3 - Padrão antigênico de amostras internacionais de *Proteus mirabilis*, do mesmo Grupo Dienes, que apresentaram compatibilidade entre si (Fenômeno de Dienes negativo) e das que não apresentaram compatibilidade (Fenômeno de Dienes positivo)**

Composição antigênica	Amostras compatíveis			Amostras não compatíveis		
	Antígeno			Antígeno		
	H idêntico O desigual	H desigual O idêntico	H desigual O desigual	H idêntico O desigual	H desigual O idêntico	H desigual O desigual
número	4	3	31	5	-	27
% s/o total de 70 combinações	5,7	4,3	44,3	7,1		38,6
% s/o total de 38 resultados compatíveis	10,5	7,9	81,6	15,8		84,2

**Tabela 2 - Composição antigênica de amostras indicadoras de *Proteus vulgaris***

Amostra nº	Composição antigênica
1	H a, b, d
2	H 1 a, b, c
3	H 8 a
4	H 16 a
5	H 7 a
6	H 11 a
7	H 2 a, d, f
8	H 6
9	H 18
10	H 19

Conhecida a composição antigênica das 42 amostras de *P. mirabilis* estudadas, pode-se determinar se as que apresentavam teste de Dienes negativo eram iguais e as que davam resultado positivo, diferentes, quanto aos抗ígenos flagelados e somáticos. Tal não ocorre (Tabela 3). Procedimento idêntico não pode ser adotado para *P. vulgaris*: toda vez que uma amostra definiu um grupo Dienes, ela o fez quando cruzada consigo mesma. Para avaliar a correlação entre Fenômeno de Dienes e sorologia em *P. vulgaris*, foi comparada à composição antigênica, de todas cepas testadas. O total de cruzamentos referidos é de 155, e não de 200, porque foram excluídos os testes que apareciam pela segunda vez (Tabela 4). Também em *P. vulgaris* não se observou correlação entre composição antigênica e Fenômeno de Dienes: dos 130 testes positivos, 22 (16,9%) ocorreram entre amostras com antígeno flagelar idêntico e sete (5,4%) entre cepas com抗ígenos O e H iguais.

Os resultados obtidos nas tentativas de detectar a presença de substâncias difusíveis responsáveis pela inibição do espraiamento de *Proteus* no teste de Dienes positivo, foram os seguintes:

*Ensaios 1* - A amostra semeada, centralmente, na primeira camada de meio, penetrou no agar simples, a 1,4% espraiando-se em sua superfície, até bem próximo das amostras inoculadas na periferia, levando à inibição relativa do "swarming". Quando as duas amostras inoculadas eram diferentes, pode-se observar, ocasionalmente, formação de linha de demarcação. Quando iguais, o crescimento na camada superior era homogêneo.

*Ensaios 2* - A adição da camada intermediária de agar salina, a 2,5%, bloqueou a penetração da amostra central, na terceira camada, correspondente ao agar simples. As cepas, semeadas na periferia, apresentaram crescimento invasivo, por toda a superfície do meio, sem formação de qualquer halo de inibição, acima da amostra central. Não se observou diferença, entre as placas semeadas com cepas idênticas ou diferentes.

*Ensaios 3* - A adição de filtrado, de cultura líquida de *Proteus*, a um orifício central, em placas de agar simples, não foi capaz de inibir o crescimento invasivo de amostras iguais ou diferentes da que deu origem ao filtrado.

*Ensaios 4* - O uso de filtrados, de cultura líquida, de diferentes amostras de *Proteus*, para o preparo de meios de cultura, não foi capaz de inibir o "swarming" das amostras neles semeadas, independentemente da concentração utilizada.

*Ensaios 5* - A adição da camada intermediária de agar salina, a 2,5%, foi capaz de bloquear a penetração da primeira amostra semeada, na porção superior do meio. A estirpe inoculada apresentou grande mobilidade, havendo redução do cloreto de trifenil tetrazólio, em toda a extensão do meio. Não se observou diferença entre as cepas estudadas e seus controles.

## Discussão

Os resultados obtidos demonstram a inexistência de qualquer relação entre o aparecimento de linha de demarcação e a composição antigênica das amostras. Várias cepas, com antígeno flagelar idêntico, apresentaram teste positivo, enquanto outras, com抗ígeno H e/ou O diversos, apresentaram crescimento homogêneo. Tais resultados corroboram os descritos por outros autores (10, 12, 14, 17). Se-

Tabela 4 - Padrão antigênico de amostras de *Proteus vulgaris* que apresentaram compatibilidade entre si (Fenômeno de Dienes negativo) e das que não apresentaram compatibilidade (Fenômeno de Dienes positivo)

Teste de Dienes	Antígeno								Total
	O idêntico N	O idêntico %	O desigual N	O desigual %	H idêntico N	H idêntico %	H desigual N	H desigual %	
Positivo	7	4,5	1	0,7	15	9,7	107	69,0	130 83,9
Negativo	3	1,9	-	-	-	-	-	-	3 1,9
Dúvidoso	2	1,3	-	-	3	1,9	17	11,0	22 14,2
Soma	12	7,7	1	0,7	18	11,6	124	80,0	155 100,0

gundo Tracy & Thomson (19), os trabalhos de Krikler (9) e Cunliffe & col. (2) meramente refletem a correlação entre dois métodos de tipagem - o que não pode ser considerado como explicação do fenômeno. Na verdade, é difícil imaginar como a diferença, na composição flagelar, poderia produzir as modificações descritas por Dienes. O autor (3, 4) notou que as formas filamentosas, observadas durante o estágio de espraiamento de *Proteus*, tendem a se transformar em corpúsculos redondos, quando submetidas a condições adversas, como refrigeração, transferência para água morna ou para caldo com cloreto de mercúrio. De modo idêntico, a formação desses corpúsculos, quando se confrontam amostras diversas, parece resultar de antagonismo entre elas. Porque, às vezes, os halos de crescimento estacionam, com certa distância entre si, Dienes (3) concluiu haver difusão de substâncias antagonistas no meio. Hughes (7) referiu-se a dois agentes tóxicos, presentes em culturas líquidas de *Proteus*: um volátil e inespecífico, responsável pelo crescimento invasivo; outro não volátil, específico de cada amostra, que podia ser detectado no meio, após a remoção dos microrganismos, por filtração. A reinoculação do filtrado, com a mesma cepa, era seguida de crescimento normal, enquanto, com a amostra heteróloga, apareciam apenas formas filamentosas.

Filtrados de culturas líquidas de *P. mirabilis* podem induzir a transformação, em fase L, de amostras incompatíveis (5). Parece haver antagonismo mútuo, entre duas amostras diversas, cultivadas em caldo (15, 16), apesar de não serem encontradas formas filamentosas. Grabow (6) demonstrou produção de metabólitos, por *P. mirabilis* e *P. vulgaris*, capazes de inibir seus próprios crescimentos e o de outras cepas, ativos no meio sólido, após longo período de produção. Tracy & col. (19) aventurem a possibilidade de o Fenômeno de Dienes ser devido a bacteriocinas. Seria de se esperar que cada amostra produzisse proticina ativa, contra outras, de Grupos Dienes diversos, o que não foi observado em seus estudos.

São numerosas as referências a possíveis metabólitos, responsáveis pela inibição, entre amostras diversas. Nossos resultados, entretanto, não corroboram a suposição inicial, já que, em nenhum dos ensaios, pode-se observar inibição do crescimento das cepas estudadas. Resultado análogo foi obtido, em número considerável de experimentos (14), não tendo sido observado qualquer influência de filtrado estéril, de cultura de 24 horas, nem de extratos de células de uma cepa, no crescimento de amostra diferente, capaz de se espraiar por toda a placa.

#### Referências Bibliográficas

1. Coetzee, J.N. & Sacks, T.G. - Intrastrains transduction in *Proteus mirabilis*. Nature (London), 185:896-870, 1960.
2. Cunlife, A.C. & Krikler, M.S. - A cultural test for the presumptive serological identity of strains of *Proteus vulgaris*. VI Congr. Int. Microbiol., Roma, 1:271, 1953.
3. Dienes, L. - Reproductive processes in *Proteus* cultures. Proc. Soc. Expl. Biol. Med., 63:265-270, 1946.
4. Dienes, L. - Further observations on the reproduction of bacilli from large bodies in *Proteus* culture. Proc. Soc. Expl. Biol. Med., 66:97-98, 1947.
5. Falkow, S. - L forms of *Proteus* induced by filtrates of antagonistic strains. J. Bacteriol., 73:443-444, 1957.
6. Grabow, W.O.K. - Growth inhibiting metabolites of *Proteus mirabilis*. J. Med. Microbiol., 5:191-196, 1972.
7. Hughes, W.H. - A reconsideration of the swarming of *Proteus vulgaris*. J. Gen. Microbiol., 17:49-58, 1957.
8. Kauffmann, F. & Perch, B. - On the occurrence of *Proteus* X strains in Denmark. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 24:135-149, 1947.
9. Krikler, M.S. - The serology of *Proteus vulgaris*. Univ. of London, 1953. (Thesis PhD).
10. Louvois, J. - Serotyping and the Dienes reaction on *Proteus mirabilis* from hospital. J. Clin. Pathol., 22:263-268, 1969.
11. Perch, B. - On the serology of *Proteus* group. Acta. Pathol. Microbiol. Scand., 25:703-730, 1948.

12. Popovici, M.; Ienistea, C.; Filipescu, S.; Năcescu, N.; Israil, A. & Ionescu, C. - Determination de l'identité de quelques souches de *Proteus* isolées de produits carnés par la corroboration de plusieurs tests de laboratoire. Arch. Roum. Pathol. Exp. Microbiol., 25:45-54, 1966.
13. Skirrow, M.B. - The Dienes (mutual inhibition) test in the investigation of *Proteus* infections. J. Med. Microbiol., 2:471-477, 1969.
14. Sourek, J. - On some findings concerning Dienes phenomenon in swarming *Proteus* strains. Zbl. Bakt. I Abt. Orig., 208:419-427, 1968.
15. Sturdza, S.A. - Beobachtungen über die Mannigfaltigkeit der zur *Proteus*gruppe gehörenden Bakterienstämme. Zbl. Bakt. I Abt. Orig., 188:530-546, 1963.
16. Sturdza, S.A. - Recherches sur le mode de distribution des bactéries du groupe *Proteus* dans le milieu extérieur. Arch. Roum. Pathol. Exp. Microbiol., 23:307-314, 1964.
17. Sturdza, S.A. - A propos de l'utilizaton du phénomène de Dienes en pratique bacteriologique. Arch. Roum. Pathol. Exp. Microbiol., 28:503-518, 1969.
18. Sturdza, S.A. - Zum problem der differenzierung der *Proteus* stämme durch das Abgrenzungsinieverfahren. Pathol. Microbiol., 35:401-414, 1970.
19. Tracy, O. & Thomson, E.J. - An evaluation fo three methods of typing *Proteus*. J. Clin. Pathol., 25:69-72, 1972.
20. Wolstenholme, J. - Evidence that production of swollen bodies in the Dienes phenomenon may be confined to one of two interacting strains of *Proteus mirabilis*. J. Gen. Microbiol., 74:343-344, 1973.

## MANIPULADORES DE ALIMENTOS EM RESTAURANTES DE BELO HORIZONTE, PORTADORES DE SALMONELLA

Maria das Dores Ferreira

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

Vera Lúcia Lopes Teixeira Pinto

Deptº de Higiene  
 Faculdade de Farmácia e Bioquímica da UFMG  
 30000 Belo Horizonte MG, Brasil

& Ernesto Hofer

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

### Resumo

Através de coprocultura de 328 servidores de sete restaurantes de Belo Horizonte, foram detectados 65 portadores de *Salmonella* (19,82%). Cinquenta por cento deles eliminavam mais de um sorotipo por ocasião da pesquisa. Houve relação direta entre o estado de portador com o tempo de serviço prestado em restaurante. Os meios de cultura utilizados para o isolamento foram: caldo tetratrationato de Kauffmann; Rappaport, Rappaport-Hofer, agar EMB, agar Hektoen, meio de Costa-Vernin e os meios convencionais para os testes bioquímicos. As temperaturas de incubação para os meios de enriquecimento e seletivo-indicadores foram de 37°C e 41°C. A frequência dos sorotipos isolados foi a seguinte: *S. newlands*, 26,6%; *S. derby*, 25%; *S. anatum*, 25%; *S. agona*, 18,7%; *S. thymurium*, 14,1%; *S. newport*, 12,5%; *S. oranienburg*, 10,9%; *S. senftenberg*, 7,8%; *S. saint-paul*, 4,7%; *S. michigan*, 4,7%; *S. tshiringue*, 1,6%; *S. alfort*, 1,6% e *S. morotai*, 1,6%. Dos resultados obtidos verifica-se a necessidade de submeter os manipuladores de alimentos à um controle periódico, através da coprocultura, para que haja menor risco de contaminação dos alimentos e consequentemente dos usuários de restaurantes.

### Summary

*Food handlers as Salmonella carriers in restaurants of Belo Horizonte, Minas Gerais*

Sixty-five (19.82%) out of workers in seven restaurants from Belo Horizonte were found to be carriers of *Salmonella* using faecal cultures. Fifth per cent of them shed more than one serotype upon the examination. There was a direct

relationship between the carrier condition and the lenght of time working in restaurant. The culture media used for isolation were: Kauffmann's tetrathionate broth, Rappaport, Rappaport-Hofer, EMB agar, Hektoen agar, Costa-Vernin and the conventional media for biochemical tests. The temperature used for the enrichment and selective-indicador media were 37°C and 41°C. The following serotypes and their frequencies were found in the carriers: *S. newlands* (26.6%); *S. derby* (25%); *S. anatum* (25%); *S. agona* (18.7%); *S. thymurium* (14.1%); *S. newport* (12.5%); *S. oranienburg* (10.9%); *S. senftenberg* (7.8%); *S. saint-paul* (4.7%); *S. michigan* (4.7%); *S. tshiongwe* (1.6%) and *S. morotai* (1.6%). The results have shown the necessity of a periodical control of the food-handlers, using cultures, as a measure against food and individual contaminations.

## Introdução

As salmonelas, por se adaptarem a diferentes hospedeiros, adquirem resistência aos quimioterápicos e por sobreviverem, nas condições das mais adversas, constituem sério problema, do ponto de vista da saúde humana e animal, encontrando-se em ascenção em diversos países (1, 4, 8, 11, 12, 13, 14, 19).

O alimento contaminado, na sua origem ou através de um portador, tem sido apontado como uma das principais causas de surtos epidêmicos, humanos e animais. O manipulador, pelo contacto direto e permanente com os alimentos, participa da cadeia de transmissão da salmonelose, possibilitando o aparecimento de outros portadores, saúes ou doentes. Este fato cresce, em importância, quando se constata que, nas grandes metrópoles, a cada dia é maior o número de indivíduos que tomam uma ou mais refeições diárias em casas de lanches ou restaurantes. Os estabelecimentos desta natureza não submetem, nem solicitam, dos servidores, qualquer tipo de exame que possa evidenciar o estado de portador, sem considerar as condições higiênicas que, de modo geral, são precárias. Não raro, os usuários de restaurantes universitários ou de indústrias de Belo Horizonte, são acometidos de diarréias, tendo como causa alimentos ingeridos, numa das refeições anteriores ao distúrbio intestinal. Com base nestas ocorrências, procurou-se detectar a prevalência de portadores de *Salmonella* e a frequência dos sorotipos, em indivíduos que manipulam alimentos em restaurantes de Belo Horizonte.

## Material e Métodos

Amostras de fezes foram colhidas pelos próprios servidores, de seis restaurantes universitários e um de uma indústria de grande porte, aos quais foram fornecidos: instruções; ficha a ser preenchida com os dados necessários para o estudo; frasco de boca larga, com capacidade para 20ml, contendo 10ml de salina glicerinada. Os dados coletados permitiram avaliar: função do servidor, tempo de serviço, ocorrência de perturbação intestinal e uso recente de antibióticos. No total, foram feitas 328 coproculturas, com os meios de Rappaport; Rappaport-Hofer e caldo tetrathionate, como método de enriquecimento, e os meios de agar eosina de metileno e agar Hektoen, para o isolamento. Os meios de enriquecimento e de isolamento foram incubados a 37°C e 41°C; como meio de triagem, usou-se o meio de Costa-Vernin, sendo a caracterização bioquímica da bactéria feita através das provas convencionais para *Salmonella*. A identificação definitiva dos sorotipos foi feita com os soros polivalentes, dos grupos A, B, C1, C2, D, E1, E2, e com os soros somáticos e flagelares de fatores absorvidos.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao Prof. Ivan Barbosa Sampaio Machado, da Escola de Veterinária da UFMG, pela orientação e revisão da parte estatística do trabalho.

## Referências Bibliográficas

1. Bauer, H. - Growing problem of salmonellosis in modern society. Medicine, 52:323-330, 1973.
2. Becerril, P.; Bessudo, D. & González-Cortés, A. - Búsqueda de portadores de *Salmonella* en diferentes grupos de población de la ciudad de México. Rev. Lat. Am. Microbiol., 21:115-119, 1979.
3. Bochemihl, J. - Salmonellosis and Shigellosis in Togo (West Africa), 1971-1973. II - Infections in the urban population of Lome. Tropenmed. Parasitol., 28:377-383, 1977.
4. Bowmer, E.J. - The challenger of salmonellosis major public health problem. Am. J. Med. Sci., 247:467-498, 1964.
5. Caroli, G. - Importanza epidemiologica dei portatori di salmonelle. Ann. Ist. Sup. Sanita, 13:693-698, 1977.
6. Caval, L. & Campus, F. - Indagine sulla frequenza dei portatori di salmonelle e shigelle fra il personale sanitario ausiliario di un ospedale generale. Abst. Hyg., 49:465-469, 1974.
7. Chau, P.Y.; Shortridge, K.F. & Huang, C.T. - *Salmonella* in pig carcass for human consumption in Hong-Kong: a study on mode of contamination. J. Hyg. Camb., 78:253-260, 1977.
8. Craven, P.C.; Baine, W.B.; Mackel, D.C.; Barker, W.H.; Gangarosa, E.J.; Goldfield, M.; Rosenfield, H.; Altman, R.; La Chapelle, G.; Davies, J.W. & Swanson, R.C. - International outbreak of *Salmonella* eastbourne infection traced to contaminated chocolate. Lancet, 1:788-793, 1975.
9. Ferreira, M.D. - Pesquisa de *Salmonella* em águas superficiais de Belo Horizonte. Belo Horizonte, 110p., 1976. (Tese).
10. Frongillo, R.F. - Le salmonellose in Umbria. Gior. Mal. Infett. Parasit., 30:809-818, 1978.
11. Gould, K.L.; Gooch, J.M. & Ching, B.S. - Aspects of salmonellosis in Hawaii. Am. J. Publ. Health, 62:1212-1221, 1972.
12. Jordan, M.C.; Kenneth, E.P.; Corothers, T.E. & Murray, R.J. - Salmonellosis among restaurants patrons: the incisive role of a meat slicer. Am. J. Publ. Health, 63:982-985, 1973.
13. Joseph, P.G.; Anwar, W. & Jegathesan, M. - Animal salmonellosis in Peninsular Malaysia. II - Annual and zoological distribution of *Salmonella* serotypes over the ten-year period 1966-1975. Am. J. Trop. Med. Hyg., 27:562-566, 1978.
14. Kasemi, M.; Gumpert, G. & Marks, M.I. - Clinical spectrum and carrier state of nontyphoidal *Salmonella* infections in infants and children. Can. Med. Assoc. J., 110:1253-1257, 1973.
15. Loureiro, E.C.B. & Linz, Z.C. - Observações sobre a preferência de enterobactérias no Estado do Pará (1976-1977). Rev. Fund. Sesp (Serv. Saúde Pública), 22:43-44, 1977.
16. McCall, C.E.; Martin, W.T. & Boring, J.R. - Efficiency of cultures of rectal swabs and faecal specimens in detecting salmonella-carriers; correlation with numbers of *Salmonella* excreted. J. Hyg., 64:261-269, 1966.
17. McCall, C.E.; Sanders, E.W.; Boring, J.R.; Brachman, P.S. & Wilengrson, M. - Delineation of chronic carriers of *Salmonella derby*, within an institution of incurables. Antimicrob. Agents Chemother., 4:717-721, 1964.
18. Montbrum, S.E.C. & Giménez, D.F. - *Salmonella* in manipuladores de alimentos de hospitales. Bol. Of. Sanit. Panam., 85:498-503, 1978.
19. Morse, E.V.; Myhrum, E.P. & Grundwood, D.E. - Salmonellosis in man and animals as an environmental health problem. J. Environ. Sci. Health, All:755-769, 1976.

20. Neves, J. & Lobo Martins, N.R.L. - Long duration of septicaemic salmonellosis: 35 cases with 12 implicated species of *Salmonella*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 61:541-542, 1967.
21. Oliveira, A.D. - Ocorrência e técnica de isolamento de *Salmonella* em carnes comercializadas em retalho na cidade de Belo Horizonte. Natal, 67p., 1982. (Tese).
22. Peres, J.N. - Investigações sobre o gênero *Salmonella* em Belo Horizonte. Belo Horizonte, 110p., 1948. (Tese).
23. Peres, J.N. & Melo, S.M. - Aspectos bacteriológicos das diarréias da infância em Belo Horizonte. II - Investigações bacteriológicas em moscas. Arq. Saúde Públ., 2:47-59, 1958.
24. Proust, E. & Rieman, H. - Food-borne salmonellosis. Ann. Rev. Microbiol., 21:527-530, 1967.
25. Savage, W. - Problems of salmonella food-poisoning. Br. Med. J., 2:317-323, 1956.
26. Schiraldi, O.; Stano, G.; Sforza, E.; Schiraldi, G. & Pastore, G. - Il portatore umano di salmonelle. Ann. Ist. Sup. Sanitá, 13:727-734, 1977.
27. Sirot, J. - Le risque bacteriologique alimentaire dans l'aviation de ligne: aspects réglementaires et techniques de l'hygiène alimentaire en restauration collective. Nouv Press Med., 6:3873-3878, 1977.

## AÇÃO DA DIFENILAMINA (DPA) SOBRE CANDIDA UTILIS EM CONDIÇÕES PROLIFERATIVAS\*

Maria Cecília de Faveri Leite de Oliveira  
 & Choiti Kiyani

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

### Resumo

Os efeitos da DPA, sobre o desenvolvimento de *Candida utilis*, foram examinados em várias concentrações, sendo detectáveis com 0,15 $\mu$ g/ml de meio. O crescimento da levedura sofreu inibição, da ordem de 99% à concentração de DPA de 75 $\mu$ g/ml, enquanto 15 $\mu$ g/ml produziram cerca de 50% de inibição. Nesta última concentração, foi possível constatar que a droga atua sobre o crescimento e eficiência na utilização da glicose pela levedura, afetando, ainda, o teor em trealose, glicídios totais e proteínas, em várias etapas do desenvolvimento, frente a suprimentos de glicose de 0,5; 2 e 4%. Os resultados obtidos indicam uma atuação da substância, nas vias do metabolismo oxidativo.

### Summary

*The effects of diphenylamine on Candida utilis under proliferating conditions*

Diphenylamine (DPA) affects *Candida utilis* growth, at the initial concentration of 0.15 $\mu$ g/ml of the culture medium. Growth is 99% inhibited with 75 $\mu$ g/ml DPA; 50% is blocked with 15 $\mu$ g/ml. DPA acts on glucose uptake and its conversion into biomass as well as on the levels of total carbohydrate, trehalose, and protein, at several steps of development, with 0.5, 2 and 4% glucose as carbon source. Cell behavior, under both treated and untreated situation, supports the hypothesis that DPA interferes on energetic metabolism of the yeast.

### Introdução

A difenilamina (DPA) tem sido usada e pesquisada, sob vários aspectos, especialmente a propriedade de inibir a cromogênese, em microrganismos (15), já constatada em bactérias (3), fungos (14), algas (26) e leveduras vermelhas (22).

Embora tivesse sido postulado que a DPA, sob certas concentrações, inibe, especificamente, a biossíntese de carotenóides (6, 22), há referências à concomitante interferência com o crescimento (2, 5, 11, 12).

\* Parte da Tese de Mestrado em Ciências Biológicas, apresentada pelo primeiro autor, ao Instituto de Biociências UNESP, Rio Claro, em 1980.

A DPA atua sobre a carotenogênese, de forma similar à da carência de oxigênio e age como veneno de enzimas respiratórias (27). Outra evidência, de que a ação da DPA sobre a carotenogênese deve ser, antes, indireta, foi obtida com sistema enzimático, isolado de plastídio de tomate, não se constatando o bloqueio da carotenogênese pela DPA, em etapas específicas, mas sim pela redução do processo, como um todo (4).

A aplicação da DPA, sobre leveduras não pigmentadas, ainda inexplorada, exceto quanto ao trabalho de Phai & Reuter (20), afigurou-se favorável, para dissociar aspectos genéricos, da ação da droga sobre leveduras, do processo de carotenogênese.

#### Material e Métodos

*Microrganismo* - *Candida utilis*, proveniente do Instituto Zimotécnico "Prof. Jaime de Almeida", de Piracicaba, SP.

*Meios de cultura* - Manutenção em agar malte a 2%. Para o desenvolvimento do microrganismo foi utilizado meio definido, com glicose a 0,5%, 2% ou 4%: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,0g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3,0g; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,25g; CaCl<sub>2</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,25g; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1mg; ZnSO<sub>4</sub>, 1mg; FeCl<sub>3</sub>, 100µg; CuSO<sub>4</sub>, 100µg; KI, 100µg; ácido aspártico, 10µg; inositol, 50mg; alanina, 20µg; cloridrato de piridoxina, 20µg; cloridrato de tiamina, 20µg; água destilada, q.s.p. 1000mL; pH 4,5. A esterilização processou-se por autoclavagem a 120°C por 20min, sendo a glicose tratada em separado. Quando indicado, este meio foi acrescido de solução alcoólica de DPA, resultando em 0,15; 0,75; 1,5; 7,5; 15 ou 75µg DPA/ml de meio.

*Desenvolvimento vegetativo em função da concentração de DPA* - As culturas foram iniciadas, com inóculos idênticos, em 200mL de meio definido, em frascos Erlenmeyer de 500mL. Grupos de três frascos receberam difenilamina para concentração final de 0,15; 0,75; 1,5; 7,5; 15 ou 75µg/ml. Um grupo, sem tratamento e um frasco, sem inoculação, permaneceram como controles. O desenvolvimento processou-se a temperatura ambiente (27,5 ± 1,5°C), durante 24h, em agitador tipo mesa (280rpm). O crescimento foi avaliado, no final do período, através de medidas de transmitância a 570nm e da biomassa produzida.

*Respostas à DPA, em relação à concentração do substrato metabolizável e à etapa do desenvolvimento* - Tanto os controles, como as células, sob tratamento com 15µg DPA/ml de meio, desenvolveram-se com suprimentos de glicose de 0,5; 2 ou 4%. Foi preparado número suficiente de frascos de cultura, para permitir a interrupção de desenvolvimento e obtenção de materiais para análise, após 1, 2, 3, 12 e 24 horas de cultivo (três frascos/amostragem). Após inoculação uniforme dos frascos, no restante do inóculo, foi determinada a concentração da biomassa seca (mg/ml). Foram avaliados, em cada condição, a produtividade em biomassa, consumo de glicose, teores de proteína, glicídios totais e trealose na massa celular.

*Determinações quantitativas* - Consumo de glicose por medição de glicídios remanescentes no meio, após centrifugação das células (17, 22); quantificação de proteínas, pelo método de Kjeldahl, modificado (10), em amostras de 30mg de massa celular seca, usando-se 6,3 como fator para conversão em proteínas; e dosagens de glicídios totais e trealose (1, 25).

#### Resultados e Discussão

*Desenvolvimento vegetativo em função da concentração de DPA* - A inibição de *C. utilis*, após 24h de cultivo, sob concentrações crescentes de DPA, avaliada pela absorbância (A) dos cultivos, ou pela produtividade em biomassa (Tabela 1), revelou-se dependente da concentração da droga. Parece, contudo, não haver um fator constante de proporcionalidade. Aumentos progressivos, na concentração de DPA, até 1,5µg/ml de meio, produziram diminuição de absorbância. O aumento ulterior, até 7,5µg/ml, não acarretou queda adicional de absorbância, o que ocorreu em concentrações mais

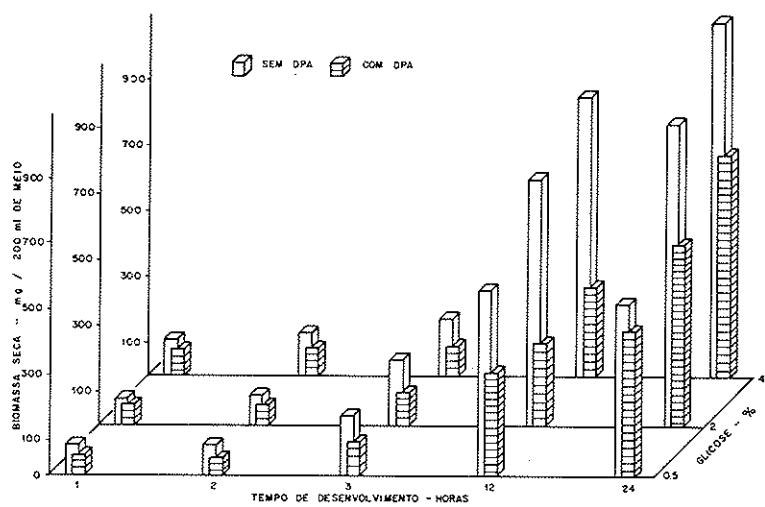
elevadas. Comportamentos semelhantes, são observáveis, quanto à produtividade em biomassa.

**Tabela 1 - Crescimento de *C. utilis* (meio definido; glicose 2%), em função da concentração de DPA: avaliação através da absorbância (A) e da biomassa seca (B = mg/200ml/24h)**

DPA µg/ml	Crescimento		Inibição - %	
	A	B	A	B
-	4,30	729,8	-	-
0,15	4,00	697,4	6,98	4,44
0,75	3,80	703,6	11,63	3,60
1,50	3,20	597,9	25,59	18,08
7,50	3,23	620,5	24,89	14,98
15,00	1,60	352,5	62,80	51,70
75,00	0,02	6,7	99,60	99,09

A concentração máxima de DPA empregada (75µg/ml) reduziu o crescimento, em mais de 99%, em relação aos controles, enquanto os primeiros 50% de inibição foram estabelecidos com 15µg/ml de meio. Esta última concentração foi a escolhida, para os experimentos seguintes, pois, produz efeitos nítidos sem, contudo, tornar inviável a obtenção da massa celular, necessária às análises.

**Figura 1 - Produtividade de *C. utilis* em diferentes etapas do desenvolvimento em meio definido, com 0,5, 2 e 4% de glicose. Efeito da DPA (15µg/ml de meio)**



**Respostas à DPA: relações com a concentração do substrato e com a etapa de desenvolvimento - Produtividade -** A influência de DPA (15µg/ml), sobre a produtividade, frente a diferentes suprimentos de glicose, pode ser analisada em termos absolutos (g de biomassa/200ml de cultura), ou como percentual de inibição, através da comparação com a produtividade dos controles. Os efeitos são detalhados no decorrer de 1, 2, 3, 12 e 24h do desenvolvimento (Figura 1). Os correspondentes consumos de

**Tabela 2 - Consumo de glicose e rendimento (Y<sub>glu</sub>), sob influência de DPA (15µg/ml), em diferentes etapas do desenvolvimento de *C. utilis* em meio definido, com 0,5; 2 e 4% de glicose: temperatura 27 ± 20C**

Tempo h	Suprimen- to de glicose ‰	Glicose remanescente g/200 ml		Rendimento (Y <sub>glu</sub> )	
		Sem DPA	Com DPA	Sem DPA	Com DPA
1	0,5	0,522	0,594	11,18	5,63
2	0,5	0,546	0,550	11,01	2,78
3	0,5	0,121	0,565	16,58	14,45
12	0,5	0,001	0,001	52,54	27,28
24	0,5	0,001	0,001	48,44	39,94
1	2,0	3,702	3,586	13,19	6,26
2	2,0	3,652	3,478	15,24	4,27
3	2,0	2,420	3,413	9,96	11,02
12	2,0	0,003	3,222	17,85	27,51
24	2,0	0,001	2,326	22,26	30,64
1	4,0	5,408	6,218	2,81	2,35
2	4,0	5,294	6,054	3,46	2,33
3	4,0	5,199	5,982	4,83	2,47
12	4,0	0,932	5,159	11,76	8,30
24	4,0	0,474	3,500	13,85	14,20

glicose e rendimentos em massa micelial (Tabela 2) são melhor analisados, em função da biomassa formada, após a inoculação das culturas, uma vez que se conhece a biomassa introduzida com inóculo (38mg/cultura).

A diferença absoluta de produtividade, entre os controles e os correspondentes cultivos com DPA, para cada suprimento de glicose, amplia-se, progressivamente, de 1 até 12 horas de desenvolvimento (Figura 1). Após este tempo, as diferenças sofrem redução, o que se explica pelo fato de o meio de cultivo, já modificado, limitar, diferencialmente, o desenvolvimento.

Quando o suprimento foi de 0,5%, após 12h, a glicose já se esgotara do meio, em ambas as condições (Tabela 2). O ulterior crescimento nos cultivos com DPA indica que produtos da metabolização da glicose, nas etapas anteriores (provavelmente etanol), eliminados no meio, puderam ser ainda utilizados, como fonte de carbono e energia. Nos controles, por outro lado, a utilização de tais metabólitos já se iniciara antes deste tempo, pois, após 3h, havia só 120mg de glicose no meio, mas houve, ainda, crescimento de 379mg, até 12h (Tabela 2, Figura 1). Assim, o nível máximo de inibição pela DPA, frente a 0,5% de glicose, situa-se entre 3 e 12 horas de desenvolvimento.

Com suprimento inicial de 2%, a exaustão da glicose não se consumou, nos cultivos com DPA e ocorreu por volta de 12h, nos controles, que não atingiram, após este tempo, o mesmo nível de eficiência, mostrado, frente a 0,5% de glicose, na conversão de metabólitos, das fases anteriores, em biomassa. Nos cultivos com DPA, a eficiência a este tempo diferiu menos, da exibida, frente a 0,5% de glicose. Entende-se, assim, que o nível máximo de inibição, para 2% de glicose, tenha ocorrido entre 12 e 24h. Com suprimento inicial de 4% não ocorreu esgotamento de glicose após 24h; outros fatores devem limitar o desenvolvimento após este tempo, como a exaustão dos demais nutrientes.

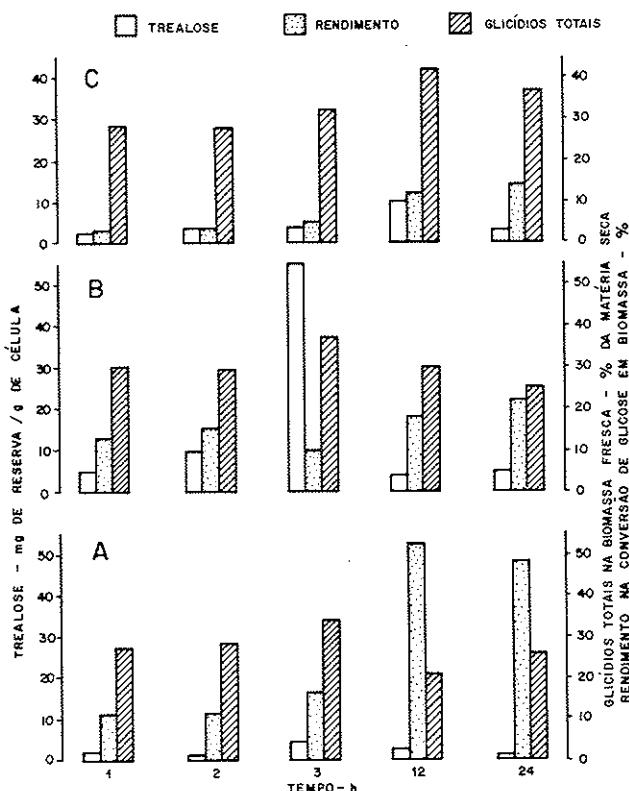
O confronto dos resultados referentes a 12h de desenvolvimento permite, pois, concluir que o aumento, na concentração de glicose no meio de cultura, realçou os efeitos inibidores do desenvolvimento, pela DPA (Figura 1).

*Utilização da glicose exógena -* O consumo de glicose na fase "lag" e no início do crescimento exponencial foi acentuado, em todas as condições examinadas, mas, ainda mais intenso, com suprimento inicial de 4%.

Nos mesmos períodos, o rendimento na conversão em biomassa foi reduzido, especialmente na maior concentração do açúcar; o aumento na eficiência, de tal conversão, ocorreu durante o crescimento exponencial, mais cedo ou mais tarde, dependendo do suprimento de glicose (Tabela 2).

Figura 2 - Trealose, glicídios totais e rendimento ( $\gamma_{glu}$ ) durante o desenvolvimento de *C. utilis*.

Símbolos: Suprimento de glicose: A = 0,5%; B = 2,0%; C = 4,0%



**Tabela 3 - Teor proteico, em diferentes etapas do desenvolvimento de *C. utilis*, em meio definido com 0,5, 2 e 4% de glicose: influência da DPA (15 $\mu$ g/ml de meio)**

Tempo h	Suprimen- to de glicose %	Teor proteico % da matéria seca	
		Sem DPA	Com DPA
1	0,5	49,29	52,06
2	0,5	52,86	53,15
3	0,5	45,42	53,80
12	0,5	49,43	51,69
24	0,5	47,75	51,11
1	2,0	46,93	50,30
2	2,0	50,27	51,98
3	2,0	48,41	52,28
12	2,0	48,19	55,21
24	2,0	47,23	49,14
1	4,0	48,48	47,97
2	4,0	48,87	51,19
3	4,0	47,90	52,13
12	4,0	46,95	52,81
24	4,0	46,95	49,30

Nos controles com 0,5% de glicose, o rendimento elevou-se, entre 2 e 3h e acentuou-se, entre 3 e 12h. Após 3h, cerca de 7/8 da glicose inicial já fora consumida, embora, a este tempo, apenas 1/3 do desenvolvimento total de biomassa tivesse se processado. A glicose esgotou-se antes de 12h e o crescimento, entre 3 e 12h, foi suportado por outra fonte de carbono e energia, resultante da degradação da glicose, nas fases iniciais.

Frente à mesma taxa de hexose, o aumento de rendimento, nos cultivos com DPA, foi gradual. A glicose exauriu-se antes de 12h e pelo menos 1/4 da biomassa não foi produzida, diretamente, a partir desta fonte de carbono.

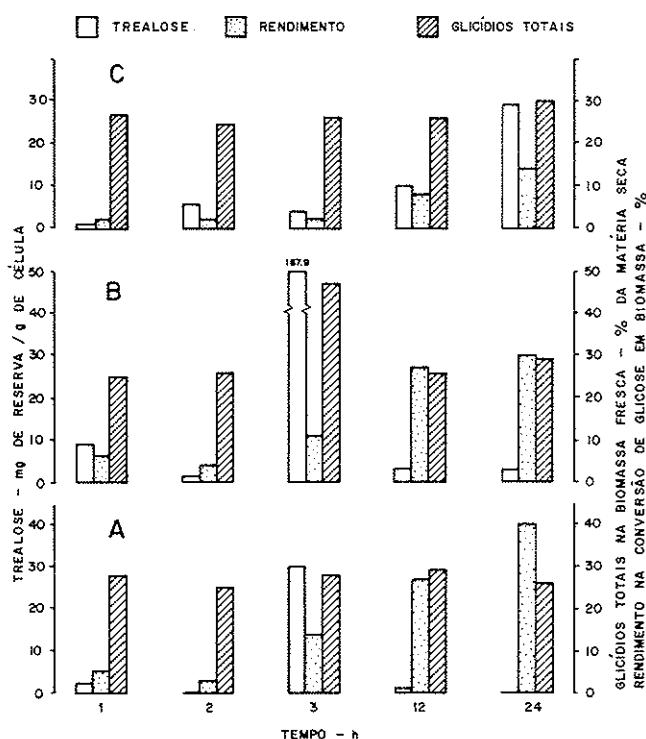
Nos controles com 2% de glicose, o rendimento máximo, verificado na fase final do cultivo, representou menos de 50%, em relação aquele com 0,5% de açúcar, na mesma fase, e pelo menos 170mg de biomassa não tiveram a glicose como fonte direta de carbono. Nos correspondentes cultivos com DPA houve redução de apenas 25% do rendimento máximo, em relação aquele com 0,5% de glicose.

Em altas taxas de glicose (4%), os rendimentos máximos, nos cultivos com e sem DPA, reduziram-se, respectivamente, a cerca de 25% e 35,5%, dos correspondentes rendimentos com 0,5% glicose.

Verifica-se, portanto, que o aumento na glicose inicial, de 0,5% para 2%, reduz, consideravelmente, o rendimento nos controles, enquanto, nos cultivos com DPA, tal efeito é mais intenso, a concentrações maiores que 2%.

Os resultados indicam repressão da respiração, nas fases iniciais do desenvolvimento. O fenômeno, provocado pela glicose, em condições aeróbicas, inicialmente descrito em células de carcinoma (8), tem sido investigado em leveduras (13) e relacionado, quanto a *Saccharomyces cerevisiae*, com crescimento diauxico (16) e inibição na síntese de citocromos (9). O "índice de Crabtree", proposto para avaliação deste fenômeno em levedura (9), dá *C. utilis* como Crabtree negativa. A levedura, como foi demonstrado, é suscetível à concentração de glicose (21). Nas fases iniciais do desenvolvimento, frente a qualquer suprimento de glicose, a DPA provoca o

**Figura 3 - Trealose, glicídios totais e rendimento ( $Y_{glu}$ ) durante o desenvolvimento de *C. utilis* sob a ação da DPA (15 $\mu$ g/ml).**  
Símbolos: Suprimento de glicose: A = 0,5%; B = 2%; C = 4%



"efeito glicose", interferindo, de alguma forma, no transporte eletrônico.

*Trealose e glicídios totais* - O acúmulo e degradação da trealose não se mostraram relacionados, necessariamente, a uma determinada fase de crescimento das populações, ao contrário do que tem sido descrito em leveduras (18, 19).

Os níveis mais altos de trealose ocorreram no início do crescimento exponencial nos tratamentos com 0,5 ou 2% de glicose. Com 4% de glicose, os maiores índices detectados corresponderam ao final do crescimento exponencial (controle) ou à fase estacionária (tratamento com DPA) (Figuras 2 e 3).

Houve relação temporal entre maior acúmulo de trealose e o aumento de eficiência, na transformação da fonte de carbono em biomassa. A conjunção de eventos não correspondeu, necessariamente, ao da completa depleção da glicose, mas, quando certa parcela da glicose havia sido degradada, com eficiência de conversão em biomassa, não superior a 15% e, geralmente, inferior a 10%, devendo ter sido acumulado outro composto orgânico no meio. Tal relação, entre níveis máximos de trealose e utilização do segundo substrato, em um crescimento diáuxico, já fora observada em *Saccharomyces cerevisiae* (7, 19).

Quain & Haslam (23), tendo observado em *S. cerevisiae*, aumento transitório em G.6.P., coincidente com o acúmulo de trealose, após a depleção de glicose no meio, propuseram a formação de trealose por gliconeogênese, sendo a energia disponível (ATP) usada para dirigir a síntese de G.6.P., a partir de etanol. Os dados, ora obtidos com *C. utilis*, suportam a hipótese de que mecanismo semelhante possa operar nesta levedura.

O aumento da concentração de glicose no meio, por outro lado, conduziu a maior acúmulo de trealose, até quando o efeito paralelo de interferência com o metabolismo oxidativo não se tornou severamente limitante.

Os níveis de trealose alcançados foram superiores, nos cultivos com DPA, menos sensíveis à concentração exterior de glicose, quanto à interferência com o metabolismo oxidativo.

Maior suprimento de glicose resultou, independentemente do nível de trealose, em maior teor em glicídios totais, no final do ciclo de desenvolvimento, quando também o tratamento com DPA resultou em maiores taxas deste constituinte, em relação aos controles (Figuras 2 e 3).

*Teor proteico* - Os níveis proteicos sofreram certa variação, durante o desenvolvimento, sendo mais elevados por volta da segunda hora, nos controles e, um pouco mais tarde, nos tratamentos com DPA. Não houve qualquer dependência evidente entre os teores proteicos e de trealose, glicídios totais ou consumo de glicose (Tabela 3).

Uma vez que o teor proteico está antes relacionado com a fase de desenvolvimento que com outros fatores, a comparação entre os controles e os tratamentos com DPA deve ser feita em função do tempo de desenvolvimento. Em todas as condições examinadas, as biomassas obtidas das culturas com DPA continham nível mais elevado em proteína que as obtidas com os controles.

## Referências Bibliográficas

1. Angelis, D.F.; Oliveira, M.C.F.L. de & Furletti, M.E.M. - Teor de glicídios totais e trealose em algumas espécies do gênero *Candida*. Rev. Microbiol. (São Paulo), 10:153-156, 1979.
2. Angelis, D.F. & Serzedello, A. - Influência da difenilamina e do Fe<sup>+++</sup> sobre *Rhodotorula glutinis* e *Rhodotorula mucilaginosa*. Ciênc. e Cult., 28:183-186, 1976.
3. Britton, G.; Singh, R.K.; Goodwin, T.W. & Ben-Aziz, A. - Carotenoids of *Rhodomicrobium vannielli* (*Rhodospirillaceae*) and the effect of diphenylamine on the carotenoid composition. Phytochem., 14:2427, 1975.
4. Bucholtz, M.L.; Maudinas, B. & Porter, J.W. - Effects of in vivo inhibitors of carotene biosynthesis on the synthesis of carotenes by a soluble tomato plastid enzyme system. Chem. Biol. Interactions, 17:359-362, 1977.

5. Cho, K.I.; Corpe, W.A. & Salton, M.R.J. - Effect of diphenylamine on the fatty acid composition of some bacterial lipids. *Biochem. J.*, 93:26c-28c, 1964.
6. Cohen-Bazire, G. & Stainer, R.Y. - Inhibition of carotenoid synthesis in photosynthetic bacteria. *Nature*, 181:250-252, 1958.
7. Costa Carvalho, V.L.A.; Panek, A.D. & Matton, J.R. - Effects of carbon source and genetic modification of phosphoglucomutase on trehalose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *F.M.S. Microbiology Letters*, 4:221-224, 1978.
8. Crabtree, H.G. - Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem. J.*, 23:536-645, 1929.
9. De Dekker, R.H. - The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *J. Gen. Microbiol.*, 44:149-156, 1965.
10. Fontana, P. - Considerações sobre a dosagem de nitrogênio pelo método de Kjeldahl. *Memórias do Inst. Oswaldo Cruz*, 51:277-288, 1953.
11. Goodwin, T.W. - Some observations on carotenoid synthesis by the alga *Chlorella vulgaris*. *Experientia*, 10:213-214, 1954.
12. Goodwin, T.W.; Jamikorn, M. & Willmer, J.S. - Studies in carotenogenesis. 7 - Further observations concerning the action of diphenylamine in inhibiting the synthesis of  $\beta$ -carotene in *Phycomyces blakesleeanus*. *Biochem. J.*, 53:531-538, 1953.
13. Hommes, F.A. - Mechanism of the Crabtree effect in yeast grown with different glucose concentrations. *Arch. Biochem. Biophys.*, 113:324-330, 1966.
14. Jerebzoff-Quintin, S.; Jerebzoff, S. & Jacques, R. - Carotenogenesis and the endogenous rhythm of sporulation in *Leptosphaeria michotii*. I - Effect of monochromatic light, diphenylamine and antimycin A on carotenogenesis. *Physiol. Veg.*, 13:55-67, 1975.
15. Kharasch, M.S.; Conway, E.A. & Bloom, W. - Some chemical factors influencing growth and pigmentation of certain microorganisms. *J. Bacteriol.*, 32:533-540, 1936.
16. Lemoigne, M.; Aubert, J.P. & Millet, J. - La production d'alcool et le rendement de croissance de la levure de boulangerie cultivée en aérobiose. *Ann. Inst. Pasteur*, 87:427, 1954.
17. Nelson, N. - A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 153:375-380, 1944.
18. Operti, M. & Panek, A.D. - Trehalose phosphate and trehalose metabolism in brewer's yeast. *Cienc. e Cult.*, 20:747-754, 1968.
19. Panek, A. - Synthesis of trehalose by baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Arch. Biochem. Biophys.*, 98:349-355, 1962.
20. Phai, L.D. & Reuter, G. - Veränderung der Polysacharid-biosynthese bei *Candida guilliermondii* durch Diphenylamin. *Z. Allg. Mikrobiol.*, 16:197-199, 1976.
21. Pons, G.; Guiraud, J. & Galzy, P. - Remarques sur la régulation des métabolisme de *Candida utilis* Lodder et Kreijer van Rij. *Z. Allg. Mikrobiol.*, 16:377-383, 1976.
22. Protiva, J.; Praus, R. & Dyr, J. - Effect of diphenylamine on the change in the content of individual carotenoids in the fat of *Rhodotorula gracilis*. *Folia Microbiol. (Prague)*, 4:332-335, 1959.
23. Quain, D.E. & Haslam, J.M. - Changes in glucose 6-phosphate and storage carbohydrates during catabolite derepression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, 113(Part 1)):195-198, 1979.
24. Somogyi, M. - Method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 160:62, 1945.
25. Trevelyan, W.E. & Harrison, J.S. - Studies on yeast metabolism. 7 - Yeast carbohydrate fractions; separation from nucleic acid; analysis and behavior during anaerobic fermentation. *Biochem. J.*, 63:23-33, 1956.
26. Withers, N.W. & Tuttle, R.C. - Carotenes from mutants of Dinoflagellate, *Cryptocodium cohnii*. *J. Protozool.*, 26:135-138, 1979.
27. Zalokar, M. - Studies on biosynthesis of carotenoids in *Neurospora crassa*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 50:71, 1954.

# RECOMBINATION IN ANTIBIOTIC PRODUCING STREPTOMYCES BY PROTOPLAST FUSION

Janete Magali de Araujo  
Francisco Décio de Andrade Lyra

Instituto de Antibióticos UFPE  
Cidade Universitária  
50000 Recife PE, Brasil

& Włodzimierz Kurylowicz

National Institute of Hygiene - Chocimska  
24 Warsaw Poland

## Summary

Review of techniques for genetic recombination through protoplast fusion and analysis of methods for inducing fusion, strain selection for recombination, mutant recovery, production and maintenance of stable protoplasts showing high frequencies of regeneration.

## Resumo

*Recombinação em Streptomyces produtores de antibióticos por fusão de protoplastos*

Revisão das técnicas de recombinação genética, em *Streptomyces* produtores de antibióticos, por fusão de protoplastos. Análise dos métodos de indução da fusão, seleção de linhagens para recombinação, seleção de mutantes, produção e manutenção de protoplastos estáveis, com alta frequência de regeneração.

## Introduction

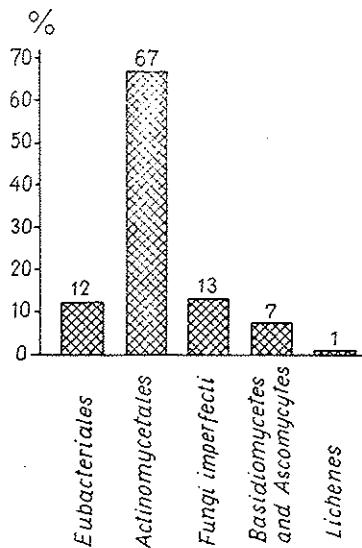
Microorganisms belonging to order *Actinomycetales* produce about 70% of all known antibiotics (Figure 1).

Among them 82,5% are synthetized by *Streptomyces* (Figure 2). These gram-positive, filamentous bacteria are producers of about 90% of antibiotics used in human and animal therapy, agriculture, food preservation and as a tool in biological research. Hence their medical and industrial significance.

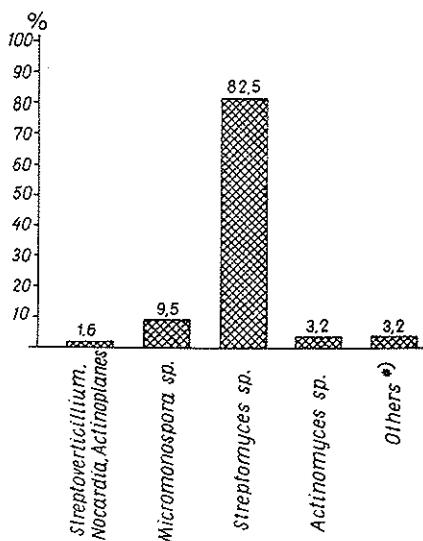
Protoplast fusion in bacteria, streptomycetes, yeasts and fungi was recently successfully developed and contributed not only to improvement of industrial important strains, but also to better understanding of the secondary metabolism pathways in antibiotic synthesis. It allowed elucidation of several genetical consequences of microbial recombination, like elaboration of numerous linkage maps, bearing accurately located genes, but their biochemical expression in most cases is unknown.

Among various reviews dealing with protoplast fusion, a recent publication (16) covered the whole area from bacteria to algae and discussed the various consequences of genetic transfer.

**Figure 1** - Antibiotic production (%) by different groups of fungi



**Figure 2** - Antibiotic production (%) by genera of *Streptomyces*



The application of protoplast fusion in genetics started with higher plants and with the use of enzymes to produce protoplasts from the plant cells. Because of fast growth of microbes the most rapid progress in protoplast fusion have been achieved in microbiology. Significant advances have been made in industrial research. Fusion experiments gave better understanding of the basic regulatory processes in microbial cells, but it seems that knowledge is rather at the beginning of the exploration, for both theoretical and practical purposes of the method of protoplast fusion (16).

Protoplast fusion is possible not only between two or more mutants (32), but between more strains belonging to the same or to different species (intra or interspecific fusion). Recent data showed that protoplast fusion is possible between cells belonging to different genera. Even interkingdom protoplast cell fusion is reported.

The fusion induced by polyethylene glycol (PEG) between protoplasts of different organisms seems neither correlated with their taxonomic position, nor with the immunochemical specificity. Since structure of the cell membrane involved in the fusion processes seem to be similar (16).

The mechanisms of protoplast fusion induced by PEG are not well understood.

It has been suggested that cell fusion induced by PEG involves the following events. Fusion starts with agglutination of protoplast causes by intensive dehydration and formation of aggregates. Protoplasts shrink and become highly distorted. Large area of adjacent protoplasts comes into very close contact (17). First, a perturbation of bilayer structure of membrane lipids may occur, which increases the fluidity of the lipid region. These changes in lipid structure than allow the aggregation of the intramembranous glycoprotein particles. Second, the interaction and intermixing of the disturbed molecules closely opposed membranes in regions denuded of intramembranous proteins and glycoproteins may allow adjacent cells to fuse, by small cytoplasmic bridges (1, 16).

Several authors stressed the important role of bivalent cations as fusogenic agent. The fusion of protoplast starts during the protoplasts formation process, since the protoplasting medium contains  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  (16). The divalent cations

triggered aggregation of phospholipid vesicles (42). The effect of divalent metals on the interaction and mixing of membrane components in vesicles prepared from acidic phospholipids has been examined, using freeze-fracture electron microscopy and differential scanning calorimetry (51, 52).  $\text{Ca}^{2+}$  and to a certain extent  $\text{Mg}^{2+}$ , induce extensive mixing of vesicle membrane components and drastic structural rearrangements to form new membranous structures. Threshold concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  induces vesicle fusion, when the lipids are in fluid state. The role calcium in fusion of artificial vesicles has been studied (36). Phospholipid vesicles (liposomes) fused upon calcium addition in two stages. Subsequent addition of valinomycin or calcium ionophore (A 23187) leads to further fusion with an increase of the amount of calcium that associates with the liposomes.

The PEG induced protoplast fusion, for recombination in streptomycetes consists of: a) selection of two or more parent strains to be recombined; b) obtaining marked mutants, preferably auxotrophs, resistant to antibiotics; c) formation of stabilized protoplasts able to regenerate into normal wall-bearing cells, and able to fuse with high efficiency, and d) identification and selection of recombinants and their analysis.

**1. Selection of strains for recombination** - The aim of fusion of protoplasts of two or more parent strains producing different antibiotics but structurally belonging to similar group transfer genes coding for antibiotic synthetic enzymes. It would probably enhance the chance that an enzyme introduced into a new host would find a substrate chemically different from its normal substrate, but related to it, and would be capable of conversion to an analogue of a "natural antibiotic" (46).

Another aim of protoplast fusion is to improve the yield of antibiotic biosynthesis, and the production of new "hybrid" antibiotics. The production of "hybrid" antibiotics should be most likely when the donor and recipient produce antibiotics structurally related (59).

In order to obtain a recombinant by fusion, there must be considerable homology between DNA of the two interacting parents (26, 27). However it shall be stressed that there are several proofs of intra-and-interspecific recombination, nutritional supplementation and gene transfer. It has been achieved in auxotrophic mutants of *S. parvulus* and *S. antibioticus* (47), and proved by production of a new "hybrid" antibiotic by recombination of strains belonging to different species and producing totally different compounds (18).

Intergeneric protoplast fusion has been obtained in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* (65). Even the fusion between hen erythrocytes and *Saccharomyces cerevisiae* protoplast induced by PEG was performed (2). The result of this experiment had no immediate genetic consequences but opened ways for research on membrane structure and function.

In general biochemical mechanisms that results in stable "hybrid" strains, as a result of protoplast fusion and subsequent regeneration, are not understood (67).

*Streptomyces* sp. genome has  $1.5 \times 10^7$  base pairs and the average size of a gene is taken to be 1,500 base pairs; then there are about 7,000 genes in the genome. If there are 100 genes which affect the yield of a given antibiotic, then this is equivalent to  $1.5 \times 10^5$  base pairs (46). The wealth of genetic information for antibiotic production in streptomycetes makes protoplast fusion in these organisms very promising.

But, several authors have made explicit that even the best method of recombination must be given a fair chance, i.e. the genetically diversified strains still need to be screened in significantly larger numbers, than have been sometimes examined (9).

**2. Obtaining marked mutants, preferably antibiotic resistance auxotrophs** - Recombination in streptomycetes is widespread, but strain "improvement" has been applied to a rather limited extent. The reason for this has probably been due to the necessity to introduce selectable markers into the strains to be crossed in order to identify recombinants (29, 33). Marking is time consuming.

The auxotrophic mutants of streptomycetes can be selected after NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) treatment. It induces primarily base

transition mutations of GC-AT types, although AT-GC transitions, transversions and even frameshifts arise at low frequencies. It is highly mutagenic at low killing levels, induces multiple mutations in localized regions. It is particularly effective for the isolation of auxotrophic mutants (10). For selection of auxotrophs in streptomycetes several methods, like filtration method (68), Davis penicillin method (11), or Lederberg & Lederberg (43) replica plating (43) can be used. The conditions of effective mutagenesis by NTG in streptomycetes requires a longer and more intensive treatment than in other microorganisms. With the treatment with 1mg/ml of NTG at pH9.0 for 50 min., 5% of the survivors were auxotrophs. After incubations of *S. coelicolor* for 2h in 0.05M Tris-maleic acid buffer containing 3mg/ml of NTG about 11% of auxotrophs among survivors were obtained. For *S. rimosus* after incubation time 1h in presence of 3mg/ml NTG at pH9.0, more than 21% of the survivors were auxotrophs (13).

One of the potential difficulties in working with NTG is the likelihood of inducing multiple mutations in small region of the bacterial chromosome (21). As the consequence, mutants could have complex growth requirements due to mutations affecting more than one type of metabolic function and fail to revert to wild at expected frequencies. It is wise to check NTG - induced mutants carefully for reversion before attempting to use them for further analysis (10).

To obtain auxotrophic mutants of streptomycetes resistant to antibiotics, Szybaslki's gradient plate technique (66) or serial dilution method with repeated transfers are commonly used.

**3. Formation of stabilized protoplast able to regenerate and fuse at high frequency -**  
Based on former observations and experience of protoplast fusion in bacteria and filamentous fungi, detailed description of formation, stabilization and regeneration of *Streptomyces* protoplasts (Table 1) became available (8, 15, 39, 45, 49).

Formation of protoplasts depends on several factors which have to be established for each strain separately. Here belongs the composition of the medium to produce mycelium in form of homogeneous growth. The mycelium to be protoplasted has to be harvested in the middle of the exponential phase of its growth (average 6 to 10 doublings). Adding glycine (0.5% to 1.5%) to the medium, these requirements can be met after 18-24h growth of mycelium in shake flasks (Figure 3). Some mycelia need sonication before lysozyme treatment (5).

After washing the mycelium with 0.3M sucrose, it is treated with lysozyme at the concentrations from 1-2mg/ml of protoplasmic medium (hypertonic medium containing bivalent cations) (Table 2).

An improved method for the preparation of *Streptomyces* and *Micromonospora* protoplasts was described using the combination of wall decomposing enzymes: lysozyme, lytic enzyme n°2, used also by Okanishi & col. (49) and achromopeptidase (48). The protoplasts of *S. viridochromogenes*, *S. wedmonensis*, *S. kanamyceticus* *S. mycarofaciens* were formed and regenerated. According to the authors experience the lisozyme combined with achromopeptidase was 10 to 100 times more effective in protoplast formation, than the combination of lysozyme with lytic enzyme n° 2.

Table 1 - Sequence intended formation, stabilization and protoplasts regeneration

Mycelium (cell) production	Liquid medium with or w/o glycine. Harvest in the middle of exponential phase of growth
Washing of mycelium and centrifugation	In hypertonic solution 0.3M of sucrose
Enzymatic treatment of mycelium	P medium with lysozyme 0.7 to 1.4mg per g of wet mycelium
Protoplast formation	Incubation at optimal temperature (28°C-32°C). Microscopic observation at 10 min. intervals
Centrifugation-washing-filtration	Protoplast washing with P medium (not containing lysozyme). Filtration through cotton or glass filter
Protoplast stabilization	Stabilization in medium containing bivalent cations, for 60 min. at 28°C
Microscopic counting of protoplast	Under the phase-contrast microscope in counting chamber
Protoplast regeneration	Viable count in R2 agar overlayed by soft agar medium after dilution of protoplasts in P medium

**Table 2 - Media P for protoplast formation.**  
**Symbols:** Trace element solution (per liter):  
 ZnCl<sub>2</sub>, 40mg; FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, 200mg; CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O,  
 0.10mg; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 10mg; Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.10H<sub>2</sub>O,  
 10mg and (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O, 10mg (49); \*  
 = Sterilized separately

Ingredient	Medium P		Medium P <sub>3</sub> Shirahama & col. (61)
	Okanishi & col. (49)		
Sucrose (g)	103 (0.3M)	171 (0.5M)	
(1) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g)	0.05	-	
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g)	0.25	-	
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2.03 (0.01M)	1.0 (5mM)	
(1) CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (g)	3.68 (0.025M)	0.73 (5mM)	
(1) TES buffer pH 7.2 (ml)	100 (0.25M)	10 (0.025M)	
Trace element solution (ml)	2	-	
NaCl (g)	-	4.13 (70mM)	
Total volume with distilled water* (1)	I	I	

In average the protoplasts start to appear after a couple of minutes. Under the frequent control of the phase contrast microscope the time needed to convert the cells into protoplasts can be easily established. After washing protoplast suspension with protoplasting medium without lysozyme, the osmotically resistant units of non protoplasted mycelium are separated by filtration through cotton or flass filter.

Before regeneration protoplasts are counted in phase-contrast microscope. The osmotically stable units of mycelium are counted after staining with fluorescein-isothiocyanate reagent. Even after filtration through glass filter they contaminated protoplast suspension usually ranges 0.1-3%. The brilliant fluorescence of non-protoplasted mycelium makes counting under UV light very easy.

Protoplast varies greatly in size (Figure 4). Many of them are too small to contain a genome, and are difficult to be counted under the microscope (33).

**4. Stabilization of protoplasts** - The effect of Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> on the formation and leakage of protoplasts was tested (49). In hypertonic media containing 0.3-0.5M sucrose, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O in concentration 0.01-0.005M and CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O in concentration 0.005-0.5M the protoplasts are well stabilized.

The fine structure of protoplasts was studied in *S. griseoflavus* (60), *S. griseus* (49), *S. melanochromogenes* (41; Figure 5) and *S. rimosus* (56).

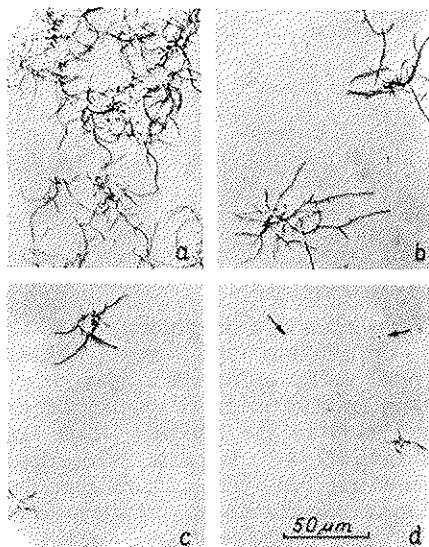
In protoplasts of *S. griseus*, formed at low concentration of divalent cations neither a wall layer nor mesosomes were observed. *S. melanochromogenes* the protoplasts were surrounded by a three layered citoplasmic membrane. Cytoplasm showed a nuclear region and a large number of ribosomes.

Protoplasts produced from mycelium in stationary phase of growth by low concentrations of lysozyme (50mcg/ml) showed vesicles attached to the cell membrane (Figure 6 and 7).

**5. Regeneration of protoplasts** - Regeneration of protoplasts is a crucial step in recombination. Efficiency is high in cell regeneration from *S. fradiae* protoplasts formed from cells harvested between exponential and stationary growth phases (5,

**Figure 3 - *Streptomyces melanochromogenes*.**

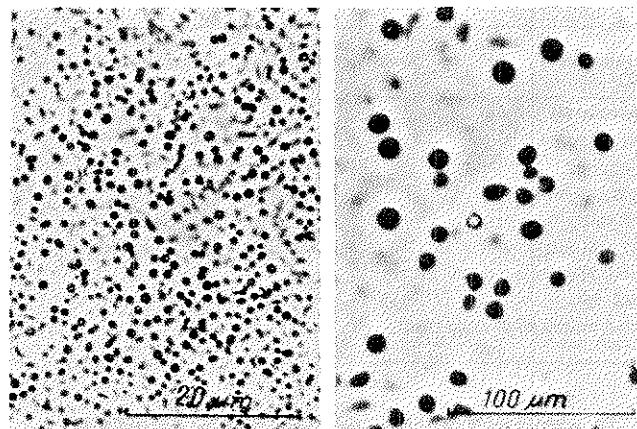
**Symbols:** Mycelium - 18h growth in medium containing differents concentration (0.1% to 0.9%) of glycine - 0.1% = Network of hyphae; 0.3% = Radial aggregates of about 100mg in diameter; 0.5% = Radial aggregates of diameter about 50µg; 0.9% = Single short hyphae (41)



41). The regeneration of protoplasts of *S. griseus* and *S. venezuelae* was 41% and 51%, respectively (49) and was strongly dependent on the presence of bivalent cations in regeneration medium containing phosphate and casamino acids. Similar efficiency of protoplast regeneration was obtained (41) in two auxotrophic mutants of *S. melanochromogenes*.

**Figure 4 -** *Streptomyces melanochromogenes*.

**Symbols:** Protoplasts - phase-contrast mycroscopy (41)



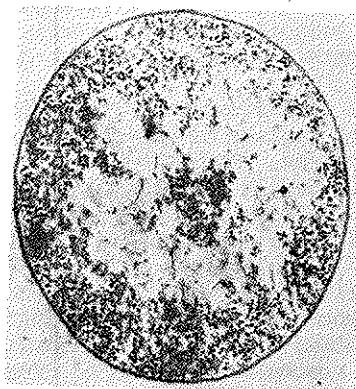
More than 50% of regeneration efficiency in *S. rimosus* protoplasts was reported by optimizing the osmotic stabilizer concentrations and by modifying the plating procedure by using soft agar overlay technique (56).

The regeneration frequency of protoplasts varies according to the species; high regeneration rate is limited only to some *Streptomyces* species (62). According to the authors the improved conditions of protoplasts regeneration consist of the use of modified regeneration medium ( $R_3$ ), of the embedding protoplasts in soft (0.4%) low melting point agarose containing the ingredients of  $R_3$  medium, and of seeding the embedded protoplasts on dried surface of underlay  $R_3$  agar. Table 3 contains the composition of different media for protoplast regeneration. Protoplasts were incubated at lower temperature. Temperature sensitivity tested (62) was rather high ( $LD_{50}$  after about 5 min. at 30°C) in contrast with the result obtained by others (16, 19) and our own (4) experience ( $LD_{100}$  50–60°C for 1–3h). The discrepancies showed the differences in temperature sensitivity of protoplasts derived from different species of streptomycetes. The regeneration frequency with an auxotrophic mutant of *S. kasugaensis* MB 273-18a was 70% with *S. fradiae* and *S. niveus* about 90%, whereas with *S. kanamyceticus* it was 30%. Only *S. humidus* showed low regeneration frequency, of about 10%.

The efficiency of regeneration was strongly dependent upon the incubation temperature for both protoplast regeneration and cell growth. Under the best conditions with optimal temperatures for protoplast regeneration, protoplasts of *S. albus* (GJ1074), *S. ambofaciens* (ATCC 15154), *S. fradiae* C373 (ATCC 19609) and *S. griseofuscus* (ATCC 23916) were able to regenerate viable cells at nearly 100% efficiency (7).

**Figure 5 -** *Streptomyces melanochromogenes*.

**Symbols:** Fine structure of protoplast. Protoplast surrounded by three layered membrane. In cytoplasm nucleoid and ribosomes are seen. Magn. X 30000 (40)



**Table 3 - Composition of regeneration (R) media**

**Symbols:** Trace element solution (49); (.) = Sterilized separately; (..) = Corn Steep liquor: supernatant of 12 v/v corn steep liquor pH 7.0; (...) = Soft agar overlay (3ml) of medium R<sub>2</sub>; (...) = Hypertonic soft agar overlay containing sucrose, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O and HEPES buffer (N-2 hydroxyethylpiperazine N'-2-ethanesulfonic acid) at the concentration of the medium R<sub>5</sub> (agarose or agar 0.65%).

Ingredients	R <sub>1</sub> Okanishi & col. (49)	R <sub>2</sub> Okanishi & col. (49)	R <sub>3</sub> Shirahama & col. (62)	R <sub>4</sub> Ogawa & col. (48)	R <sub>5</sub> Ikeda & col. (35)
Sucrose (g)	103-171 (0.3-0.5M)	103-171 (0.3-0.5M)	-	137 (0.4M)	171 (0.5M)
Dissodium succinate 6H <sub>2</sub> O	-	-	150 (0.555M)	-	-
KCl (g)	-	-	0.5	15	-
(.) K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g)	-	-	0.2	-	-
(.) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g)	0.05	0.05	-	0.05	0.05
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.25	0.25	-	0.25	0.25
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (g)	4.07 (0.02M)	10.12 (0.05M)	8.1 (40mM)	10.1	10.12
(.) CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (g)	7.37 (0.05M)	2.95 (0.02M)	2.2 (15mM)	7.4	2.95
Glucose (g)	10	10	10	10	10
(.) L-asparagine (g)	2	-	-	2	2.95
Casamino acids (g)	0.1	0.1	-	0.5	-
(.) Proline (g)	-	3	-	-	-
Yeast extract (g)	-	-	4	-	1
Polypeptone	-	-	4	-	-
(.) Corn steep liquor	-	-	-	30	-
TES buffer pH 7.2 (ml)	100 (0.25M)	100 (0.25M)	10 (0.025M)	10 (0.025M)	-
HEPES buffer pH 7.2 (ml)	-	-	-	-	100 (0.25M)
Trace element solution (ml)	2	-	-	2	2
Bovine serum albumin Fr. V	-	-	-	-	-
(.) NaOH (ml)	-	-	-	-	1 (1N)
Agar	22	22	18	7.5	22
(.) Total Vol.w/distil.water	I	I	I	I	I
Agarose (low melting point)	-	-	4 (...)	-	5 (...)

The influence of plasma expanders (polyvinyl pyrrolidine K90 MW 360.000) 0.03% and bovine serum albumin, (fraction V). 0.02% on regeneration frequency of protoplasts, from three macrolide producing strains, was observed in: *S. ambofaciens* KA-427, *S. cinnabarinus* KA IIB-3 and *S. fradiae* KA-427. The regeneration frequency was high, varying from 79% to 100%.

Protoplasts regeneration has been well documented (49; Figures 8 and 9). The protoplasts of *S. griseus* (1-2µm in diameter), incubated on medium R<sub>1</sub> after 40h increased to about 30µm. After the next 8h enlarged protoplasts started to expand from their peripheral filamentous hyphae, and their number increased after 65h. After 73h the hyphae showed extensive branching. Some of enlarged protoplast did not revert to the filamentous growth.

Protoplasts of certain *Streptomyces* species regenerate asynchronously under standard conditions (5, 29, 33). Colonies which develop earlier produce autoinhibitory substance which inhibits regeneration of surrounding protoplasts. Plating *S. acromyces* protoplasts on regeneration medium after dilution (33) provides large colonies derived from osmotically stable non-protoplasts units, and the much numerous colonies arising from protoplasts regeneration. The latter were strongly inhibited by colonies. The phenomenon is not apparently due to antibiotic

synthesis (6). Protoplasts of *Bacillus subtilis* produce a reversion inhibitory factor (RIF) which blocks protoplasts regeneration at higher concentration (6, 12). Reversion inhibitory factor (RIF) is suggested to be an autolytic enzyme-inactivated by trypsin, and activated by mercaptoethanol, which impedes cell wall synthesis during cell regeneration.

Figure 6 - *Streptomyces melanochromogenes*

Symbols: Protoplast shadowed with chromium at angle of 20°. Shadow of spherical protoplast and vesicular structures. Magn. X 30000 (40)

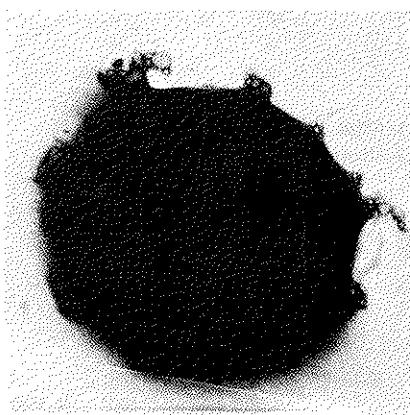


Figure 7 - *Streptomyces melanochromogenes*

Symbols: 48h growth treated by 50mcg/ml of lysozyme. Vesicular substructures on the cell membrane. Magn. X 30000 (40)

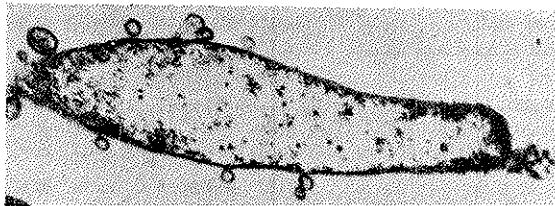


Table 4 - Steps for obtaining protoplast fusion in Actinomycetes

Protoplast fusion	
Mixing of protoplasts derived from two or more parents	Equal density and equal volume of protoplasts suspension
Centrifugation	15 min. at 1000 x G
Pellet suspension in PEG (1000-6000Mw) solution	Solution composed of: PEG 55% - 1vol. DMSO 15% - 1,5vol. Incubation time 30 seconds
Adding P medium 5vol. PEG 55% 1vol.	Incubation for 5 min.
Centrifugation	15 min. at 1000 x G
Resuspending of pellet in P medium	Gentle mixing
Seeding of protoplasts on solid medium	Different dilutions in P medium seeded an R <sub>2</sub> or an any other solid, hypertonic medium

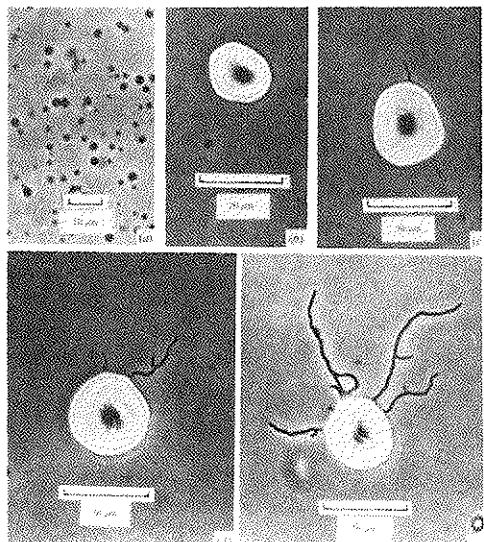
Protoplast regeneration is a useful method for improving antibiotic producing strains of *Streptomyces*. Comparison has been made (34) of the macrolide-antibiotic productivity after regeneration of protoplasts derived from three strains: *S. ambofaciens* a spiramycin producer, *S. fradiae* producing tylisin and *S. cinnatus* which produce cirramycin. The yield of tylisin was about three times higher after protoplast regeneration; *S. ambofaciens* about twice. Only *S. cinnatus* gave lower antibiotic productivity. It was assumed that the increased productivity of strains is originated from "genetic variation".

Similar results were obtained independently (Institute of Antibiotics UFPE) with *S. capoamus-IA-3122*, producing cyclamycin, antibiotic belonging to anthracycline group. After protoplast regeneration, without induced fusion, colonies showing five times higher yield of cyclamycin productivity in comparison to the original strain were selected (4).

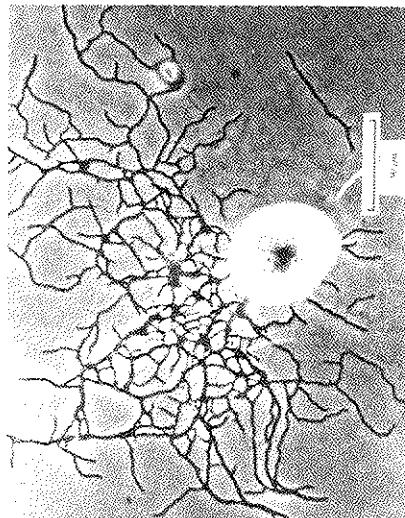
Under appropriate conditions the chemical and physical properties of the cytoplasmic membrane may be altered. If it becomes more stabilized, an important prerequisite is fulfilled for growth of a protoplast and its further propagation in a form more or less spherical surrounded only by a cytoplasmic membrane. It was

possible to induce a protoplast growth using a complex agar medium supplemented by 10% of sucrose,  $MgSO_4$  0.1M, lysozyme 1mg/ml, and incubation under semianerobic conditions at 28-30°C. Colonies consisted entirely of spherical protoplasts. Such wallless cells of *S. hygroscopicus* growing in the form of colonies have been already obtained (22; Figure 9).

**Figure 8 - *Streptomyces griseus*.**  
Symbols: Regeneration of protoplasts after: (b) = 40h; (c) and (d) = after 48h; (e) = after 65h of incubation and phase-contrast microscopy (49)



**Figure 8a - Regeneration of protoplast after 73h**



The conditions for the biosynthesis of actinomycin D by protoplasts of *S. parvulus* ATCC12434 have been described (24). The synthesis was inhibited by actinomycin D and by a decrease of sucrose concentration. The aminoacid uptake by protoplasts (L-methionine, sarcosine and L-and-D-valine) was lower than by the mycelium. On our own experiments showed both protoplast and cell wall role in actinomycin D biosynthesis by *S. melanochromogenes* (41).

**6. Protoplast fusion** - The early observations on spontaneous protoplast fusion in bacteria, yeast and fungi concluded that fusion took place mainly between genetically related microorganisms.

In recent years new data have been collected on protoplast fusion including genetic analysis, possible application in strain "improvement" and in obtaining antibiotics producing "hybrid".

It is essential to induce the process of fusion (64). Protoplast would not fuse spontaneously even when derived from cells of opposite mating types (16).

In most cases auxotrophic mutants with antibiotic resistance, and color markers are used for fusion. After discovery that polyethylene (PEG) acts as a fusogenic agent of plant protoplasts (37) it was successfully introduced to the protoplast fusion of microbial cell (3-17). PEG was first used in mammalian cell fusion (57).

PEG preparations of different molecular weight of 1,000, 1,540, 4,000 and 6,000 were used with about the same fusogenic effect for protoplast fusion on Actinomycetales (Table 4).

Protoplasts inactivated by heat (55°C for 3h) which are not able to regenerate,

but are able to fuse, were used in experiments with *B. megaterium* (19). Inactivated prototrophic partner was able to supplement non inactivated auxotrophic partner. The advantage of this system is that only auxotrophic mutant is needed for direct selection of fused protoplasts, without using additional markers. Similar good results were obtained in *Micromonospora* (16). Low frequency of recombination can be increased by ten times after irradiating the two parental protoplast suspension immediately before fusions (31). If recombination rate is already high (20%) it can be doubled (to about 40%) with a UV doses sufficiently high to kill 99% of protoplasts. It eliminates the protoplasts not involved in the fusion (25).

Protoplasts fusion has been applied to many mutants, strains, species and genera of Actinomycetes.

**7. Recombination in antibiotic producing *Streptomyces* by protoplast fusion - Using protoplast fusion of *S. coelicolor*, *S. parvulus*, *S. lividans*, *S. griseus*, *S. acrimycini*** high frequency of recombinants was obtained by adding 14% w/v DMSO (dimethyl sulphoxide) and irradiating the protoplast before fusion with high killing dose of UV (33). The results of genetical analysis was shown in recombinants of *S. coelicolor* obtained at high frequencies, sometimes higher than 10% (25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33). With *S. coelicolor*, 10-20% of the total spore progeny of the regenerated cultures have been obtained even under nonselective conditions (31).

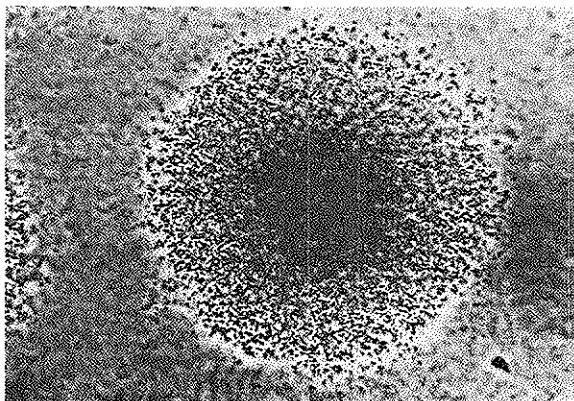
Genetic analysis of recombinants from multiple crossover classes (31), showed that the genomes of both fused partners are nearly complete, resulting in a transient diploid state. The heterozygous diploid state was transient in *S. coelicolor* and fusion colonies frequently contained only recombinants without parentals. In other cases both recombinants and parental genomes could be found. In a same colony, the presence of different recombinant genotypes was also observed. Events of recombinants were independent of the known sex factors SPC1 and SPC2 (32).

Recombination in auxotrophic mutants of *S. parvulus* and *S. antibioticus* has been obtained at high frequency by protoplast fusion. The efficiency was  $10^4$  times higher over the mating technique, which confirmed earlier observation (20). In *S. parvulus* stable prototrophs and unstable nutritionally complemented heterokaryons were isolated (47).

Very high percentage (over 90) of stable recombinants was obtained by protoplast fusion of auxotrophic, antibiotic resistant mutants (marked cas-, rfp<sup>r</sup>) of *Micromonospora echinospora* and *M. inyoensis* with parental, prototrophic, antibiotic sensitive strains (65).

Recombination has been applied to strain improvement but only to a very limited extent. The main reason for its neglect has probably been the necessity to introduce selectable (for example, drug resistance) or more counter-selectable (auxotrophic) markers into the strains to be crossed, in order to identify recombinants occurring at frequencies of  $10^{-6}$  or lower (33). In *S. coelicolor* the recombinants can be obtained in 10-20% even under non-selective conditions. These observations were confirmed (5) in studying the genetic consequences of protoplasts

**Figure 9 - Colony of growing protoplasts of *Streptomyces hygroscopicus* on agar medium. Magn. X 350 (22)**



fusion in auxotrophic and resistant mutants of *Streptomyces fradiae*.

The use of interspecific mating technique is  $10^4$  less efficient than protoplast fusion (47). A recombinant strain was constructed from two blocked mutants: *S. violaceus*, producing violamycin BI complex anthracycline, and *S. hygroscopicus* which produces turamycin (a macrolide antibiotic). The interspecific recombinant *S. violaceus* subsp. *iremyceticus* IMET 43615 produces a hybrid antibiotic: with aglycone, part of violamycin and with sugar, part of turamycin (18).

The procedures for mating auxotrophs of *S. fradiae* with *S. bikiniensis* by both conventional and protoplast fusion technique have been described (20). A 200 to 10,000 fold increase of recombination frequency was obtained by protoplast fusion compared to conventional mating procedure. The presence of  $\text{Ca}^{2+}$ , as a fusogenic agent, in concentration of 20mM, was essential in 40% PEG in protoplasting medium. The importance of optimization of all independent steps (proper choice of parent strains, formation, stabilization, fusion and regeneration of protoplasts) was stressed. It ensures genetic transfer, survival of hybrid strains and production of hybrid antibiotic.

Two aminoglycoside antibiotic producing strains, *S. griseus* (a streptomycin producing strain) and *S. tenjimariensis* (istamycin producing) were recombined by protoplast fusion. The selected recombinant strain produces a new antibiotic differing from the antibiotic produced by either parents (67). Protoplasts of two different auxotrophic mutants of *S. lavendulae* S55-B1 were fused and regenerated on selective media (44). Prototrophic colonies overwhelmed other types of recombinants on several compared selection media. The results suggested that stable diploid cells were formed by cell fusion, which differed from the result obtained in *S. coelicolor* (32). Production of  $\beta$ -lactamase, pigment and differentiated function like spore formation showed no regularities among recombinants, after protoplast fusion. Some recombinants showed similar patterns to one parent, but other showed different character from both parents. The production of secondary metabolites seems to be controlled by multiple regulations.

A combined method of mutation-selection and protoplast fusion was used to obtain recombinants between blocked mutants of *S. griseus* producing carbapenem antibiotics: carpetimycin A, B and E<sub>5</sub>, as well as epithienamycin and the olivanic acids.

Part of these antibiotics is sulfated and part unsulfated. The production ratio of these two groups depends on the sulfate concentration in the medium. Negative sulfate transport, auxotrophic mutants, requiring thiosulphate or cysteine were unable to produce sulfate antibiotics, but were able to produce unsulfated carbapenem compounds at significantly higher yield than the parental strain. The sulfate transport system was reintroduced into negative sulfate transport mutant from the parental strain by protoplast fusion technique. Among stable recombinants, high producers of sulfated carbapenem antibiotics were found (38).

The involvement of plasmids in antibiotic syntheses was first suggested in 1974 (49). This has been latter studied by several investigators for more than 10 different antibiotics. In most cases the proof for plasmid involvement in antibiotic production was indirect and rather doubtful. So far, the only evidence, that the structural gene for antibiotic synthesis is plasmid-borne was provided for methylenomycin A, produced by *S. coelicolor* A3 (2, 32).

There are still doubts about the location of structural genes for antibiotic production on plasmids and the case of methylenomycin is rather exceptional (14). The plasmid SP1 carries a specific determinant of resistance, although the mechanism is not known. There are some information on plasmid involvement in one of the aminoglycoside modifying enzymes (25, 26). These are the only examples so far from streptomycetes.

Polyethylene glycol (PEG) induced transformation processes, in streptomycetes, can not be separated from those from fusion. The mechanisms for introduction of transformation of a DNA molecule in the protoplast seem to involve protoplast fusion (23).

Among recently developed genetical methods, used in industrial microbiology, protoplast fusion and protoplast transformation seemed very promising. They opened new ways for basic studies and better understanding of regulatory processes in antibiotic producing streptomycetes.

## Referências Bibliográficas

1. Ankong, Q.F.; Howell, J.I.; Lucy, J.A.; Safwat, F.; Davey, M.R. & Cocking, E.C. - Fusion of hen erythrocytes with yeast protoplasts induced by polyethylene glycol. *Nature*, 225:66-67, 1975.
2. Ahkong, Q.F.; Fischer, D.; Tampion, W. & Lucy, J.A. - Mechanism of cell fusion. *Nature*, 235:194-195, 1975.
3. Anné, J. & Peberdy, J.F. - Induced fusion of fungal protoplast by polyethylene glicol. Fourth Intern. Symposium of Yeast and Other Protoplasts, Nottingham, England (Abstracts), p.8-12, 1975.
4. Araujo, J.M.; Méllo, B.R.; Falcão de Moraes, J.O. & Kurylowicz, W. - Fusão de protoplastos (a nível de espécies) em *Streptomyces*, a fim de obter recombinantes produtores de antibióticos híbridos. Trabalho apresentado no 9º Congresso Latino Americano de Microbiologia, São Paulo, Sociedade Brasileira de Microbiologia, julho/1983.
5. Baltz, R.H. - Genetic recombination in *Streptomyces fradiae* by protoplast fusion and cell regeneration. *J. Gen. Microbiol.*, 107:93-102, 1978.
6. Baltz, R.H. - Genetic recombination by protoplast fusion in *Streptomyces*. Development in Industrial Microbiology, 21:43-54, 1980.
7. Baltz, R.H. & Matsushima, P. - Protoplast fusion in *Streptomyces*: conditions for efficient genetic recombination and cell regeneration. *J. Gen. Microbiol.*, 127:137-146, 1981.
8. Bradley, S.G. - Protoplasts of *Streptomyces griseus* and *Nocardia paraguyaensis*. *J. Bacteriol.*, 77:115-116, 1959.
9. Bu'Lock, J.D. - Process needs and the scope for genetic. In: - Sebek, O.K. & Laskin, A.I., eds. - Genetic of industrial microorganisms. Washington, ASM, p.105-111, 1979.
10. Carlton, B.C. & Brown, B.J. - Gene mutation. In: - Gerhardt, P., ed. - Manual of methods for general microbiology. Washington, ASM, chap.13, p.222-242, 1981.
11. Davis, B.D. - Isolation of biochemically deficient mutants of bacteria by penicillin. *J. Amer. Chem. Soc.*, 70:4667, 1948.
12. De Castro-Costa, M.R. & Landmen, O.E. - Inhibitory protein controls the reversion of protoplasts and L-forms of *Bacillus subtilis* to the walled state. *J. Bacteriol.*, 129:678-689, 1977.
13. Delic, V.; Hopwood, D.A. & Friend, E.J. - Mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) in *Streptomyces coelicolor*. *Mutation Research*, 9:167-182, 1970.
14. Demain, A.L. - Possible applications of genetic recombination on the discovery of new antibiotics in Actinomycetes: future of antbiotherapy and antibiotics research. Academic Press, 1981.
15. Douglas, R.J.; Robinson, J.B. & Corke, C.T. - On the formation of protoplast-like structures from *Streptomyces*. *Canadian J. Microbiol.*, 4:551-554, 1958.
16. Ferenczy, L. - Microbial protoplast fusion. In: - Glover, S.W. & Hopwood, D.A., eds. - Genetic as a tool in microbiology. 31 Symp. Gen. Microbiology, Cambridge University Press, p.1-34, 1981.
17. Ferenczy, L.; Kevei, F. & Szegedi, M. - High-frequency fusion of fungal protoplasts. *Experientia*, 31:1028-1030, 1975.
18. Fleck, W.F. - Genetic approach to new streptomycete products. In: - Sebek, O.K. & Laskin, A.I., eds. - Genetic of industrial microorganisms. Washington, ASM, p.117-122, 1979.
19. Fodor, K.; Demiri, E. & Alföldi, L. - Polyethylene glycol-induced fusion of heat-inactivated and living protoplasts of *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.*, 135:68-70, 1978.
20. Godfrey, O.; Ford, L. & Huber, M.L.B. - Interspecies matings of *Streptomyces fradiae* with *Streptomyces bikiniensis* mediated by conventional and protoplast techniques. *Canadian J. Microbiol.*, 24:994-997, 1978.
21. Guerola, N.; Ingraham, L. & Cerdá-Olmeda. - Induction of closely-linked multiple mutations by nitrosoguanidine. *Nature*, 230:122-125, 1971.

22. Gumpert, J. - Ultrastructure and modifiability of the cell envelope in *Streptomyces hygroscopicus*. In: - Mordarski, M.; Kurylowicz, W. & Jeljaszewicz, J., eds. - *Nocardia and Streptomyces*. Stuttgart/ New York, G. Fischer Verlag, p.221-223, 1978.
23. Hicks, J.B.; Hinnen, A. & Fink, G.R. - Properties of yeast transformation. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 43:1305-1313, 1979 (cit. acc. L. Ferenczy: Microbial protoplast fusion in Genetics as a Toll in Microbiology, ref. 15).
24. Hitchcock, M.J.M. & Kartz, E. - Actinomycin biosynthesis by protoplast derived from *Streptomyces parvulus*. Antim. Ag. Chemother., 13:104-114, 1978.
25. Hopwood, D.A. - The many faces of recombination. In: - Sebek, O.K. & Laskin, A.I., eds. - Genetic of industrial microorganisms. Washington, ASM, p.1-9, 1979.
26. Hopwood, D.A. - Possible application of genetic recombination in the discovery of new antibiotics in Actinomycetes: future of antbiotherapy and antibiotic research. New York, Academic Press, p.407-418, 1981.
27. Hopwood, D.A. - Genetic studies of antibiotics and other secondary metabolites. In: - Glover, S.W. & Hopwood, D.A., eds. - Genetic as a tool in microbiology. London, Cambridge University Press, p.187-218, 1981.
28. Hopwood, D.A. - Uses of protoplast in the genetic manipulation of streptomycetes. Intern. Symposium on Actinomycetes - Biology. Stuttgard/ New York, G. Fischer Verlag, 1982.
29. Hopwood, D.A. & Merrick, M.J. - Genetic of antibiotic production. Bacteriol. Review, 41:595-635, 1977.
30. Hopwood, D.A. & Wright, H.M. - A plasmid of *Streptomyces coelicolor* carrying a chromosomal locus and its interspecific transfer. J. Gen. Microbiol., 79:311-342, 1973.
31. Hopwood, D.A. & Wright, H.M. - Factors affecting recombinant frequency in protoplasts fusion on *Streptomyces coelicolor*. J. Gen. Microbiol., 111:137-143, 1979.
32. Hopwood, D.A. & Wright, H.M. - Bacterial protoplast fusion: recombination in fused protoplast of *Streptomyces coelicolor*: molecular and general genetics. 162:307-317, 1978.
33. Hopwood, D.A.; Wright, H.M.; Bibb, M.J. & Cohen, S.N. - Genetic recombination through protoplast fusion. Nature, 268:171-174, 1977.
34. Ikeda, H.; Inone, M. & Omura, S. - Improvement of macrolide antibiotic producing *Streptomyces* strains by regeneration of protoplasts. J. Antibiotics, 36:283-288, 1983.
35. Ikeda, H.; Tanaka, H. & Omura, S. - Genetic and biochemical features of spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*: curring protoplast regeneration and plasmid transfer. J. Antibiotics, 35:507-516, 1982.
36. Ingolia, T.D. & Koshland, D.E. - The role of calcium in fusion of artificial vesicles. J. Biol. Chem., 253:3821-3829, 1978.
37. Kao, K.N.G. & Michayluk, M.R. - A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplast. Planta, 115:355-367, 1974.
38. Kitano, K.; Nozaki, Y. & Imada, A. - Abstracts of the Forth International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms, Kyoto, 1982, O-VI-7, p.68, 1983.
39. Kochkina, Z.M. & Raustenshtein, V.I. - Formation of protoplasts in *Actinomyces streptomycin Krass*. Microbiol., 37:1046-1051, 1968.
40. Kurzatkowski, W.; Gorzakowski, B.; Woznicka, W.; Paskiewicz, A. & Kurylowicz, W. - The site of synthesis of actinomycin D in *Streptomyces melanochromogenes*. Proc. Intern. Symposium on *Nocardia* and *Streptomyces*, Warsaw, Oct. 1976. Stuttgart, Fischer Verlag, p.363-375, 1978.
41. Kurzatkowski, W.; Kurylowicz, W.; Woznicka, W.; Paszkiewicz, A.; Polowniak-Pracka, H.; Wawrzyniak, K. & Gumpert, J. - Formation stabilization and fusion of protoplast of two auxotrophic mutants of *Streptomyces melanochromogenes*. Proceedings of Congress of Hungarian Soc. Chemotherapy, Hajduszoboszló, p.129-142, 1979.

42. Lansman, J. & Haynes, D.H. - Kinetics of a  $\text{Ca}^{2+}$ -triggers membrane aggregation reaction of phospholipid membranes. *Bioch. Bioph. Acta*, 394:335-347, 1975.
43. Lederberg, J. & Lederberg, E.M. - Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J. Bacteriol.*, 63:399-408, 1952.
44. Nakano, M.M.; Ishihara, H. & Ogawara, H. - Fusion of protoplasts *Streptomyces lavendulae*. *J. Antibiotics*, 35:359-363, 1982.
45. Necas, O. - Die regeneration von zellfragment bie den hefen. *Biol. Zentralblatt*, 75:268-281, 1956.
46. Normansell, J.D. - Strain improvement in antibiotic producing microorganisms. *J. Chem. Techn. Biotechnology*, 32:296-303, 1982.
47. Ochi, K.; Hitchcock, M.J.M. & Katz, E. - High-frequency fusion of *Streptomyces parvulus* and *Streptomyces antibioticus*, protoplasts induced by polyethylene glycol. *J. Bacteriol.*, 139:984-992, 1979.
48. Ogawa, H.; Imai, S.; Satoh, A. & Kojima, M. - An improved method for the preparation of streptomycetes and *Micromonospora* protoplasts. *J. Antibiotics*, 36:184-186, 1983.
49. Okanishi, M.; Suzuki, K. & Umezawa, H. - Formation and revision of streptomycetes protoplasts: cultural conditions and morphological study. *J. Gen. Microbiol.*, 80:389-400, 1974.
50. Okanishi, M.; Utehara, R. & Okami, Y. - Infection of the protoplasts of *Streptomyces kanamyceticus* with deoxyribonucleic acid preparation from actinophage PK-66. *J. Bacteriol.*, 92:1850-1852, 1966.
51. Papahadjopoulos, D.; Poste, G.; Schaeffer, B.E. & Vail, W.J. - Membranes fusion and molecular segregation in phospholipid vesicles. *Bioch. et Bioph. Acta*, 352:10-28, 1974.
52. Papahadjopoulos, D.; Vail, W.J.; Pangborn, W.A. & Poste, G. - Studies on membrane fusion. II - Induction of fusion in pure phospholipid membrane calcium ions and other divalent metals. *Bioch. et Bioph. Acta*, 448:265-284, 1976.
53. Parag, Y. - Genetic recombination in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.*, 33:1027-1031, 1978.
54. Peberdy, J.F. - Isolation and fusion of bacterial protoplasts. In: - Peberdy, J.F., ed. - Protoplast application in microbial genetics. University of Nottingham, p.1-4, 1979.
55. Peberdy, J.F. - Protoplast fusion as a tool genetic manipulation and breeding in industrial microorganisms. *Enzyme and Microb. Technol.*, 2:23-29, 1980.
56. Pigac, J.; Hranueli, D.; Smokvina, T. & Alacavic, M. - Optimal cultural and physiological conditions for handling *Streptomyces rimosus* protoplasts. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 44:1179-1186, 1982.
57. Pontecorvo, G. - Production of mammalian cell hybrids by means of polyethylene glicol treatment. *Somatic Cell Genetics*, 1:397-400, 1975.
58. Provost, A.; Bourguignon, C.; Fournier, P.; Ribet, A.M. & Heslot, M. - Intergeneric hybridization in yeasts through protoplast fusion. *F.E.M.S. Letters*, 3:309-312, 1978.
59. Queener, S.W. & Baltz, R.H. - Genetics of industrial microorganisms. *Am. Rep. Ferm. Process*, 3:5-44, 1979.
60. Sagara, Y.; Fukui, K.; Yoshido, N.; Kashima, T. & Fugimoto, M. - Rapid formation of protoplasts of *Streptomyces griseoflavus* and their fine structure. *Japan. J. of Microbiology*, 15:73-84, 1971.
61. Schaeffer, P.; Cami, B. & Hotchkiss, R.D. - Fusion of bacterial protoplasts. *Proc. Natl. Ac. Sci. (USA)*, 73:2151-2155, 1976.
62. Shirahama, T.; Furumai, T. & Okaniski, M. - A modified regeneration method for streptomycetes protoplasts. *Agric. Biol. Chem.*, 45:1271-1273, 1981.
63. Silva Filho, A.A.; Falcão de Moraes, J.O.; Araujo, J.M.; Mello, B.R.; Sena, K.X.F.R.; Silva, E.C.; Andrade, M.S.S. & Kurylowicz, W. - Melhoramento de cepa de *Streptomyces capoamus* pelo tratamento com UV e MN. Trabalho apresentado no 9º Congresso Latino Americano de Microbiologia, S. Paulo, Julho de 1983.
64. Svoboda, A. - Mating reaction in protoplasts. *Arch. Microbiol.*, 110:313-318, 1976.

65. Svoboda, A. - Intergeneric fusion of yeast protoplast: *Saccharomyces cerevisiae* + *Schizosaccharomyces pombe*. In: - Ferenczy, L. & Farkas, G.L., eds. - Advances in protoplasts research. Budapest Akadémia Kiadó, Oxford, Pergamon Press, p.118-124, 1980.
66. Szybalski, W. - Microbial selection. I - Gradient plate technique for study of bacterial resistance. *Science*, 116:46-48, 1952.
67. Vournakis, J.N. & Elander, R.P. - Genetic manipulation of antibiotic producing microorganisms. *Science*, 219:703-709, 1983.
68. Woodward, V.W.; DeZeeuv, J.R. & Srb, A.M. - The separation and isolation of particular biochemical mutants of *Neurospora* by differential germination of conidia, followed by filtration and selective plating. *Proc. Nalt. Ac. Sci. (USA)*, 40:192-200, 1954.

## GLUCOSE ISOMERASE FROM *ZYMMONAS MOBILIS*

Galba Maria Campos-Takaki

Deptº de Antibióticos UFPE  
Cidade Universitária  
50000 Recife PE, Brasil

Massanori Takaki

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

Eugênia M. Rios  
& Janete Magali Araújo

Deptº de Antibióticos UFPE

### **Summary**

The activity of glucose isomerase was detected in cells of *Zymomonas mobilis* Kluyver & Van Niel grown in liquid medium. The enzyme was partially purified with ammonium sulfate fractionation and the optimum pH of isomerase activity was 7.5-8.0 and the optimum temperature of incubation was 90°C.

### **Resumo**

#### *Glucose isomerase de Zymomonas mobilis*

A atividade de glucose isomerase foi detectada em células de *Zymomonas mobilis* Kluyver & Van Niel, crescidas em meio líquido. A enzima foi parcialmente purificada, por precipitação com sulfato de amônio; o pH ótimo da atividade isomerase foi de 7,5-8,0 e a temperatura de incubação 90°C.

### **Introduction**

Considerable importance has been attributed to *Zymomonas mobilis* Kluyver & Van Niel as a model microorganism for ethanol production (6) through the Entner-Doudoroff pathway (4). *Z. mobilis* can ferment several mono and disaccharides until ethanol (15).

The industrial production of fructose utilising enzymatic conversion of glucose has become one of the most important process (1). Marshall & Kooi (11) reported by the first time the ability of *Pseudomonas hydrophila* to convert glucose to fructose by glucose isomerase. The microbial source of glucose isomerase includes *Lactobacillus brevis* (16), *Bacillus coagulans* (5) and several *Streptomyces* species (3, 8, 9).

The present paper describes the activity of glucose isomerase in *Z. mobilis*.

## Material and Methods

*Organism and cultural conditions* - *Z. mobilis* was maintained in medium 12 previously described (7). The composition of the medium for glucose isomerase production was: 2% sucrose; 0.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0.1%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.001%  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  and 0.1% yeast extract; pH 7.0. The incubation was carried out at 27–30°C in a controlled environmental incubator (New Brunswick Sci. Co. Inc., New Brunswick, N.J., USA) at 50 rpm.

*Enzyme preparation* - Cells were collected by centrifugation, washed three times with cold distilled water and homogenized with 200 mM phosphate buffer pH 7.0 and 100 mesh washed sand in a chilled pestle and mortar. The crude enzyme was obtained after centrifugation at 12,000xg for 15 min. at 4°C.

*Ammonium sulfate fractionation* - Crude enzyme was partially purified by differential ammonium sulfate precipitation. Fractions of 0–30; 30–60 and 60–90% saturation were obtained by centrifugation at 20,000xg for 30 min. at 4°C. Precipitates were suspended in 2 mL (initial volume = 20 mL) of 200 mM phosphate buffer pH 7.0 and dialized against buffer overnight at 5°C.

*Enzyme assay* - The activity of glucose isomerase was determined by calculating the initial rate of fructose production. The mixture of reaction (2.0 mL) contained: 1 M D-glucose; 100 mM  $\text{MgSO}_4$ ; 10 mM  $\text{CoCl}_2$ , and enzyme preparation in 200 mM phosphate buffer pH 7.0. The production of fructose was measured according to Rose (12). Control tubes without enzyme were maintained in the same conditions to exclude chemical isomerization.

*Protein determination* - Protein content was determined according to Lowry & col. (10).

## Results and Discussion

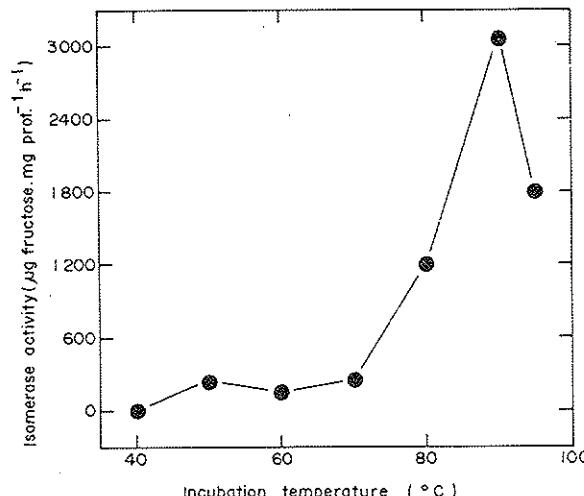
Glucose isomerase is a commercially important enzyme used in the production of high-fructose maize syrup (3). However, the production of this enzyme is not economical since formation of glucose isomerase requires expensive xylose or  $\text{Co}^{2+}$  as inducers in medium (2).

*Z. mobilis* can synthesize intracellular glucose isomerase without an inducer. Increasing amounts of enzyme production occurred during the cultivation time (over 72 h). The relation between the number of hours and glucose isomerase activity expressed by  $\mu\text{g fructose.mg prot}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  was: 12 h, 109.57; 24 h, 107.33; 36 h, 159.60; and 72 h, 355.8. The stationary phase of growth was reached at 36 h, as

Table 1 - Ammonium sulfate fractionation of glucose isomerase from *Zymomonas mobilis*

Fraction (% saturation)	Glucose isomerase	
	Total activity ( $\mu\text{g fructose.h}^{-1}$ )	Specific activity ( $\mu\text{g fructose.mg prot}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )
crude extract	6.712.0	528.5
0 – 30	460.0	177.0
30 – 60	2.146.0	1523.0
60 – 90	4.326.0	2769.0

Figure 1 - Glucose isomerase activity from *Z. mobilis* under different temperature of incubation

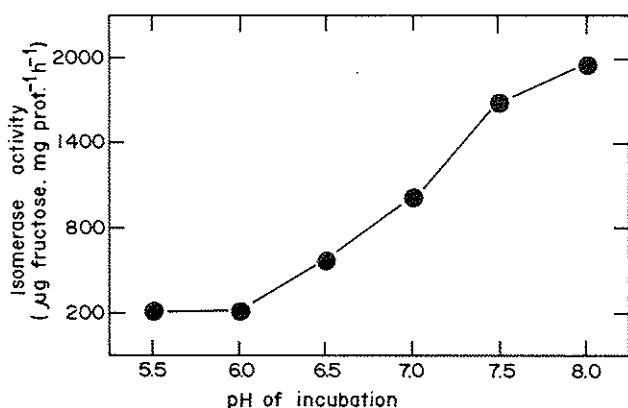


shown by the correlation to dry weight (mg/mL): 0h, 0.55; 6h, 1.03; 24h, 3.70; 36h, 6.40; and 72h, 6.10.

Glucose isomerase from *Z. mobilis* was partially purified with ammonium sulfate fractionation (Table 1) and the highest specific acitivity was obtained at 60–90% saturation, which is similar to those described for glucose isomerase from *Streptomyces phaeochromogenes* (14). The optimum temperature for glucose isomerase activity was 90°C (Figure 1), which is higher than to that described to *Streptomyces* species: 70°C for *S. albus* (13) and 80°C for *S. phaeochromogenes* (14). High pH (7.5–8.0) was optimum for isomerase activity (Figure 2) which is also similar to those described to several

*Streptomyces* species (13, 14) and to *Pseudomonas hydrophyla* (11). Since this is the first report of isomerase activity in an isolate of *Z. mobilis* and, although the level of enzyme produced is low in our conditions, when compared to those described by several authors (13, 14), the improvement without inducer could provide economical source for industrial use.

Figure 2 – Glucose isomerase activity from *Z. mobilis* under different pH of incubation



#### Acknowledgement

M.T. is a Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Research Fellow (300992/81).

#### References

1. Baker, S.A. – High fructose syrups, new sweeteners in the food industry. *Proc. Biochem.*, 10:39–40, 1975.
2. Chen, W.P.; Anderson, A.W. & Han, Y.W. – Production of glucose isomerase by *Streptomyces flavogriseus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37:324–331, 1979.
3. Chou, C.C.; Ladisch, M.R. & Tsao, G.T. – Studies on glucose isomerase from a *Streptomyces* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 32:489–493, 1976.
4. Dadds, M.J.S.; Martin, P.A. & Carr, J.G. – The doubtful of the species *Zymomonas anaerobia* and *Z. mobilis*. *J. Appl. Bact.*, 36:531–539, 1973.
5. Danno, G. – Studies on D-glucose-isomerizing enzyme from *Bacillus coagulans*, strain NH-68. V – Comparative study on the three activities of D-glucose, D-xylose and D-ribose isomerization of the crystalline enzyme. *Agric. Biol. Chem.*, 34:1805–1814, 1970.
6. Dawes, E.A.; Ribbons, D.W. & Rees, D.W. – Sucrose utilization by *Zymomonas mobilis*: formation of a levan. *Biochem. J.*, 98:804, 1966.
7. Falcão de Moraes, J.O.; Araújo, J.M.; Rios, E.M. & Mello, B.R. – Isolamento de *Zymomonas mobilis* em mostos de caldo de cana de fermentações alcoólicas industriais. *Rev. Microbiol. (São Paulo)*, 14:6–10, 1983.
8. Giovenco, S.; Morisi, F. & Pansolli, P. – Properties of free and immobilized glucose isomerase. *FEBS Lett.*, 36:57–60, 1973.

9. Kumakura, M.; Yoshida, M. & Kaetsuo, I. - Immobilization of glucose isomerase-containing *Streptomyces phaeochromogenes* cells in fine-particle form. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37:310-315, 1979.
10. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. & Randall, R.J. - Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275, 1951.
11. Marshall, R.O. & Kooi, E.R. - Enzymatic conversion of D-glucose to D-fructose. *Science*, 125:648-649, 1957.
12. Roe, J.H. - A colorimetric method for the determination of fructose in blood and urine. *J. Biol. Chem.*, 107:15-22, 1934.
13. Sanchez, S. & Smiley, K.L. - Properties of D-xylose isomerase from *Streptomyces albus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 29:745-750, 1975.
14. Strandberg, G.W. & Smiley, K.L. - Free and immobilized isomerase from *Streptomyces phaeochromogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 21:588-593, 1971.
15. Swings, J. & De Ley, J. - The biology of *Zymomonas mobilis*. *Bacteriol. Rev.*, 41:1-46, 1977.
16. Yamanaka, K. - Sugar isomerase. I - Production of D-glucose isomerase from heterolactic acid bacteria. *Agric. Biol. Chem.*, 27:265-270, 1963.

# ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE HIDROGÊNIO EM BIODIGESTORES\*

Suely V. Ferreira  
 Eliana F.C. Servulo  
 Iracema M. da Silva  
 & Hebe L. Martelli

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

## Resumo

Duas espécies bacterianas pertencentes à família *Enterobacteriaceae* foram isoladas de biodigestores alimentados com vinhoto de melão de cana proveniente de fermentação acetonobutílica, sob condições de anaerobiose. Os gases H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> são os únicos produzidos a partir de glicose. O gás hidrogênio é 40,87% do gás total produzido por *C. freundii* e 57,74% quando *Enterobacter agglomerans* foi testada.

## Summary

### *Isolation of H<sub>2</sub>-producing enterobacteria from biodigestors*

Two H<sub>2</sub>-producing strains belonging to the *Enterobacteriaceae* were isolated from biodigestors, fed with sugar cane stillage from acetonebutanol fermentation, under anaerobic conditions. H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> were the sole gas produced from glucose. Hydrogen was 40.87% of the total gas produced by *Citrobacter freundii*, and 57.74% when *Enterobacter agglomerans* was assayed.

## Introdução

Pesquisadores chineses referem terem obtido considerável aumento do percentual de metano no biogás, mediante adição aos biodigestores de culturas de bactérias de hidrogênio (1, 2). Com efeito, é geralmente admitido que a reação fundamental da metanogênese é a oxidação do hidrogênio com dióxido de carbono. As bactérias metanogénicas usam hidrogênio como doador de eletrons e dióxido de carbono como acceptor de eletrons, utilizando a energia produzida na reação para suas biossínteses e demais trabalhos celulares, e eliminando o gás metano (4). Várias publicações fazem referência à presença de bactérias produtoras de hidrogênio nos biodigestores. Sejam anaeróbias estritas do gênero *Clostridium* (8), sejam anaeróbias facultativas da família *Enterobacteriaceae* (6). Com a intenção de melhorar o desempenho dos biodigestores reproduzindo as experiências acima referidas, foi empreendido o presente trabalho.

\* Trabalho financiado pela Companhia Auxiliar de Empresas Elétricas Brasileiras (CAEELB) através da Fundação Universitária José Bonifácio/UFRJ e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## Material e Métodos

**Fonte** - Lodo de um biodigestor modelo indiano (duas câmaras), com volume útil de 8,6 litros, operando com tempo de retenção de 10 dias, a temperatura de 35°C, com redução de 83% da DQO (Demanda Química de Oxigênio) inicial, e produzindo em média 6,7 litros de biogás por dia. A composição média do biogás foi determinada por cromatografia em fase gasosa em cromatógrafo "C/G 3537-5", com detector de condutividade térmica, coluna "Chromosorb 102", hidrogênio como gás de arraste, corrente de 1000mA, à velocidade de 40ml por minuto, e a temperatura de 37°C. Obteve-se em percentagem: metano 60; dióxido de carbono 30,25; nitrogênio 5,7; oxigênio 1,3; sulfeto de hidrogênio 1,1 e hidrogênio 0,024. A presença de nitrogênio e oxigênio é devida à entrada de ar durante a alimentação da coluna.

**Vinhoto** - De melaço de cana, proveniente de fermentação acetonobutilíca, cedido pela Usina Vitor Sence, em Conceição de Macabu, Estado do Rio de Janeiro. A sua composição média foi determinada, sendo em g/l: sólidos totais 12,0; sólidos voláteis 7,55; DQO 9,0; nitrogênio total 0,50; sulfato total 1,32; fósforo total (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) 0,08; potássio total (K<sub>2</sub>O) 2,05; acidez total (ác. acético) 1,22, alcalinidade (CaCO<sub>3</sub>) 1,46 e pH 4,95.

Para uso, foi decantado e esterilizado a 0,5 atmosfera por 15 minutos e conservado a 5°C em câmara frigorífica.

**Semente** - Esterco bovino.

**Isolamento** - As amostras foram coletadas das duas câmaras do biodigestor, diluídas convenientemente em soro fisiológico esterilizado, e plaqueadas pelo método do esgotamento de alça. A composição do meio foi em grama por litro de vinhoto: glicose 0,5; extrato de levedo 0,5; agar 20,0. Também empregou-se o meio seletivo EMB (Eosin Methylene Blue Agar - BBL Microbiology Systems). As placas foram incubadas a 37°C, em jarro de Brewer, por 24 a 48 horas. Os plaqueamentos foram repetidos até a obtenção de culturas puras, examinadas sob o aspecto macro e microscópico. A observação das culturas em lâmina foi feita pelo método de Gram (Kopellof - Beerman). As colônias puras em número de sessenta foram transferidas para tubos de meio com a seguinte composição em g/l de água destilada: extrato de carne 0,3; peptona 1,0; cloreto de sódio 0,5; agar 2,0; constituindo a cultura estoque. A seguir, foi verificada a capacidade de produzir gás em diversos meios, sendo escolhido como o melhor o meio cuja composição em g/l foi: glicose 7,5; sulfato de amônio 1,0; cloreto de sódio 1,0; fosfato bibásico de potássio 15,0; fosfato monobásico de potássio 10,0; agar 0,7; água destilada; pH 6,5-7,0. Distribuído em fermentômetros de Smith de 10ml, estes foram esterilizados a 1,0 atmosfera por 10 minutos. Foram obtidas 58 culturas produtoras de gás. Seguiram-se ensaios para selecionar as culturas efetivamente de hidrogênio, obtendo-se nove culturas isoladas entre as produtoras de gás. O gás produzido por cultura em tubos de ensaio vedados com folhas de borracha contendo 10ml deste meio, incubados por 24 horas a 37°C foi coletado com seringa e analisado em cromatógrafo de gás CG modelo 350, com detector de condutividade térmica em coluna de silica, corrente 70mA, sendo o nitrogênio o gás de arraste, à velocidade de 60ml por minuto, e a temperatura de 50°C. As culturas produtoras de hidrogênio foram caracterizadas bioquimicamente usando sistema API 20 (Analytical Products Inc., Plainview, N.Y.) e a identificação das espécies por consulta ao catálogo API computadorizado.

## Resultados e Discussão

Das culturas puras isoladas, 96,7% mostraram-se produtoras de gás, em anaerobiose. As espécies produtoras de hidrogênio responderam por 15,5% das culturas produtoras de gás isoladas nas condições descritas, todas pertencendo a família Enterobacteriaceae. Dentre estas, 90% das colônias foram identificadas como pertencendo à espécie *Citrobacter freundii*, e as demais à espécie *Enterobacter agglomerans*. Estes resultados concordam com os referidos pelos pesquisadores chineses (7). Nenhum

anaeróbio estrito foi isolado, observação já feita por Holmes & Freishel (3).

Na Tabela 1 estão os resultados da análise do gás produzido por ambas espécies.

Como pode ser observado, só CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> estão presentes em quantidades apreciáveis. A percentagem de hidrogênio produzido foi maior que a de CO<sub>2</sub> por ambas culturas, sendo *E. agglomerans* melhor produtora, nas condições estudadas.

A significação desses resultados não pode ser apropriadamente avaliada neste estágio da pesquisa. A população microbiana do biodigestor não foi determinada; o meio usado foi deliberadamente seletivo, pois o viñhoto da fermentação acetonobutílica contém formiato, acetato e butirato, não sendo total a transformação, destes ácidos no curso da fermentação (5). Assim sendo, pode-se admitir que houve seleção de flora capaz de utilizar aqueles ácidos para produzir hidrogênio e CO<sub>2</sub>.

São necessárias outras experiências com meios mais gerais, bem como a comparação com a contagem total de células, para estabelecer a proporção de espécies produtoras de hidrogênio no ecossistema do biodigestor.

Os resultados, no entanto, confirmam que as enterobactérias produtoras de hidrogênio têm papel importante no processo.

A espécie *Enterobacter agglomerans* embora melhor produtora de hidrogênio, segundo a Tabela 1, tem menor significação quantitativa que a espécie *Citrobacter freundii*. A predominância desta espécie em biodigestores anaeróbios produzindo metano ativamente, tem sido constantemente referida (3, 7). Embora a matéria prima contenha 1,3g/l de sulfato por litro, nenhuma espécie do gênero *Desulfovibrio* foi observada, o que é confirmado pela baixa concentração de gás sulfídrico no biogás (1).

Como quantidade de gás sulfídrico e hidrogênio livre no biogás produzido no biodigestor são insignificantes, admite-se que todo o hidrogênio formado foi transferido para o CO<sub>2</sub> pela flora metanogênica, com produção de energia para as células e liberação de metano.

#### Referências Bibliográficas

1. Abram, J.M. & Nedwell, D.B. - Inhibition of methanogenesis by sulphate reducing bacteria competing for transferred hydrogen. *Archives of Microbiology*, 117:93-97, 1978.
2. Biogas Technology and Utilization - Chengdu Seminar, Sichuan Provincial Office of Biogas Development, Doc. 243.7132, 1979.
3. Holmes, P. & Freishel, M.R. - H<sub>2</sub>-producing bacteria in digesting sewage sludge isolated on simple, defined media. *Applied and Environmental Microbiology*, 36:394-395, 1978.
4. Mah, R.A.; Ward, D.M.; Baresi, L. & Glass, T.L. - Biogenesis of methane. *Ann. Rev. Microbiol.*, 31:309-341, 1977.
5. Spivey, M.J. - The acetone-butanol fermentation. *Process Biochemistry*, 13:24-25, 1978.
6. Vos, P. De; Stevens, P. & De Ley, J. - Hydrogen gas production from formate and glucose by different members of the *Enterobacteriaceae*. *Biotechnology Letters*, 5:69-74, 1983.
7. Xe-xin, L.; Xu, J.Q.; Sun-Guo-Chao; Chang-Guang-Qian; Leo Duo Chum & Shao Ting-Chied - Studies on the hydrogens: producing bacteria of biogas fermentation. *Bioenergy Laboratory Report*, Chengde Institute of Biology, Academia Sinica, 1979.
8. Zajic, J.E.; Kosaric, N. & Brousseau, J.D. - Microbial production of hydrogen. *Adv. Biochem. Engineering*, 9:57-109, 1978.

Tabela 1 - Análise do gás produzido pelas espécies isoladas dos biodigestores.

Símbolos: Método de dosagem - cromatografia em fase gasosa; Meio de viñhoto - cultura de 24h a 35°C

Ensaios	Espécies		
	% H <sub>2</sub>	<i>E. agglomerans</i>	<i>C. freundii</i>
1	58,52	40,77	
2	58,95	40,87	
3	55,80	40,98	
Média	57,74%	40,87%	

## DESEMPENHO DE *ASPERGILLUS NIGER* A1 NA FERMENTAÇÃO CÍTRICA

Francisca Pessoa de França\*  
 Angela Christina Dias de Castro\*  
 & Selma Gomes Ferreira Leite

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

### Resumo

Foi verificada a influência de alguns constituintes do meio, pH e tratamento da matéria prima na fermentação cítrica desenvolvida por *Aspergillus niger* A1, linhagem isolada do vinhotto da cana de açúcar. Os coeficientes de rendimento dependem da concentração de sulfato de magnésio, dos valores de pH e foram praticamente constantes em diferentes teores de nitrato de amônio. A neutralização parcial do ácido cítrico, durante o processo, determinou aumento de produção, e o uso de sulfato de alumínio ou ferrocianeto de potássio, no preparo do meio de fermentação, levou à diminuição de rendimento.

### Summary

#### *Citric acid fermentation with Aspergillus niger A1*

The influence of several medium components, as well as that of the pH and of the raw material treatment, was studied for the citric acid fermentation carried out with *Aspergillus niger* A1; this strain was isolated from sugar cane stillage. The yield factor varied with magnesium sulphate concentration. Partial neutralisation of the citric acid during the fermentation process increased the yield; the use of aluminium or potassium ferrocyanide for medium preparation resulted in lower yields.

### Introdução

As exigências nutricionais de *Aspergillus niger*, para produção de ácido, dependem da linhagem e do processo de cultivo. Uma linhagem, em determinado meio, pode produzir ácido cítrico, no cultivo em superfície e não acumular o produto, quando o cultivo é submerso. No cultivo submerso, a fermentação depende, entre outros fatores, do desenvolvimento do micélio, em forma de oídios.

Influências dos constituintes do meio, na produção de ácido cítrico, têm sido estudadas (8, 11, 12, 13) e os trabalhos publicados mostram diferentes condições, para ótima produção. As variações são decorrentes de diferentes linhagens de *Aspergillus niger*, usadas por diversos pesquisadores.

\* Bolsistas do CNPq.

Altas concentrações de íons metálicos no meio afetam, negativamente, a fermentação. O modo de diminuir os teores de metais é pelo tratamento da matéria prima, com sulfato de alumínio (12), ou com resinas trocadoras de íons. Trumpy & Millis (13) estudaram o efeito de íons, como ferro, cobre e zinco, na fermentação desenvolvida pelo mutante *Aspergillus niger* 72-44 e verificaram maior tolerância a altas concentrações de íons metálicos que a amostra selvagem. Entretanto, a produção de ácido cítrico foi melhor, em baixa concentração de íons metálicos.

Este estudo é preliminar e relata a influência de alguns constituintes do meio, pH e tratamento da matéria prima, na fermentação cítrica, em escala de laboratório, desenvolvida por *Aspergillus niger* A1, linhagem isolada do vinhoto de cana de açúcar (2), em cultivo submerso.

## Material e Métodos

*Microrganismo* - *Aspergillus niger* A1, isolado de vinhoto de cana de açúcar e identificada no Departamento de Engenharia Bioquímica, da Escola de Química UFRJ (2).

*Condição dos experimentos* - Cultivo submerso, usando-se 100ml do meio de fermentação, em Erlenmeyer de 500ml, agitado a 150rpm, em agitador recíproco. O tempo de processo foi de 168 horas, a 25°C ± 2. Para cada parâmetro estudado, foram realizados no mínimo quatro experimentos.

*Inóculo* - Cada Erlenmeyer foi inoculado com  $10^3$  esporos/ml de meio, provenientes de cultivo em gelose Sabouraud a 25°C/7 dias.

*Meio de fermentação* - Meio básico, descrito por Prescott & Dunn (9), modificado: açúcar cristal  $100\text{g l}^{-1}$ , nitrato de amônio  $2,30\text{g l}^{-1}$ , sulfato de magnésio  $0,23\text{g l}^{-1}$  e fosfato monoácido de potássio  $1,00\text{g l}^{-1}$ .

*Influência das concentrações de nitrato de amônio e sulfato de magnésio* - As concentrações testadas foram  $0,5 - 1,0 - 2,0 - 3,0$  e  $4,0\text{g l}^{-1}$  de nitrato de amônio e  $0,10 - 0,20 - 0,30$  e  $0,40\text{g l}^{-1}$  de sulfato de magnésio. O valor inicial do pH do meio foi 7,0.

*Influência de pH inicial do meio de fermentação* - Foram testadas as variações do pH inicial:  $2,0 - 3,0 - 4,0 - 5,0 - 6,0$  e  $7,0$ , ajustadas com soluções de ácido clorídrico 2N ou hidróxido de sódio 2N e medidos em potenciômetro (Metrohn - Herison).

*Influência da adição de neutralizante* - Baseado em Karow & Waksman (6), foi experimentada a neutralização parcial do ácido, formado em intervalos de 40hs de processo. Usou-se como neutralizante solução a 20% de hidróxido de sódio e pH inicial 7,0.

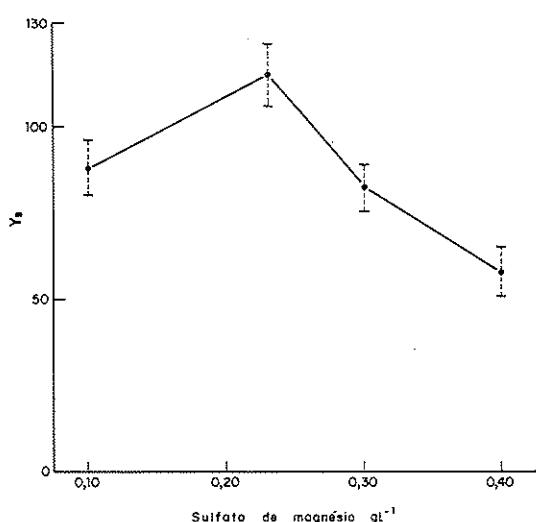
*Influência do uso de sulfato de alumínio e ferrocianeto de potássio no preparo do meio* - A matéria prima foi tratada com sulfato de alumínio (12): 1 litro de solução a 10% de açúcar foi adicionado de 2,5g de sulfato de alumínio e o pH acertado a 9,0, com solução de hidróxido de amônio; após separação do precipitado por filtração foram adicionados novamente 2,5g do sal e o pH foi acertado a 7,0. Após nova filtração, o filtrado final foi usado para preparo do meio de fermentação.

Com base em Gerhardt & col. (4), foi experimentado o meio de fermentação, adicionado de ferrocianeto de potássio - 0,5g para 1 litro de meio.

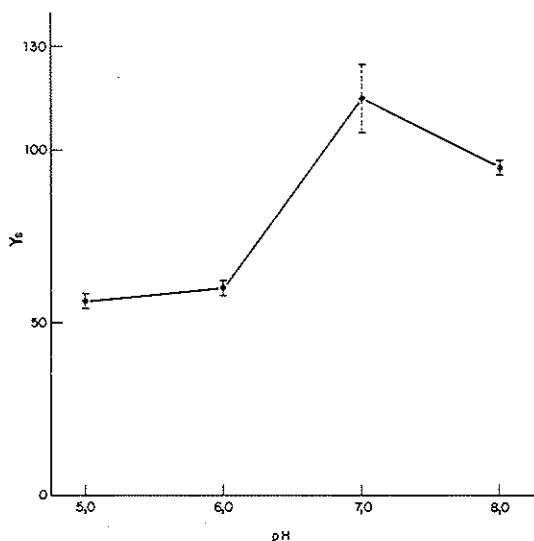
Nas duas condições experimentais o pH do meio foi acertado para 7,0.

*Determinação quantitativa* - O ácido cítrico foi determinado através da acidez, por titulação com solução de hidróxido de sódio 0,1N, para os experimentos onde se usou neutralização parcial; 1ml dessa solução é equivalente a 6,4mg de ácido cítrico. A comprovação de presença de ácido cítrico e determinações quantitativas, apresentadas, foram feitas pela reação de Furth-Hermann (3), usando-se o método de Saffran & Denstedt (10).

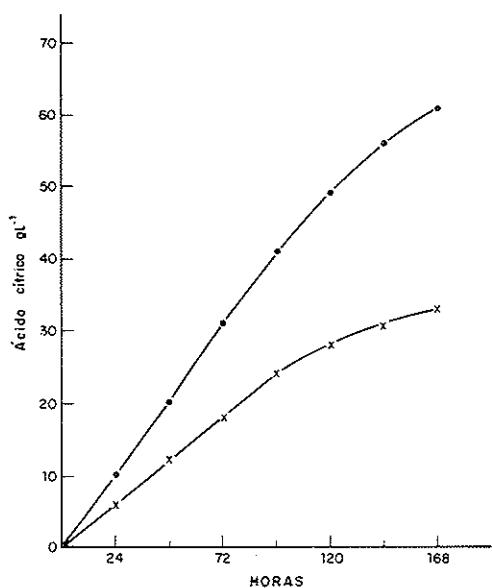
**Figura 1** – Coeficientes de rendimento ( $Y_s$ ) da fermentação cítrica por *Aspergillus niger* A1, em função da concentração inicial de sulfato de magnésio



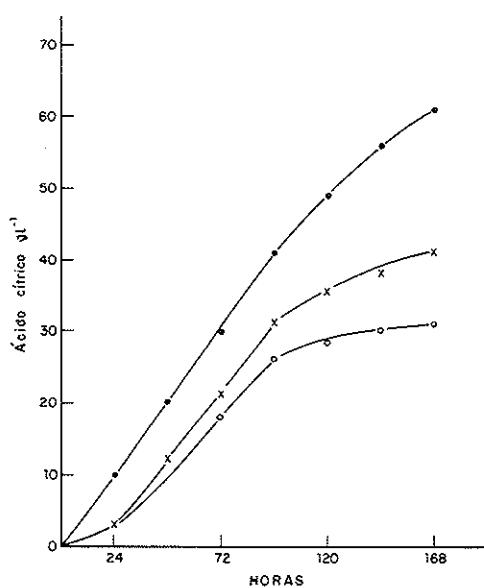
**Figura 2** – Coeficientes de rendimento ( $Y_s$ ) da fermentação cítrica por *Aspergillus niger* A1, em função do pH inicial



**Figura 3** – Influência da adição de neutralizante, na produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* A1  
Símbolos: ● = com neutralização; ✕ = sem neutralização



**Figura 4** – Influência da utilização de sulfato de alumínio e ferrocianeto de potássio na produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* A1.  
Símbolos: ● = sem tratamento; ✕ = com ferrocianeto de potássio; ○ = com sulfato de alumínio



O coeficiente de rendimento ( $Y_s$ ) foi determinado, relacionando-se peso do produto formado (expresso em g), por mol de sacarose inicial.

## Resultados e Discussão

A concentração do sulfato de magnésio, no meio de fermentação, teve influência significativa na produção de ácido cítrico. Nos valores testados, diferentes de  $0,25\text{g l}^{-1}$ , a formação do produto diminuiu (Fig. 1). Shu & Johnson (11) encontraram, como concentrações ideais, quantidades acima de  $0,25\text{g l}^{-1}$  de sulfato de magnésio e afirmaram que teores acima de  $2,0\text{g l}^{-1}$  não afetaram a eficiência da conversão. A linhagem *Aspergillus niger* A1 apresentou eficiência de conversão diminuída, quando o meio continha  $0,30\text{g l}^{-1}$  ou mais do composto.

Na faixa de concentração de  $0,5 - 4,0\text{g l}^{-1}$  de nitrato de amônio, considerando-se os desvios da média, não foram observadas variações na produção de ácido (Tabela 1). Shu & Johnson (11) enfatizam que a melhor fonte de nitrogênio é o nitrato de amônio e sugerem o uso de  $2,5\text{g l}^{-1}$  do composto. Banik (1) comprova este resultado, pois, encontrou como melhor concentração  $2,2\text{g l}^{-1}$ . Entretanto, Gupta, Heding & Jorgensen (5), quando usaram de zero a  $4,0\text{g l}^{-1}$  do composto, observaram que a formação de ácido foi aumentando, proporcionalmente, até a concentração de  $2,0\text{g l}^{-1}$  e, com  $2,4\text{g l}^{-1}$  ou mais, a concentração do produto diminuiu. Convém salientar que a variação no teor de produto formado observada pelos citados autores, foi de 0,2 a 0,4%, quando usaram de 1,00 a  $4,0\text{g l}^{-1}$  de nitrato de amônio.

Inicialmente, foram feitas experiências, variando-se o pH inicial do meio de fermentação sem controle desse parâmetro, durante o processo. Nos valores de pH baixos - 2,0, 3,0 e 4,0 não ocorreu formação do produto;  $Y_s$  máximo ocorreu quando o valor de pH foi 7,0 (Fig. 2). No processo de cultivo em superfície, a linhagem *Aspergillus niger* A1 comportou-se diferentemente, pois, em pH 4,0 apresentou conversão de substrato a ácido cítrico em torno de 50% e o máximo de conversão - 70%, que corresponde a  $Y_s$  de 239, deu-se em pH 6,0 (2).

Nos experimentos com neutralização do ácido cítrico formado, observou-se aumento de produção, em torno de  $28,0\text{g l}^{-1}$  (Fig. 3). Nestas condições, o fator de conversão foi  $61\% \pm 1,0$ , bem acima daqueles obtidos, sem neutralização do ácido, que foi  $33,4 \pm 2,8$ . Shu & Johnson (11), trabalhando também em cultivo submerso, conseguiram conversão em torno de 70%, na faixa de pH 3,3 - 4,2. Khan & Ghose (7), no estudo cinético da fermentação, obtiveram melhor conversão - 60%, quando usaram pH 6,5. Banik (1) encontrou, como valor ótimo, pH 3,5 detectando conversão de 46,6%. Nossos resultados comprovam o trabalho de Karow & Waksman (6), que verificaram efeito favorável, no processo quando usaram neutralização parcial do ácido, com carbonato de cálcio. Os autores, trabalhando com *Aspergillus wentii*, contendo  $150\text{g l}^{-1}$  de açúcar e pH de 3,0 - 3,5, sem neutralização, obtiveram 52,8g do ácido cítrico, o que corresponde a 35,2% de conversão; com neutralização parcial, conseguiram 56,8 - 71,3g do ácido, o que corresponde a conversão, em relação ao açúcar inicial, de 37,9% e 47,5%.

O uso de açúcar cristal, previamente tratado com sulfato de alumínio, determinou diminuição na produção de ácido cítrico (Fig. 4). A conversão, em relação ao açúcar adicionado, baixou de 60% para 41%, possivelmente, devido à retirada total de íons, como zinco e ferro, que são indesejáveis em altas concentrações, mas necessários em baixos teores. Shu & Johnson (12), usando o mesmo tratamento, para glicose, conseguiram resultados satisfatórios, obtendo conversão de 67%, após adições, ao meio, de  $0,3\text{mg l}^{-1}$  de ferro.

O uso de ferrocianeto de potássio diminuiu, também, a produção, obtendo-se conversão de 31% (Fig. 4). Este resultado comprova o trabalho de Banik (1), que também observou diminuição de produção após adição do composto no meio, conseguindo

**Tabela 1 - Coeficientes de rendimento ( $Y_s$ ) de fermentação cítrica por *Aspergillus niger* A1, em função da concentração inicial de nitrato de amônio.**

**Símbolos:** \* = desvio padrão da média

Nitrato de amônio ( $\text{g l}^{-1}$ )	$Y_s$		
	48hs	72hs	96hs
0,5	37,6	66,7	102,6 $\pm$ 8,5*
1,0	41,7	63,3	102,6 $\pm$ 7,2
2,3	42,4	83,1	114,2 $\pm$ 9,5
3,0	40,3	75,2	108,4 $\pm$ 6,8
4,0	40,3	71,5	105,1 $\pm$ 8,9

$20,8\text{gl}^{-1}$  de ácido cítrico, em mosto contendo  $150\text{gl}^{-1}$  de sacarose, portanto, conversão de 13,9% em relação ao substrato adicionado.

#### Referências Bibliográficas

1. Banik, A.K. - Fermentative production of citric by *Aspergillus niger*: strain selection and optimum cultural conditions for improved citric acid production. *J. Food Sci. Technol.*, 12:111-114, 1975.
2. França, F.P. de & Castro, A.C.D. - Seleção de linhagens de *Aspergillus niger* para produção de ácido cítrico. *Rev. Microbiol. (São Paulo)*, 13:225-230, 1982.
3. Furth, O. & Herrmann, H. - *Biochem. Z.*, 280-448, 1935.
4. Gerhardt, P.; Dorrel, W.W. & Baldwin, I.L. - Citric acid fermentation of beet molasses. *J. Bacteriol.*, 52:555-564, 1946.
5. Gupta, J.K.; Heding, L.G. & Jorgensen, O.B. - Effect of sugar, hidrogen ion concentration and ammonium nitrate on the formation of citric acid by *Aspergillus niger*. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 23:63-67, 1976.
6. Karow, E.O. & Waksman, S.A. - Production of citric acid in submerged culture. *Ind. Eng. Chem.*, 39, 7:821-825, 1947.
7. Khan, A.H. & Ghose, T.K. - Kinetics of citric acid fermentation by *Aspergillus niger*. *J. Ferment. Technol.*, 51:734-741, 1973.
8. Millis, N.F.; Trumy, N.F. & Palmer, B.M. - The effect of lipids on citric acid production by an *Aspergillus niger* mutant. *J. Gen. Microbiol.*, 30:365-379, 1963.
9. Prescott, S.C. & Dunn, C.G. - Industrial microbiology. 3.ed. McGraw-Hill Book, 1959.
10. Saffran, M. & Denstedt, O.F. - A rapid method for the determination of citric acid. *J. Biol. Chem.*, 175:849-855, 1948.
11. Shu, P. & Johnson, M.J. - Citric acid production by submerged fermentation with *Aspergillus niger*. *Ind. Eng. Chem.*, 40:1202-1205, 1948.
12. Shu, P. & Johnson, M.J. - The interdependence of medium constituents in citric acid production by submerged fermentation. *J. Bacteriol.*, 56:577-585, 1948.
13. Trumy, P.H. & Millis, N.F. - Nutritional requirements of an *Aspergillus niger* mutant for citric acid production. *J. Gen. Microbiol.*, 30:381-393, 1963.

## EVALUATION OF THE FECAL COLIFORMS/FECAL STREPTOCOCCI RATIO IN THE CHARACTERIZATION OF FECAL POLLUTION IN A SUBTROPICAL RIVER

Maria Therezinha Martins

Maria Neusa Alves

Petra Sanchez Sanchez

& Maria Inês Zanolí Sato

CETESB

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

### Summary

In a study to determine the bacteriological quality of the Atibaia River, in São Paulo, Brazil, carried out during the period from August 1977 to July 1978, the fecal coliforms/fecal streptococci ratio (FC/FS) was used to characterize the origin of fecal pollution. Quantitative determination of fecal coliforms and fecal streptococci was done using the multiple tube technique, in accordance with the description of Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 14th ed. The application of the FC/FS ratio allowed to characterize the origin of fecal contamination as predominantly human, however it was verified the possible influence of dumping industrial effluents and of the distance of sewage dumpings in the characterization of the fecal origin in certain locations in the river.

### Resumo

*Avaliação da relação coliformes fecais/estreptococos fecais na caracterização da poluição fecal em um rio subtropical*

Em um estudo para determinação da qualidade bacteriológica do Rio Atibaia, São Paulo, Brasil, desenvolvido durante o período de agosto de 1977 a julho de 1978, foi utilizada a relação coliformes fecais/estreptococos fecais (CF/EF), para a caracterização da origem da poluição fecal. A determinação quantitativa de coliformes fecais e estreptococos fecais foi efetuada pela técnica de tubos múltiplos, segundo descrição no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 14<sup>a</sup> ed. A aplicação da relação CF/EF permitiu caracterizar como sendo predominantemente humana a origem da contaminação fecal ao longo do rio, embora se tenha verificado a possível influência de lançamentos de efluentes industriais e da distância dos lançamentos de esgoto na caracterização da origem da poluição fecal em alguns pontos do rio.

### Introduction

In recent years, the use of total coliforms as bacteriological indicators of

Rev. Microbiol., São Paulo, 15(2):94-102, Abr./Jun. 1984.

fecal contamination in non-treated water was questioned (3) and there has been increasing interest in fecal coliforms (FC) and fecal streptococci (FS) as more reliable indicators in contaminated waters (5, 6, 8, 9). These two groups of indicators are particularly interesting when applied together, for the ratio between the density of these bacteria supplies information as to the origin of fecal pollution (5, 7, 8, 9).

The use of the FC/FS ratio has been suggested as an useful procedure to differentiate human fecal pollution from non human fecal pollution (5, 8, 9). It is based on the fact that the two groups of indicators occur in different proportions in human feces and in other animal feces. Therefore, values above 4 for the FC/FS ratio usually indicate human contamination whereas values below 0.7 indicate a non-human origin of fecal contamination (5, 8, 9).

Studying the meaning of the FC/FS ratio, Kenner (11) mentions the influence of culture media used to detect such indicator bacteria, as well as the influence of environmental factors. Likewise, Wheater & col. (15) found that procedures and culture media used in the United Kingdom tended to produce higher FC/FS ratios for human, swine, chicken, and seagul feces than the techniques and procedures proposed by American standard methods.

The period of survival of fecal coliforms (FC) and fecal streptococci (FS) in aquatic environment is another factor to be taken into account for the application of the FC/FS ratio when one determines the origin of fecal pollution in water bodies. Based on this factor, Geldreich & Kenner (9) recommended that the FC/FS ratio be applied only within the first 24 hours after bacteria are discharged into the waterflow. However, Feachem (4) mentions that is not always possible to assess the age of pollution in the receiving body, and even with the availability of such information, the time between excretion and discharge into the receiving waters may be uncertain. In a study comparing the period of survival of indicator bacteria and enteric pathogens in water environments, McFeters & col. (13) reported the rate of survival of enterococci as higher than that of fecal coliforms, and that the latter have a higher rate of survival than *S. bovis* and *S. equinus*. Feachem (4) mentions that even with varying FC and FS rates of survival, it is possible to interpret such ratios. Consideration should be given to the tendency of high FC/FS ratios (above 4) to decrease while ratios of fecal contamination from other warm blooded animals (less than 0,7) to increase.

The purpose of this study was to assessss the application of FC/FS ratio in the determination of the origin of animal or human fecal pollution in a subtropical river (Atibaia River, São Paulo State, Brazil).

The Atibaia is a tributary stream that discharges into the Piracicaba River which in turn is a tributary of the Tiete River. The Atibaia River (Figure 1) is located in the area of higher Paraná River basin and flows almost totally along the slopes of the Western Mantiqueira Mountains, draining a water shed that covers an area of 2,724km<sup>2</sup>. Climatic conditions of the upper portion of the river are mild with rainy periods and cool summers. The other portions of the river basin are more arid, being dry in the winter and hot in the summer.

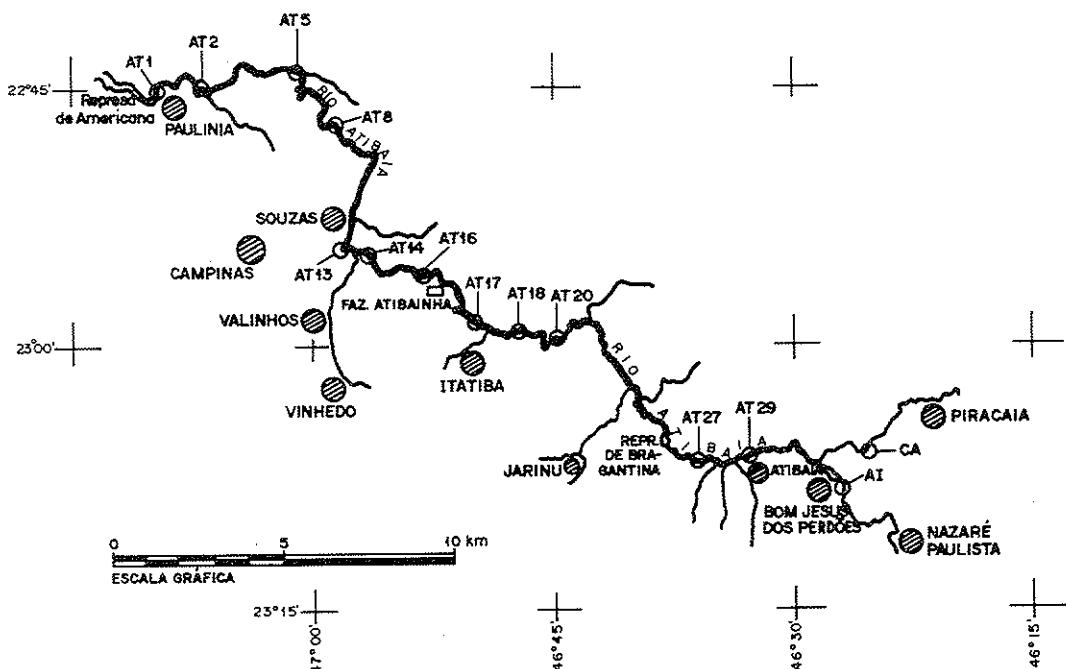
## **Material and Methods**

*Sample and sampling* - From August 1977 to July 1978, 2,864 samples were examined, collected from 12 different stations in the section of the Atibaia River, noted in Figure 1. Each sampling was done twice a month with 10 samples per station, with an interval of one hour between each sample (from 8a.m. to 5p.m.).

Samples were collected according to specifications of APHA Standard Methods 14th edition (1975) and their transportation to the laboratory was done under refrigeration. The period of time between the collection of samples and the beginning of tests did not exceed 8 hours.

*Method of analysis* - Determination of fecal coliforms and fecal streptococci was done using the multiple tube technique, according to APHA Standard Methods, 14th edition (1975).

Figure 1 - Atibaia River: sampling stations



The criterion used to determine the origin of fecal contamination through the FC/FS ratio is presented in Table 1.

Table 1 - Percentage of samples from each station as a function of  $\frac{FC}{FS}$  ratio values

$\frac{FC}{FS}$ Ratio values	% of samples											
	29	27	20	18	17	16	14	13	8	5	2	1
$\frac{FC}{FS} \geq 4$ (human dejects)	27.2	31.7	12.5	19.6	21.7	21.2	31.7	71.6	68.2	59.5	81.9	74.2
$4 > \frac{FC}{FS} > 2$ (predominance of human dejects in mixed pollution)	17.7	23.5	15.5	19.2	25.1	27.5	26.7	9.4	15.9	12.1	9.3	12.9
$2 \geq \frac{FC}{FS} \geq 1$ (uncertain interpretation)	28.6	27.7	26.0	29.6	25.1	24.6	24.7	13.2	11.7	15.8	5.4	5.4
$1 > \frac{FC}{FS} > 0.7$ (predominance of animal dejects in mixed pollution)	5.4	3.3	7.5	5.0	8.0	4.6	5.0	1.7	1.7	3.3	0.0	0.8
$\frac{FC}{FS} \leq 0.7$ (house pet and bird dejects)	21.1	13.7	38.5	26.7	20.1	22.1	11.7	4.2	2.5	9.2	3.3	6.7

## Results

Results obtained in the study are presented in Table 1 with the percentages of samples from each station as a function of the FC/FS ratio values determined as a criterion for application of the ratio.

Some of the features of the sampling stations and the level of fecal pollution in each of them, indicated by the geometric mean (geometrical mean of twenty monthly samples) of densities of fecal streptococci (FS) and fecal coliforms (FC) obtained during the year covered by the study, are presented afterwards:

- a. AT-29 - Wastes brought by Atibaia River, high speed flow, stony bottom; low output: (FS)  $3.8 \times 10^2 - 6.7 \times 10^3$ ; (FC)  $9.5 \times 10^2 - 1.1 \times 10^4$
- b. AT-27 - Sewage from the City of Atibaia and industrial wastes; very low flow due to the close Bragantina reservoir; marked change in the type of sludgy substrate: (FS)  $1.7 \times 10^3 - 1.4 \times 10^4$ ; (FC)  $5.1 \times 10^3 - 2.1 \times 10^4$
- c. AT-20 - Aeration of water after the dam; deposition of suspended materials and beginning of mineralization, absence of urban wastes: (FS)  $3.8 \times 10^2 - 8.5 \times 10^3$ ; (FC)  $3.1 \times 10^2 - 8.8 \times 10^3$
- d. AT-18 - Absence of polluting wastes: (FS)  $1.7 \times 10^2 - 1.4 \times 10^4$ ; (FC)  $7.0 \times 10^2 - 1.2 \times 10^4$
- e. AT-17 - Presence of bank vegetation; high speed flow; dumping of industrial wastes, increase in the content of organic matter due to the entry of Itatiba sewage dumping brought by Jacarezinho River: (FS)  $3.0 \times 10^3 - 1.3 \times 10^4$ ; (FC)  $6.6 \times 10^3 - 1.7 \times 10^4$
- f. AT-16 - Large quantity of aquatic plants, absence of polluting wastes, slower speed flow causing the permanence of decaying organic matter in same site for a long period of time; flow speed is apparently high, but this part, in fact, is almost non-flowing, probably due to its closeness to Salto Grande Dam, located some 800m after this station: (FS)  $1.9 \times 10^3 - 1.8 \times 10^4$ ; (FC)  $4.8 \times 10^3 - 2.5 \times 10^4$
- g. AT-14 - Aeration of the water, after the Salto Grande Dam, marked change to a stony substrate, absence of polluting waters: (FS)  $1.1 \times 10^3 - 5.6 \times 10^3$ ; (FC)  $2.5 \times 10^3 - 6.0 \times 10^4$
- h. AT-13 - Sewage dumping from the cities of Valinhos and Vinhedo; industrial wastes; limestone extraction; close to station 14: (FS)  $1.9 \times 10^3 - 6.1 \times 10^4$ ; (FC)  $1.4 \times 10^4 - 2.8 \times 10^5$
- i. AT-08 - Aeration brought about the different water levels and its turbulence; dumping of industrial wastes and of sewage from the city of Souzas; (FS)  $5.7 \times 10^2 - 6.6 \times 10^4$ ; (FC)  $3.1 \times 10^3 - 4.4 \times 10^5$
- j. AT-05 - Intense sand extraction activity upstream; sewage dumping quite close to sampling station; absence of industrial wastes: (FS)  $2.6 \times 10^2 - 3.1 \times 10^3$ ; (FC)  $3.8 \times 10^2 - 4.3 \times 10^5$
- k. AT-02 - Industrial wastes; sewage from the city of Campinas; high speed flow; largest waste contribution of Atibaia River; large variations of dissolved oxygen: (FS)  $6.0 \times 10^3 - 8.7 \times 10^4$ ; (FC)  $1.3 \times 10^5 - 2.1 \times 10^6$
- l. AT-01 - Close to station 2; industrial wastes; maximum value to water output; large variations in dissolved oxygen content; slower speed flow: (FS)  $6.4 \times 10^3 - 4.5 \times 10^4$ ; (FC)  $3.5 \times 10^3 - 6.7 \times 10^7$

For a better understanding of the results obtained, they will be presented considering the sequence of the sampling stations downstream.

*AT-29 Station* - Above sampling station AT-29 on the Atibaia River, the water is polluted with municipal wastes from the cities Piracaia, Nazaré Paulista and Bom Jesus dos Perdões, resulting in a total pollution loading estimated in 353kg BOD per day. Considering the long distance between such dumpings (39.5km, 37.0km, and 19.5km, respectively), the consequent change of FC/FS ratio values is shown, by the results obtained, to be due to different periods of water survival of the groups of indicators used. Therefore, FC/FS ratio values equal or above 4 were obtained in only 27.2% of the samples analyzed. However, we can consider that the predominance of human fecal contamination still is reflected in the results obtained, as 44.9%

of the samples showed ratio values above 2.

*AT-27 Station* - FC/FS ratio values of 55.2% of the samples indicated the predominance of human fecal contamination, and 31.7% of the same samples showed values equal or above 4. We may consider such data as characterizing the predominant origin of fecal contamination in the area, since, some 7km upstream, domestic sewage from the city of Atibaia is dumped with an urban polluting load of 1015kg BOD/day. This station also receives water from textile and metallurgy industrial operations plus food processing and meat packing. The total pollution loading was estimated in approximately 232kg BOD/day. The fact that a higher percentage was not obtained from samples with values indicating human fecal contamination is possibly due to the chemical and physical characteristics of these effluents (wastes) such as pH, heavy metals nutrients, etc., and their mediating effects on the persistence of the two indicator groups.

*AT-20 Station* - The larger percentage of samples analysed provided FC/FS ratio values below 1, and reflects the change in the origins of fecal wastes in these waters.

Results obtained are consistent with agricultural and cattle raising activities along this stretch of the river.

*AT-18 Station* - If we analyze the results obtained for this station separately, we will see that it is impossible to characterize the origin of fecal contamination, since FC/FS ratio values did not show a predominance to indicate a contamination of human or animal origin (FC/FS > 2: 38.8%; FC/FS < 1: 31.7%). However, the comparative analyses of the results of this station and those of the prior station (AT-20), in which the main source of fecal contamination was shown to be animal, shows an increase in FC/FS ratio values, which is expected in the cases of animal fecal contamination, as the predominating species of fecal streptococci in non-human feces (*S. bovis* and *S. equinus*) are less resistant than the fecal coliforms. Thus we can take such data as supporting those of station AT-20, and they are consistent with the characteristics of station AT-18 where agricultural and cattle raising activities predominate and where there is no discharge of domestic sewage.

*AT-17 Station* - From the Jacarezinho River, upstream, it receives a polluting load estimated as 2,420kg of BOD per day, due to the dumping of the public sewage (1,380kg BOD/day) and industrial waste (mainly textile and poultry). Data obtained relative to the application of the FC/FS ratio allow to characterize the fecal contamination as predominantly of human origin, for 46.8% of samples analyzed produced ratio values above 2. However, values above 4 were seen in only 21.7% of the samples and this seems to indicate the action of industrial wastes, specially on the fecal coliform population.

*AT-16 Station* - Results relative to this station are practically equivalent to the previous station (AT-17), approximately 9km far from AT-16, and a slight increase of FC/FS ratio values were seen. The area of this station is basically used as animal pasture land, and the results obtained (48.7% of the samples with values indicating a predominance of human contamination) are not consistent with the activities carried out in the area. The river is quite deep and wide in this area, with a low flow velocity and a low dissolved oxygen content. Such factors are due to the presence of the Salto Grande dam, nearly 800m downstream. Probably, the decreased flow causes settling of much turbidity and associated bacteria. However, warm water temperature and nutrient discharges in food processing, raw sewage and textile wastes may cause some regrowth of elevated temperature *Klebsiella pneumoniae* strains. This condition would distort FC/FS ratios and the interpretation of the fecal origin of these microbial contaminants.

*AT-14 Station* - 10.5km far from the previous station (AT-16), and similar to it, this station is located in an area dedicated to animal pasture land with no dumping

of polluting loads upstream. Nearly 10km upstream, there is the Salto Grande dam, with a level difference of about 60m. Although the speed of flow is not very high, the water going through the dam is very much aerated, high contents of dissolved oxygen having been found at the sampling station (mean monthly values oscillating between 7.6 and 9.3mg/l) (2). The FC/FS ratio shows the predominance of values indicating the predominance of human fecal contamination (58.4% of the samples with FC/FS above 2). Such values are not consistent with the characteristics of the area, as there is no sewage dumping upstream and cattle raising activities predominate.

*AT-13 Station* - About 1.8km upstream, it receives the waters of Ribeirão Pinheiro, where the sewages of the cities of Valinhos and Vinhedo are dumped, with a polluting load of 1,675kg BOD/day (2). The distances from the sites of dumping to the sampling station are approximately 8 and 18km, respectively. Application of the FC/FS ratio showed a predominance of human fecal contamination, values above 2 being obtained in 81% of analyzed samples, 71.6% of which produced values equal or above 4.

The comparative analysis of these results to those of station AT-17 is worthy of mention, for although the latter receives an approximately equivalent load of household sewage, and in equivalent distances, it produced percentages significantly lower of values indicating human fecal contamination. Taking into account those industrial wastes dumped upstream of station AT-13, we can see that wastes of paper industry are included among total wastes dumped. Literature (10) shows the capacity of *Klebsiella* multiplication in this type of industrial effluent. As these bacteria can be detected in the fecal coliform test, they may have had some influence upon those values above 4 seen in a high percent of samples from this station. Data obtained by Scrofernecker (14) in a study parallel to the present study, show that station 13 is among those which presented higher densities of *Klebsiella*.

*AT-8 Station* - It is located approximately 20km from the previous station (AT-13) and upstream it receives the sewage of the city of Souzas, and the wastes of chemical plants, paper plants, and a slaughterhouse with sporadic activities. Application of the FC/FS ratio produced results showing the predominance of human fecal contamination with values above 2 in 84.1% of the samples, 68.2% of which showed values equal or above 4.

*AT-5 Station* - FC/FS ratio values indicate the predominance of human fecal contamination, as a monthly percentage of samples varying from 15% to 89% and reaching 100% in March 1978 showed values above 4 for the ratio between the density of such indicators. This can be explained by the dumping of household sewage of a small village of nearly 1,000 inhabitants into a creek that reaches Atibaia River approximately 10m upstream of the sampling station.

*AT-2 Station* - In this station, we could observe the predominance of human fecal contamination throughout the period of study. This was expected because through the Ribeirão Anhumas, a tributary of the Atibaia River, the latter receives, upstream of this station, the sewage of the city of Campinas, with 451,391 inhabitants residing in the area drained by the Atibaia River basin, with 18,281kg BOD/day of urban polluting load (2). Values obtained indicate a predominance of human fecal contamination in 91.2% of the samples, of which 81.9% showed values above 4. Between the site of the previous station and the present one, the river also receives several industrial wastes of chemical plants, an oil refinery and a pesticide plant. The months of May and June witnessed a relatively high percentage of samples that did not define as origin for fecal contamination ( $2 \geq FC/FS \geq 1$ ), which possibly reflects a more marked action of industrial effluents during the period. The same period corresponded to the lowest values of output of the river (2) possibly determining a higher concentration of such industrial wastes.

AT-1 Station - FC/FS showed a predominance of human fecal contamination and such results are consistent with the characteristics of the area, as this station is only 4.5km far from station AT-2, where human fecal contamination had the highest indices of the entire river. Therefore, these results still reflect the contamination introduced by the sewage of the city of Campinas.

## Discussion

By and large, it was possible to characterize the predominant origin of fecal contamination in the Atibaia River through the application of the FC/FS ratio. A predominance of human fecal contamination was observed along the river with the exception of a few sites. In station 20, there was a decrease of FC/FS ratio values as compared to stations upstream, results characterizing a predominance of animal fecal contamination. As stated by Feachem (4), regarding the interpretation of data obtained by Lin & col. (12) in the evaluation of the Spoon River water quality, decreasing values observed in their study would be more accurately interpreted not as an evidence of the variation from human contamination towards animal contamination, but rather as a consequence of the lesser resistance of fecal coliforms in the aquatic environment. In the present study, however, the characterization of the area, showing its almost essentially agricultural and cattle raising activities, and the non-dumping of sewage in this portion of the river, allows us to consider these results as indicating a predominance of animal fecal contamination. In addition, such characterization is supported by the data obtained in station AT-18.

Results obtained in the portion of Atibaia River between sampling station AT-16 and AT-14 are deserving of further analysis because they showed a relative increase of FC/FS ratio values in areas of agricultural and cattle raising activity, in the absence of polluting dejects. There is a predominance of animal pasture land in the area and one can consider that the high proportion of *S. bovis* and *S. equinus* in their feces, together with the low rate of survival of such species in aquatic environment, is responsible for such relative rise in FC/FS ratio values. Mc Peters & col. (13) found similar results, with 0.25 values for the FC/FS ratio in bovine fecal material at the begining of the experiment, and an increase of such value to 2, after 4 days of water exposure. Another factor to be taken into account concerning the results found in this portion of the river is related to the culture medium used to quantify fecal streptococci. According to information produced by Kenner (11) most strains of *S. bovis* and *S. equinus* do not grow in ethyl violet azide broth, thus suggesting the nutrient deficiency of such medium and/or the toxicity of ethyl violet dye for these species. Therefore, the combination of the three factors (the possible predominance of *S. bovis* and *S. equinus*, their low rate of survival, and the difficulty to recover these species through the culture medium used) seems to justify the relative rise of FC/FS ratio values seen at this portion of the river. Such considerations may also extend to the results of station AT-18.

## Conclusion

Data obtained show, in a general fashion, that when the predominant origin of fecal contamination is human, it is possible to characterize it applying the FC/FS ratio, provided that the interpretation considers not only values above 4, normally observed in human feces, but also a broader range (FC/FS above 2) which includes a variation margin, considering the gradual decrease that occur in the ratio due to a lesser resistance of fecal coliforms in aquatic environments, according to data obtained by Mc Peters & col. (13). When they interpreted the results of the application of FC/FS ratio in the Spoon River, Lin & col. (12) also based their considerations on results above 2 as an indication of predominantly human fecal contamination. In the interpretation of the data collected in some of the stations there is a possible influence of two factors in the alteration of densities of

indicator groups, and consequently, of the FC/FS ratio values: the dumping of industrial wastes and the distance between the sites of dumping of dejects and the sampling station. Such observations support prior conclusions by Geldreich & Kenner (9) that the FC/FS ratio is only valid during the 24 hour period immediately following the discharge of bacteria in the receiving body.

As regards the results obtained in those sampling stations in which, in view of the characteristics of the activities carried out in the area, fecal contamination must be predominantly animal in origin, with the exception of station AT-20, results did not allow for a characterization through a separate analysis of results of each station. Pursuant to data obtained by Mc Feters & col. (13) and stressed by Feachem (4), in the cases of animal (non-human) fecal contamination, FC/FS ratio, values tend to increase as a function of time of exposure to an aquatic environment, in view of the low rate of survival of *S. bovis* and *S. equinus* which correspond to a relatively high percentage of the fecal streptococci population in the feces of several animals (7). Bearing this in mind, and adding the difficulty to recover *S. bovis* and *S. equinus* by means of the culture medium used, it was possible to understand the results obtained in some of the station where increased FC/FS ratio values were observed in the absence of household sewage dumpings.

We may conclude from this study that the application of the FC/FS ratio may be useful in the characterization of the origin of fecal contamination in subtropical, fresh waters. Interpretation of results must recognize the environmental factors that affect any constant density relationship between fecal coliform and fecal streptococci indicator systems.

#### References

1. APHA - Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 14.ed. Washington, D.C., American Public Health Association, 1975.
2. CETESB - Projeto Piloto do Rio Atibaia. São Paulo, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, 1979.
3. Dutka, B.J. - Coliforms are an inadequate index of water quality. *J. Environ. Hlth.*, 36:39-46, 1973.
4. Feachem, R. - An improved role for faecal coliform to faecal streptococci ratios in the differentiation between human and non-human pollution sources. *Water Res.*, 9:689-690, 1975.
5. Geldreich, E.E. - Applying bacteriological parameters to recreational water quality. *J. Am. Wat. Wks. Ass.*, 62:113-120, 1970.
6. Geldreich, E.E. - Fecal coliform and fecal streptococci density relationship in waste discharges and receiving waters. *CRC Critical Rev. Environ. Control*, 6:349-369, 1976.
7. Geldreich, E.E. - Sanitary significance of faecal coliforms in the environment. *Wat. Pollut. Control Res. Serv. Publ. No. WP-20-3*, U.S. Department of the Interior, 122p., 1966.
8. Geldreich, E.E.; Best, L.C.; Kenner, B.A. & Van Donsel, D.J. - The bacteriological aspects of stormwater pollution. *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, 40:1861-1872, 1968.
9. Geldreich, E.E. & Kenner, B.A. - Concepts of faecal streptococci in stream pollution. *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, 41:R336-R352, 1969.
10. Huntley, B.E.; Jones, A.C. & Cabelli, V.J. - *Klebsiella* densities in waters receiving wood pulp effluents. *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, 48:1766-1771, 1976.
11. Kenner, B.A. - Fecal streptococci indicators. In: - Berg, G., ed. - *Indicators of viruses in water and food*. Ann Arbor, MI, Science, p.147-169, 1978.
12. Lin, S.; Evans, R.L. & Beuscher, D.B. - Bacteriological assessment of Spoon River water quality. *Appl. Microbiol.*, 28:288-297, 1974.
13. Mc Feters, G.A.; Bissonnette, G.K.; Jezeski, J.J.; Thomson, C.A. & Stuart, D.G. - Comparative survival of indicator bacteria and enteric pathogens in well waters. *Appl. Microbiol.*, 27:823-829, 1974.

14. Scrofernecker, M.L. - Contribuição ao estudo de bactérias do gênero *Klebsiella* em águas do Rio Atibaia, Estado de São Paulo. São Paulo, Universidade de São Paulo, 1979. (M.S. Thesis).
15. Wheater, D.W.F.; Mara, D.D. & Oragui, J. - Indicator systems to distinguish sewage from stormwater runoff and human from animal faecal material. Proceedings of a Symposium on Biological Indicators of Water Quality, Univ. of Newcastle upon Tyne, vol.2, p.21.1-21.26, 1978.

## INFORMAÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA SBM

Cold Spring Harbor Laboratories - Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology: organization of the cytoplasm. New York, vol.46, 1024p., 1982. US\$156.00.

Desde 1983 foram realizados anualmente (com interregnos em 1943-1945) 46 simpósios, no Cold Spring Harbor Laboratory, cobrindo virtualmente todas as áreas de estudo da fisiologia celular, notadamente a da genética.

O simpósio publicado em 1982, organizado por J.D. Watson e G. Albrecht-Buehler e trata da organização do citoplasma. Os 93 trabalhos tiveram a seguinte distribuição no volume I: Princípios de organização: ordem funcional e espacial no citoplasma (3 trabalhos); Princípios de organização: água e a arquitetura citoplasmática (4); Fluxo citoplasmático e axonal (9); Elementos de organização: microtúbulos (12); Elementos de organização: filamentos intermediários (15); e no volume II: Elementos de organização: microfilamentos (13); Superfície celular: organização superficial (7); Superfície celular: clatrina (7); Superfície celular: síntese, exocitose e endocitose (6); Superfície celular: microvilos (4); Mecanismos de organização: regulação do cálcio e fosforilação de componentes citoplasmáticos (7); Núcleo e citoplasma (5); Sumário, Organização do citoplasma.

Os trabalhos apresentados representam valioso repositório de informações novas para estudiosos de setores específicos de fisiologia celular, para os envolvidos na organização de cursos, bem como os estudantes de pós-graduação. Constituem ainda, fonte utilíssima para análise e meditação sobre as estratégias que vêm sendo utilizadas nos últimos anos nos Estados Unidos, para se estudar os mecanismos que integram e participam tanto da motilidade celular, como aqueles que garantem a estabilidade estrutural das células.

Faremos referência especial aos seguintes artigos:

1. Allen, R.D.; Travis, J.L. & col. - Cytoplasmic transport: moving ultrastructural elements common to many cell types revealed by video-enhanced microscopy.

Os autores mencionam o estudo em células cultivadas de deslocamento citoplasmático de partículas com dimensões da ordem de 20nm através de microscopia de contraste interferencial diferencial amplificado por vídeo (video-enhanced-contrast-differential-interference-contrast (AVEC-DIC) microscopy (Allen & col. - Cell Motil., 1:291, 1981). Usando este método há suficiente contraste em imagens de contraste interferencial diferencial para detectar microtúbulos, que têm 25nm de diâmetro, tanto *in vitro* como em algumas células. Como resultado da sensibilidade dos métodos AVEC, partículas da ordem de 20nm são visíveis em células vivas.

2. De Brabander, M. & col. - Microtubule stability and assembly of living cells: the significance of metabolic inhibitors, taxol and pH. Vol.1, p.227-240.

Os certos aspectos da dinâmica dos centros organizadores de microtúbulos ("MTOCs, microtubule organizing centers") são analisados notadamente alguns dos mecanismos que a célula pode utilizar para agregar e estabilizar conjuntos específicos de microtúbulos.

3. Brenner, S.L. & Brinkley, B.R. - Tubulin assembly sites and the organization of microtubule arrays in mammalian cells. Vol.1, p.241-253.

Técnicas de imunofluorescência foram utilizadas para localizar centros organizadores de microtúbulos ("MTOCs") nativos e induzidos e para sugerir sua replicação, maturação e distribuição no citoplasma de células cultivadas. Concluiram que o centrosomo (centríolos e material pericentriolar) constitui o "MTOC" primário das células interfásicas e tem papel de destaque na organização do citoplasma. Estas organelas servem de moldes ("templates") para a iniciação e agregação de conjuntos específicos de microtúbulos.

4. Satir, P. - Approaches to potential sliding mechanisms of cytoplasmic microtubules. Vol.1, p.285-292.

Satir discute evidências indicativas, que em certos casos os microtúbulos citoplasmáticos movem-se e movimentam componentes celulares vizinhos, através de mecanismos semelhantes aos deslizamentos dos microtúbulos dos axonemas dos cílios. O

deslizamento ativo seria provido por braços de dineína.

Merece destaque a sequência de artigos do volume 1, que trata dos filamentos intermediários.

Os filamentos intermediários têm diâmetro característico de 10nm, entre os dos microfilamentos de actina (6nm) e aqueles dos filamentos de miosina (15nm) e dos microtúbulos (25nm). Estudos imunológicos e bioquímicos mostram que os filamentos intermediários (FIs) são compostos por subunidades heterogêneas. São descritas 5 categorias maiores de FIs: (1) queratina (tonofilamentos) encontrados em células epiteliais e de origem epitelial; (2) neurofilamentos encontrados em neurônios; (3) filamentos gliais, encontrados em células gliais e de origem glial; (4) filamentos de desmina, encontrados em células musculares ao nível do disco 2; e (5) filamentos de vimentina, que são os de maior distribuição.

5. Ramaekers, F.C.S. & col. - Use of antibodies to intermediate filaments in the characterization of human tumors. Vol.1, p.331-339.

Usando técnicas imunofluorescentes com antisoros para queratina e vimentina, mostraram a utilidade desses antisoros para o diagnóstico diferencial de tumores malignos epiteliais (carcinomas) e derivados do mesenquima (sarcomas). Por exemplo, em um tumor misto do útero, distinguiram-se elementos carcinomatosos (queratina positivos e vimentina negativos) e sarcomatosos (vimentina positivos e queratina negativos).

6. Lazarides, E. & col. - Desmin and vimentin containing filaments and their role in the assembly of the Z disk in muscle cells. Vol.1, p.351-378.

Os autores definiram, em músculos de aves, uma região do disco Z com constituição molecular característica. Além disso, demonstraram a existência de uma trama de citoesqueleto responsável pela integração lateral de miofilamentos e possivelmente de outras organelas na altura do disco Z. Os componentes moleculares mais importantes dessa matriz de integração são as subunidades de desmina e vimentina dos filamentos intermediários de 10nm de espessura.

7. Small, J.V.; Rinnerthaler, G. & Hinssen, H. - Organization of actin meshworks in cultured cells: the leading edge. Vol.1, p.599-611.

Trata da organização de um compartimento do cito-esqueleto formado por uma malha de filamentos de actina e de feixes desses filamentos na periferia, normalmente convexa, de células cultivadas e que recebeu o nome de "leading edge".

8. Pollard, H.B. & col. - Calcium dependent regulation of chromaffin granule movement, membrane contact, and fusion during exocytosis. Vol.2, p.819-834.

Os seguintes tópicos são discutidos (1) a interação específica da actina com as membranas dos grânulos cromafins; (2) a associação específica das membranas dos grânulos cromafins entre si e com a membrana plasmática mediada por uma nova proteína a sinexina; (3) a fusão de membranas de grânulos justapostas umas às outras pela sinexina; e (4) a energética da secreção. Todos os eventos mediados pela sinexina dependem da concentração do íon cálcio ( $Ca^{++}$ ).

Antonio Sesso  
Faculdade de Medicina USP  
Deptº de Patologia  
Av. Dr. Arnaldo, 455  
01246 São Paulo SP

Heslot, H., ed. - Perspectives d'applications industrielles du génie génétique. Paris, Lavoisier, 211p., 1983. 185F.

Este livro é baseado em conferências proferidas em um simpósio que leva o título do livro e que foi realizado em Paris em abril de 1982 e sob a coordenação de H. Heslot, do Instituto Nacional de Pesquisas Agronômicas (INRA) da França.

A proposição não é a de esgotar ou de estudar com profundidade as diferentes técnicas de Engenharia Genética mas sim, de dar uma visão geral das potencialidades da biotecnologia moderna e as eventuais aplicações futuras nas áreas biomédica e agro-nômica.

O livro começa pela descrição por R. Téoule de uma das técnicas mais promissoras na exploração industrial da engenharia genética: a síntese química de genes. É dada uma visão bem geral sobre o método de síntese química de DNA, sendo o capítulo encerrado com exemplos da utilização desta técnica (síntese dos genes de somatostatina e somatotropina) e possibilidades concretas da mesma, com o isolamento de genes e mutações dirigidas em genes. Neste primeiro capítulo, nos deparamos com a apresentação inconveniente do livro, onde as figuras encontram-se em bloco ao final do texto, quebrando a continuidade da leitura.

Os quatro capítulos que se seguem tratam da utilização de outros hospedeiros de clonagem molecular que não *E. coli*, a saber: *Bacillus subtilis*, *Metilophilos methylotrophus*, *Streptomyces* e leveduras. É devidamente ressaltada a importância da utilização de hospedeiros diferentes de acordo com a aplicação e com o gene que se deseja clonar. No caso de *B. subtilis*, S.D. Ehrlich apresenta uma revisão dos resultados obtidos em seu laboratório nos últimos anos, mostrando a viabilidade deste hospedeiro, que apresenta menores riscos potenciais quando comparado a *E. coli*. São apresentados resultados sobre a utilização de diferentes vetores de clonagem em *B. subtilis*, e entre os quais vetores de expressão. O capítulo é encerrado com a constatação da ainda não resolvida instabilidade de plasmídios híbridos neste hospedeiro.

Os outros dois hospedeiros procariotos, *M. methylotrophus* e *Streptomyces* (apresentados por J.D. Windass e D.A. Hopwood, respectivamente), embora não tão bem caracterizados quanto *B. subtilis*, podem tornar-se extremamente úteis industrialmente. Entretanto, o hospedeiro alternativo mais interessante, é a levedura. H. Heslot, apresenta uma mini-revisão sobre a engenharia genética em leveduras, apresentando generalidades sobre as leveduras, exemplos de genes já clonados em leveduras e conclui seu capítulo com as perspectivas futuras da utilização de leveduras como hospedeiros de clonagem molecular de genes.

Após a apresentação de diferentes hospedeiros de clonagens, são apresentados por J. Collins e P. Tiollais, respectivamente, genes de interesse biomédico: interferon e antígenos de superfície do vírus da hepatite B.

O livro prossegue com a apresentação por J. Tempe e J. Schell dos plasmídios Ti de *Agrobacterium tumefaciens*, os mais promissores em termos de engenharia genética em plantas.

O ponto forte deste livro são as mesas redondas (vetores de clonagem, aplicações industriais da engenharia genética, e, estratégia para a transformação de células vegetais), transcritas ao final do mesmo. Nestas, em um clima aparentemente mais descontraído e com imaginação, são discutidos os problemas técnicos com os diferentes hospedeiros e vetores de clonagem e a viabilidade real da exploração industrial de determinados genes.

Samuel Goldenberg  
Deptº Bioquímica e Biologia Molecular  
FIOCRUZ  
Av. Brasil, 4365  
21040 Rio de Janeiro RJ

**Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia/ Departamento de Ciência e Tecnologia - DCET/ Serviço Estadual de Assistência aos Inventores - SEDAI - XII Concurso Nacional do Invenção Brasileiro - "Prêmio Governador do Estado". São Paulo, 1984.**

**Objetivos -** Premiar o esforço de pesquisa realizado na área de desenvolvimento tecnológico, colaborar na aceleração deste processo de desenvolvimento e divulgar a tecnologia gerada no País, visando a sua efetiva incorporação ao mercado.

**Condições de participação -** Poderão concorrer pessoas físicas e jurídicas residentes no País. Um mesmo interessado poderá participar com mais de um invento, devendo entretanto, cada invento ser inscrito separadamente. Poderão ser inscritos inventos com patentes concedidas e pedidos de privilégio em andamento, das seguintes naturezas: patente de invenção e modelo de utilidade. Não poderão ser inscritos inventos com pedidos de privilégio de patente depositados em outros países e, posteriormente, no Brasil.

**Prêmio** - O prêmio concedido será de Cr\$ 5.000.000,00 (cinco milhões de cruzeiros). Se o invento vencedor pertencer a pessoa jurídica, será conferido um diploma à Entidade e, ao inventor, o prêmio em moeda corrente.

**Inscrições** - Os interessados em participar no Concurso deverão solicitar e/ou retirar diretamente o Regulamento e a Proposta de Inscrição no Serviço Estadual de Assistência aos Inventores, na Av. Angélica, 2632/9º andar - 01228 São Paulo SP - Fone: 231-5355 Ramal 44 - Telex (011)32516 SEAI BR. Maiores informações no local da inscrição.

**Critérios de avaliação** - A análise e o julgamento dos inventos inscritos será feito por uma Comissão Julgadora, composta por especialistas de notória capacitação, vinculados a Entidades da Rede de Ciência e Tecnologia do País. Os parâmetros de avaliação e classificação dos inventos inscritos são: interesse nacional e alcance social; progresso tecnológico; aplicabilidade industrial e originalidade.

O resultado será tornado público através do Diário Oficial do Estado de São Paulo no prazo máximo de 15 (quinze) dias após o término dos trabalhos da Comissão Julgadora.

**Strathern, J.N.; Jones, E.W. & Broach, J.R., eds.** - *The molecular biology of the yeast Saccharomyces: metabolism and gene expression*. New York, Cold Spring Harbor Laboratories, Monograph Series, 680p., 1982. U\$90.00.

Trata-se do 2º volume de uma série que se propõe a apresentar revisões sobre os temas mais modernos da Biologia Molecular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Esta publicação é extremamente oportuna, uma vez que, desde 1970, quando da edição do livro "The yeasts" (Rose, A.H. & Harrison, J.S. - Academic Press, London, New York), não se tinha notícia de nenhum outro livro que cobrisse os diferentes aspectos da genética e bioquímica de leveduras e os interessados no campo estavam realmente sentindo a falta de uma publicação atualizada.

Este volume aborda diferentes aspectos do metabolismo de *Saccharomyces*, incluindo capítulos sobre o metabolismo de carboidratos, do nitrogênio, de lípideos da membrana, biossíntese de aminoácidos e de nucleotídeos, estrutura e biossíntese da parede celular e mecanismos de transporte. São ainda expostos os conhecimentos atuais sobre circuitos regulatórios da expressão gênica em diferentes vias metabólicas e estudos recentemente desenvolvidos sobre a biossíntese de proteínas, envolvendo o próprio processo da tradução da informação genética, como ainda o controle genético dos tRNAs e rRNAs e a síntese dos ribossomos. De particular interesse são os capítulos referentes às RNA polimerases nucleares e o seu papel na transcrição, ao processo de secreção de proteínas e à pesquisa sobre DNA recombinante nas leveduras, uma vez que constituem campos de pesquisa, que, somente recentemente, vieram a sofrer um grande desenvolvimento, de modo que não constam dos livros anteriormente publicados sobre estes microrganismos. Encontram-se ainda no livro, sob a forma de apêndices, o mapa genético atualizado de *Saccharomyces cerevisiae* e uma relação de marcadores bioquímicos existentes para organelas da levedura.

Os 14 capítulos em que está dividido este volume são de ótima qualidade, tendo sido escritos por especialistas de renome em cada campo. Em todos os capítulos, encontra-se uma ampla revisão bibliográfica, que permite ao consultor completar os seus conhecimentos sobre o assunto.

Assim, este livro constitui um excelente exame sobre o estado atual do conhecimento da Biologia Molecular das leveduras, e não pode deixar de fazer parte da biblioteca de geneticistas e bioquímicos. Além disto, considerando o enorme campo de aplicações em que são empregadas as leveduras, recomendamos ainda o livro a qualquer pessoa interessada em estudos de fermentações envolvendo estes microrganismos. É importante salientar que a levedura *Saccharomyces*, além de ter mostrado ser um organismo extremamente útil para o estudo da Biologia Molecular de células eucarióticas, passou desde 1978 a poder ser empregada em experiências de Engenharia Genética, o que ampliou consideravelmente as perspectivas do seu aproveitamento em diferentes campos de pesquisa envolvendo os mais variados organismos. No contexto

atual, é portanto muito maior a faixa de interessados que uma publicação deste tipo pode alcançar.

Não podemos evidentemente deixar de recomendar ainda o 1º volume desta série, publicado em 1981, que trata de temas relacionados com o ciclo celular e a genética de *Saccharomyces cerevisiae*. Os 2 volumes se completam para constituirem uma valiosa fonte de informações, indispensáveis como consulta para os especialistas da área, como ainda para introduzir a levedura a estudantes e demais pesquisadores que queiram ingressar neste campo do conhecimento biológico.

Ana Clara S. Frascino  
Instituto de Química USP  
Caixa Postal 20780  
01000 São Paulo SP

Bertazzoni, V. & Bollum, F.J., eds. - Advances in experimental medicine and biology. Terminal transferase in immunobiology and leukemia. New York, Plenum Press, vol.145, 393p., 1982.

Trata-se da coleção dos trabalhos apresentados em Elba, Itália, em 1981, sobre a deoxynucleotidil Transferase Terminal (TdT). Essa enzima conhecida há 20 anos, adquiriu uma grande importância na atualidade, por ter sido observado que ela tem uma distribuição peculiar nos tecidos, sendo encontrada em linfócitos T e B em determinadas etapas de sua maturação. Este achado faz com que o TdT seja um marcador bioquímico importante para o estudo da imunologia. São apresentadas a caracterização bioquímica da enzima, seu fracionamento e purificação e métodos bioquímicos e imunológicos para identificação e caracterização do TdT nas diversas espécies animais e nos diferentes tipos celulares. É dado particular ênfase ao achado desta enzima em células neoplásicas de pacientes com leucemia linfoide aguda, linfoma de Hodgkin e também de pacientes com leucemia mieloide aguda. Mais importante ainda, são delineadas algumas possibilidades de serem ainda exploradas sobre o uso da TdT como marcador para o estudo da ontogenia do sistema imunológico e um melhor conhecimento da célula leucêmica. Vários trabalhos apresentam os resultados obtidos em células neoplásicas em pacientes com leucemia e linfoma, mostrando sempre uma boa correlação desse parâmetro com outros parâmetros utilizados para avaliação prognóstica do paciente. Aqui, mais uma vez, fica demonstrada que a TdT é um bom marcador para o estudo da biologia de leucemias e linfomas e provavelmente, para uma melhor orientação terapêutica, isto sem falar que com o advento dos anticorpos monoclonais, ela poderá adquirir mais uma utilidade. Os vários trabalhos apresentaram uma boa revisão bibliográfica que permitirá um estudo ainda mais profundo a respeito, como já está referido no prefácio. O conjunto dos trabalhos mostra a validade e a necessidade da pesquisa conjunta feita por bioquímicos, biólogos, imunólogos e hematólogos. Trata-se pois, por sua abrangência, de um livro de utilidade real para grupos de pesquisa e para consulta.

Diana H.B. Pozzi  
Faculdade de Medicina USP  
Disciplina de Hematologia e Hemoterapia  
Av. Dr. Arnaldo, 415  
01246 São Paulo SP

Fotolitos e Impressão

 **GRÁFICA  
EDITORADA  
HAMBURG**

Avenida Boaer, 64  
Via das Mercês São Paulo  
Fone: 914-0233  
CEP 04298