

# Revista de Microbiologia

Regina



**SBM**

Sociedade  
Brasileira de  
Microbiologia

São Paulo — Brasil

Volume 15 Número 3 Jul.-Set. 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). Abreviações bioquímicas devem seguir, essencialmente, as regras de IUPAC-IUB (J. Biol. Chem., 241:527, 1966). Atividade enzimática deve ser expressa em termos de unidades internacionais (Enzyme Nomenclature, Elsevier Publ. Co., 1965). Para pesos e volumes, devem ser usados os prefixos nano (n) e pico (p), ao invés de milímetro ( $m\mu$ ) micromicro ( $\mu\mu$ ). Comprimentos devem ser expressos, em micrômetro ( $\mu m$ ;  $10^{-6}m$ ), ao invés de micro ( $\mu$ ); nanômetro ( $nm$ ;  $10^{-9}m$ ), ao invés de milímetro ( $m\mu$ ); e Angstroms ( $\text{\AA}$ ;  $10^{-10}m$ ). Partes se reservam o direito de adaptar os manuscritos ao estilo adotado.

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

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

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

A página título deverá conter apenas e tão somente: (i) o título do artigo, usando-se letras maiúsculas somente quando obrigatórias, (ii) o(s) nome(s) do(s) autor(es) com maiúsculas e minúsculas normalmente usadas e (iii) afiliação. O resumo não deverá ultrapassar 250 palavras. Os trabalhos redigidos em inglês devem ser acompanhados de um título e resumo em português; os redigidos em português e espanhol, de um título e resumo em inglês. O resumo na língua do trabalho e o título com resumo na outra língua devem ser datilografados em página separada do restante do texto.

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

Exemplo:

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

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

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

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

Citações de "resumos", "dados não publicados", "comunicações pessoais" ou "no prelo" 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 comprehensíveis, sem necessidade de consulta ao texto. São permitidas notas explanativas de rodapé indicadas por asteriscos, mas não descrições pormenorizadas dos experimentos. Materiais e métodos utilizados para a obtenção dos resultados devem ser incluídos na seção correspondente.

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

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

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



# Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia

São Paulo — Brasil

|                            |  |  |
|----------------------------|--|--|
| Conselho Diretor           | Luiz Rachid Trabulsi, Italo Suassuna e Wilson Chagas de Araujo   | Pertence à:<br><br>REVISTA DE MICROBIOLOGIA - SBM<br>Av. Prof. Lineu Prestes, 1374<br>Cid. Universitária - USP<br>05508-900 — São Paulo/SP |
| Diretor Executivo          | João Salvador Furtado<br>Instituto de Botânica<br>Caixa Postal 4005<br>01000 São Paulo SP  |  |
| Diretor Associado          | Flávio Alterthum<br>Instituto de Química — USP<br>Caixa Postal 20780<br>01000 São Paulo SP   |  |
| Assistente de Diretoria    | Leila Vasconcellos<br>Sociedade Brasileira de Microbiologia<br>Caixa Postal 4005<br>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<br>João S. Furtado<br>Instituto de Botânica<br>Caixa Postal 4005<br>01000 São Paulo SP  | Secretário Geral<br>Maria Therezinha Martins<br>CETESB<br>Av. Prof. Frederico Hermann Jr., 345<br>05459 São Paulo SP |
|           | Vice-Presidente<br>Paulo Pinto Gontijo Filho<br>Instituto de Microbiologia UFRJ<br>Centro de Ciências da Saúde<br>Bloco I — Ilha do Fundão<br>20000 Rio de Janeiro RJ  | Tesoureiro<br>Milton Mangini<br>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.<br>Organiza, a cada dois anos, na última semana do mês de julho, o Congresso Brasileiro de Microbiologia e edita a Revista de Microbiologia, com distribuição trimestral. Para informações sobre a SBM, escrever para qualquer membro da Diretoria. |  |

## **SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA**

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

Biolab-Mérieux Produtos para Laboratórios Ltda.  
Coca-Cola Indústrias Ltda.

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

Embrabio - Empresa Brasileira de Biotecnologia Ltda.  
Indústrias Químicas e Farmacêuticas Schering S.A.  
Merck, Sharp & Dohme Ind. Quim. Farmacêutica Ltda.

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

**REVISTA DE MICROBIOLOGIA**  
**PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA**  
**VOLUME 15 JULHO-SETEMBRO 1984 NÚMERO 3**  
**REV. MICROBIOL. (S. PAULO), 15(3)**

**CONTEÚDO**

|   |   |  |
|---|---|--|
| Costa, I.;<br>Martelli, H.L.;<br>Silva, I.M.<br>& Pomeroy, D.   | 109 Produção de carotenóides<br>por fermentação. I -<br>Produção de biomassa de<br><i>Rhodotorula glutinis</i><br>var. <i>glutinis</i>  | <i>Carotenoid production<br/>by fermentation. I -<br/>Biomass production of<br/><i>Rhodotorula glutinis</i><br/>var. <i>glutinis</i></i>   |
| Costa, S.O.P;<br>Bianco, M.<br>& Bonato, M.C.M.   | 114 Sensibilidade de<br>linhagens de <i>Proteus</i><br><i>mirabilis</i> portadores de<br>plasmídio R ao<br>desoxicolato de sódio  | <i>Increased sensitivity to<br/>sodium deoxycholate of<br/><i>Proteus mirabilis</i><br/>strains carrying plasmid<br/>R</i>   |
| Salgado, J.M.<br>& Basso, L.C.  | 119 Caracterização de<br>substâncias tóxicas<br>produzidas por isolados<br>do gênero <i>Aspergillus</i> ,<br><i>Penicillium</i> e <i>Fusarium</i><br>associados ao milho e<br>arroz     | <i>Mycotoxins associated<br/>with corn and rice<br/>produced by isolates of<br/><i>Aspergillus</i>, <i>Penicillium</i><br/>and <i>Fusarium</i></i>   |
| Faro, H.M.;<br>Maiorano, A.E.<br>& Hiss, H.   | 123 Estudo comparativo entre<br><i>Trichoderma viride</i> e<br><i>Myrothecium verrucaria</i><br>na produção de enzimas<br>celulolíticas   | <i>Comparative study<br/>between <i>Trichoderma</i><br/><i>viride</i> and <i>Myrothecium</i><br/><i>verrucaria</i> for the<br/>production of<br/>cellulolytic enzymes</i>                        |
| Baruffaldi, R.;<br>Penna, T.C.V.;<br>Schuch, R.;<br>Gioielli, L.A.;<br>Pitombo, R.N.M.;<br>Machoshvili, I.A.<br>& Abe, L.E. | 127 Resistência térmica de<br>esporos de <i>Bacillus</i><br><i>stearothermophilus</i> FS<br>1518 em solução tampão<br>fosfato M/15 (pH = 7,0)   | <i>Thermal resistance of<br/>spores of <i>Bacillus</i><br/><i>stearothermophilus</i> FS<br/>1518 in phosphate buffer<br/>M/15 (pH = 7.0)</i>   |
| Vancetto, M.D.C.;<br>Lima, M.L.S.R.;<br>Moura, E.R.G.;<br>Santos, N.P.<br>& Soerensen, B.                                   | 132 Aplicação do LAL<br>( <i>Limulus Amebocyte</i><br>Lysate) para a detecção<br>de pirogênio em soros<br>hiperimunes. Estudo<br>comparativo como o<br>método tradicional em<br>coelhos | <i>Application of the LAL<br/>(<i>Limulus Amebocyte</i><br/>Lysate) for detection of<br/>pyrogen in hyperimmune<br/>serums. Comparative study<br/>with the traditional<br/>method in rabbits</i> |

|   |   |  |
|---|---|--|
| Andrade, J.R.C.;<br>Melo, F.M.;<br>Dickie, L.;<br>Rosa, M.R.S.<br>& Suassuna, I.            | 137 Pili hemaglutinante<br>manose-resistente em<br><i>Escherichia coli</i><br>isoladas de infecções do<br>trato urinário                            | Mannose-resistant<br>hemagglutinins and pili<br>in <i>Escherichia coli</i><br>associated to urinary<br>tract infections          |
| Teixeira, L.M.;<br>Suassuna, I.R.<br>& Suassuna, I.   | 140 Sorotipos de <i>Shigella</i> em<br>gastroenterites no Rio<br>de Janeiro   | Serotypes of <i>Shigella</i><br>isolated from cases of<br>gastroenteritis in Rio<br>de Janeiro                                   |
| Almeida, A.M.P.;<br>Brasil, D.P.;<br>Silva, N.T.C.<br>& Almeida, C.R.                       | 145 Informe sobre a peste<br>bubônica (infecção por<br><i>Yersinia pestis</i> ) no<br>Estado de Minas Gerais,<br>Brasil                             | Note on bubonic plague<br>( <i>Yersinia pestis</i><br>infection) in Minas<br>Gerais State, Brazil                                |
| Neitzert, E.<br>& Waack, R.S.   | 147 Vacina antiaftosa por<br>DNA recombinante (rDNA):<br>estratégias para<br>construção de vetores de<br>expressão para o gene<br>VP <sub>1</sub>   | DNA recombinant foot and<br>mouth disease vaccine:<br>VP <sub>1</sub> expression vectors<br>strategies construction              |
| Furlanetto, S.M.P.;<br>Campos, M.L.C.;<br>Härsi, C.M.;<br>Buralli, G.M.<br>& Ishihata, G.K. | 170 Microrganismos<br>enteropatogênicos em<br>moscas africanas<br>pertencentes ao gênero<br><i>Chrysomyia</i> (Diptera,<br>Calliphoridae) no Brasil | Enteropathogenic<br>microorganisms in flies<br>belonging to the genus<br><i>Chrysomyia</i> (Diptera,<br>Calliphoridae) in Brazil |
| Bellei, M.M.;<br>Gareau, E.E.C.A.;<br>Mezêncio, J.M.S.<br>& Chagas, H.L.B.                  | 175 A eficiência de<br>audiovisuais no ensino<br>de microbiologia   | The effectiveness of<br>visual aids in teaching<br>a microbiology course   |

Informação  
Técnico-Científica SBM 183

# PRODUÇÃO DE CAROTENÓIDES POR FERMENTAÇÃO. I - PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *RHODOTORULA GLUTINIS* VAR. *GLUTINIS*\*

Isamar Costa\*\*

Hebe L. Martelli

Iracema M. da Silva

& Daniel Pomeroy

Deptº de Engenharia Bioquímica

Escola de Química UFRJ

Bloco E - Centro de Tecnologia

Ilha do Fundão

21941 Rio de Janeiro RJ, Brasil

## Resumo

A obtenção de biomassa da levedura *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* foi ensaiada em vários meios de cultura, chegando-se a um meio balanceado, tendo sacarose comercial e sulfato de amônio como fonte de carbono e nitrogênio, respectivamente. O pH foi mantido entre 6,5 e 5,6; a temperatura a  $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . A taxa de aeração foi 1,0vvm e a velocidade do agitador 400rpm. O volume útil do jarro do fermentador foi um litro, sendo que a relação entre a altura do líquido e o diâmetro da base foi igual a 1,0. A eficiência média de consumo do substrato foi 98% e o fator de rendimento médio 0,486g de célula seca por g de sacarose. A taxa específica de crescimento na fase exponencial foi igual a  $0,34\text{h}^{-1}$  e o tempo médio de duplicação 2,0h; a duração da fase exponencial atingiu 12h. O peso médio de biomassa seca produzida em 19 horas de cultivo variou de 10,0 a 11,0g por litro.

## Summary

*Carotenoid production by fermentation. I - Biomass production of Rhodotorula glutinis var. glutinis*

A synthetic medium containing commercial sucrose and ammonium sulphate as carbon and nitrogen source respectively, was developed for growing the yeast *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis*. Cell growth was carried out at  $27^{\circ}\text{C}$ , and pH 6,5, in a one liter working volume bench fermentor, with a liquid height to jar diameter ratio H/T = 1.0. The aeration rate was 1.0vvm and the rotational speed of the agitator amounted 400rpm. The average substrate consumption for growing was 98%, the yield factor for biomass production being 0.486g for g of sugar. The medium value for the specific growth rate at the exponential phase of growth exhibited by the culture under the above conditions was  $\mu_x = 0.34\text{h}^{-1}$ ,

\* Auxiliado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

\*\* Parte da tese "Produção de b-carotenos por uma espécie do gênero *Rhodotorula*", executada com bolsa da CAPES, aprovada no Deptº de Engenharia Bioquímica da Escola de Química da UFRJ, para obtenção do grau de Mestre em Ciências

corresponding to a doubling time of ca. 2.0h. Cell crops amounted 10,0 to 11,0g of dried cells per liter, after 19 hours of growth; at this time the cells were just lighted coloured or not yet coloured.

## Introdução

As espécies da família *Rhodotorulaceae* caracterizam-se, entre as leveduras, pela presença na membrana celular de pigmentos carotenóides (6). Nas espécies do gênero *Rhodotorula* foi comprovada a presença de  $\alpha$  e  $\beta$ -carotenos, assim como toruleno e torularodeno, sempre como produtos do metabolismo secundário (5). Os pigmentos carotenóides são insumos da indústria farmacêutica, pois, no organismo dos animais são convertidos em vitamina A. Além disso, são utilizados como corantes amarelos, solúveis em gorduras, na indústria alimentar.

São raros os trabalhos sobre as exigências culturais e fisiologia das espécies do gênero *Rhodotorula*. Alguns autores referem-se ao cultivo destas espécies, em regime contínuo, visando a biossíntese de gorduras (3, 7, 8).

A obtenção de biomassa, em condições operacionais definidas, é requisito básico para o estudo da produção de carotenóides.

Tabela 1 - Composição dos meios

| Componentes<br>g/l   | Meios |      |       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|----------------------|-------|------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|                      | 1     | 2    | 3     | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   |
| Glicose              | -     | -    | -     | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 20,0 | -    | -    | -    |
| Frutose              | -     | -    | -     | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 20,0 | -    | -    |
| Sacarose             | 36,0  | 18,0 | 100,0 | 18,0 | 36,0 | 20,0 | 20,0 | 20,0 | 20,0 | -    | -    | 20,0 | 20,0 |
| $(NH_4)_2SO_4$       | 1,0   | 2,0  | 23,0  | 2,5  | 2,5  | 5,7  | 3,7  | 3,7  | -    | 3,7  | 3,7  | -    | 3,7  |
| Ureia                | -     | -    | -     | -    | -    | -    | -    | -    | 1,6  | -    | -    | -    | -    |
| Peptona              | -     | -    | -     | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 10,0 | -    |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0,5   | 0,5  | 0,5   | 0,5  | 0,5  | 0,5  | 0,5  | 0,5  | 0,5  | 0,5  | 0,5  | 0,5  | 0,5  |
| $K_2HPO_4$           | 1,0   | 2,0  | -     | 2,0  | 2,0  | 2,0  | 0,7  | -    | 6,7  | -    | -    | -    | -    |
| $K_2PO_4$            | -     | -    | 2,8   | -    | -    | 2,0  | 0,5  | 5,5  | 5,0  | 5,5  | 5,5  | 5,5  | 5,5  |
| $NaH_2PO_4$          | -     | -    | 3,0   | 4,0  | 4,0  | -    | -    | 2,0  | -    | 3,75 | 3,75 | 3,75 | 3,75 |
| $NaH_2PO_4$          | -     | 2,0  | -     | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| Extrato de levedo    | -     | 1,0  | 0,5   | 1,0  | 1,0  | 1,0  | 1,0  | 1,0  | 1,0  | 1,0  | 1,0  | 1,0  | 1,0  |

## Material e Métodos

**Agente** - *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* (6) mantido por repiques mensais para gelose Saboureaud, incubados a 25°C por 72 horas e conservados a 5°C.

**Materia prima** - Açúcar comum (substrato: sacarose).

**Meios de cultivo** - Inicialmente, foram ensaiados alguns meios de cultura. Foi dada preferência a meios simples, visando facilitar a operação de separação e lavagem da biomassa, para posterior extração e purificação dos carotenóides. A composição é encontrada na Tabela 1.

O pH foi ajustado a 6,5 não tendo variado com a esterilização a 0,5 atmosferas por 15 minutos.

Os inóculos foram preparados no próprio meio, por cultivo a 27°C por 18 horas, em volumes correspondentes a 10% do volume a semear. A pureza foi controlada por exame sob microscópio, de preparações coradas. A concentração celular, foi determinada por contagem do número de células e por determinação do peso seco de células, usando-se como inóculo volume adequado de cultura.

Foram feitas experiências em frascos cônicos de 500ml, contendo 100ml de meio, agitados a 120 batidas por minuto, em agitador SOLD (Arthur H. Thomas Co.) e em fermentador de bancada, em jarras de 2 litros, sendo de um litro o volume útil. O fermentador Microferm New Brunswick Sc. Co é dotado de controle de temperatura, de agitação e aeração. O volume de meio foi calculado para uma relação H/T igual a 1,0. No início e a intervalos conhecidos, foram retiradas amostras de 5,0ml para determinação do número de células, do peso seco de células e da concentração do substrato.

Ao fim, a biomassa foi centrifugada, lavada, seca, pesada e utilizada para posterior extração e dosagem do  $\beta$ -caroteno. Neste mosto final, além da concentração de açúcar, foi também determinado o nitrogênio residual. As centrifugações foram efetuadas em centrifíguo Danon/IEC modelo HNS, em campo centrífugo de intensidade 1000g.

*Métodos de análise* - A concentração celular foi quantificada por dois procedimentos: contagem das células em câmara de Neubauer (2), com o fim de acompanhar o crescimento das culturas e por determinação do peso seco da massa celular por gravimetria, em estufa a 60°C, para determinação do rendimento.

O açúcar foi dosado, após hidrólise com solução 2N HCl, a 70°C, por 10 minutos e neutralização com NaOH 0,1N. A glicose foi dosada pelo método da glicose-oxidase (1), em espectrofotômetro Spectronic 20 Baush Lomb, usando-se um fator para quantificação da sacarose.

A variação do pH do meio foi determinada por potenciometria, com aparelho pH Meter E-520 Metrhom Herisau.

## Resultados e Discussão

*Influência da composição do meio de cultura* - Os ensaios, para seleção dos meios, foram feitos com frascos cônicos de 500ml contendo 100ml de meio, usando 04 frascos para cada experiência, semeados e agitados conforme descrito, e a temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ .

No início, e a intervalos conhecidos, foram retiradas aliquotas de 1,0ml para contagem das células e dosagem do açúcar. Fimdo o crescimento das culturas, o volume total foi centrifugado e as células lavadas, secas e pesadas.

Como pode ser visto pela Tabela 2, foram variadas as relações C:N:P, assim como, verificadas as influências da fonte de carbono, da fonte nitrogenada, da concentração de fosfatos para tamponamento do meio, e a influência da concentração da sacarose entre 18,0 e 100,0g/l. Os melhores resultados foram obtidos com glicose e sacarose como fonte de carbono e energia; esta última foi escolhida para compor os meios em todas as experiências subsequentes, sendo que a concentração de 20,0g/litro foi a que deu melhores resultados, pois concentrações mais elevadas inibiram o crescimento das culturas. Das fontes nitrogenadas, o sulfato de amônio mostrou-se mais eficiente que a peptona ou a uréia. A proporção 50:5:14 para a relação C:N:P mostrou-se a mais apropriada, a relação 5,50 e 3,75g/litro de respectivamente fosfatomonopotássico e fosfatodissódico, permitiu que o pH variasse apenas de 6,5 a 5,5 ao curso do processo, portanto, sem prejuízo para o crescimento da cultura. Pelos resultados obtidos, o meio 13 foi escolhido para as experiências subsequentes.

Tabela 2 - Influência da composição do meio no crescimento da cultura em frascos agitados.

**Símbolos:** pH inicial = 6,5; concentração celular inicial =  $2,0 \times 10^8$  cel/l; temperatura =  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ ; agitação = 120 batidas por minuto; tempo = 24 horas; volume = 100ml. A composição dos meios estão no item Material e Métodos

| Meio | C:N:P      | pH final | N(cel/l) $\times 10^{-8}$ |
|------|------------|----------|---------------------------|
| 1    | 50:0,7:0,6 | 2,0      | 18,0                      |
| 2    | 50:3:6     | 2,5      | 21,0                      |
| 3    | 50:6:2     | 4,0      | 20,0                      |
| 4    | 50:4:10    | 4,0      | 15,0                      |
| 5    | 50:2:5     | 4,0      | 22,0                      |
| 6    | 50:7,5:5   | 5,0      | 83,0                      |
| 7    | 50:5:1,4   | 3,5      | 30,0                      |
| 8    | 50:5:10    | 5,0      | 87,0                      |
| 9    | 50:5:16    | 6,0      | 20,0                      |
| 10   | 50:5:14    | 5,5      | 110,0                     |
| 11   | 50:5:14    | 5,5      | 30,0                      |
| 12   | 50:5:14    | 5,5      | 37,0                      |
| 13   | 50:5:14    | 5,5      | 108,0                     |

**Tabela 3 - Cinética do crescimento da cultura, do consumo do substrato e variação do pH.**

Símbolos: Meio 13; temperatura ambiente =  $27 \pm 20^\circ\text{C}$ ; aeração = 1,0vvm; agitação = 400rpm;  $X_0 = 0,09\text{g/l}$ ;  $X_f = 10,5\text{g/l}$

| T(h) | N( $\text{cl/l} \times 10^{-3}$ ) | S(g/l) | pH  |
|------|-----------------------------------|--------|-----|
| 0    | 1,0                               | 21,4   | 6,5 |
| 2    | 2,2                               | 21,0   | 6,5 |
| 4    | 4,5                               | 20,0   | 6,5 |
| 6    | 7,9                               | 19,3   | 6,5 |
| 8    | 13,3                              | 15,0   | 6,5 |
| 10   | 32,4                              | 13,5   | 6,5 |
| 12   | 67,0                              | 11,8   | 6,5 |
| 13   | 97,7                              | 10,9   | 6,5 |
| 15   | 182,0                             | 9,6    | 6,0 |
| 17   | 217,0                             | 8,5    | 5,5 |
| 21   | 352,6                             | 5,0    | 5,0 |
| 24   | 420,0                             | 0,4    | 4,5 |

**Parâmetros cinéticos do crescimento das culturas** - Estas experiências foram conduzidas em fermentador de bancada, no meio 13, e nas condições acima referidas. Foram ensaiadas algumas combinações de velocidade de agitação e taxa de aeração, tendo sido escolhidos os valores 400rpm e 1,0vvm, respectivamente, pois o aumento na taxa de aeração e na velocidade de agitação, além de não propiciar produtividades mais elevadas, promoveu a formação intensa de espumas, sendo necessária a adição de maiores quantidades de óleo vegetal. Isto foi evitado porque poderia acarretar o mascaramento dos resultados, pois, segundo Ciegler & col. (4), a adição de óleos vegetais influencia a produção de  $\beta$ -caroteno pelo fungo *Blakeslea trispora*.

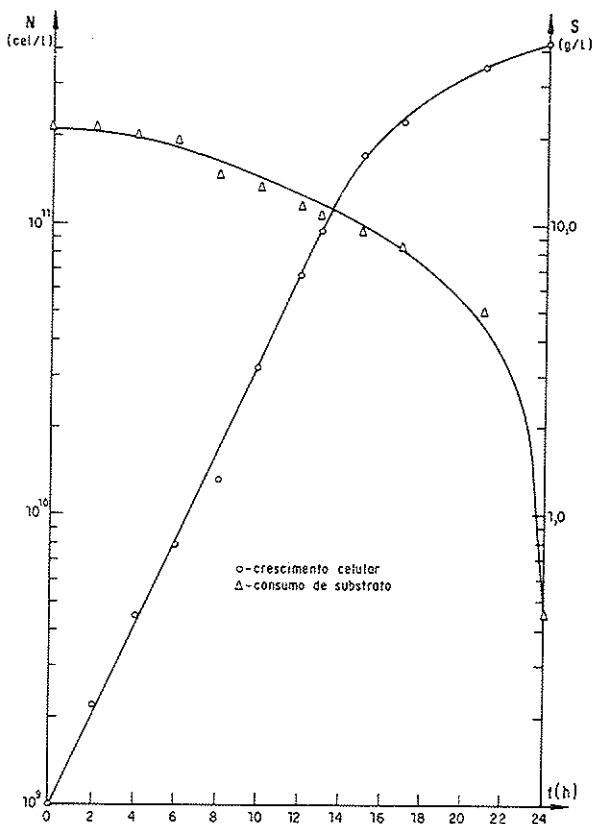
Assim sendo, buscou-se uma relação agitação/aeração que permitisse a obtenção de bons parâmetros cinéticos para o crescimento celular, ao tempo que também as condições de trabalho se mantivessem constantes e não interferissem na finalidade proposta, que é a produção de  $\beta$ -caroteno. As médias aritméticas dos resultados obtidos, assim como da variação do pH, estão na Tabela 3.

A partir dos dados da Tabela 3, foram determinados os seguintes valores : fator de rendimento  $Y_X/S = 0,496$ ; a eficiência de consumo dos substrato  $n = 98,13\%$ ; e o rendimento celular.

Com a finalidade de determinar a velocidade específica de crescimento na fase exponencial  $\mu_X$  foi traçada a curva de crescimento da cultura que se vê na Figura 1, assim como a curva de consumo do substrato. O valor de  $\mu_X$  foi determinado graficamente e deste foi calculado o tempo de duplicação  $t_g$  obtendo-se, respectivamente  $\mu_X = 0,340\text{h}^{-1}$  e  $t_g = 2,0\text{h}$ . A curva de crescimento não tem fase lag, indicando boa adaptação do inóculo; a fase exponencial de crescimento tem 12 horas de duração, o

**Figura 1 - Cinética do crescimento da cultura de *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* e do consumo de substrato.**

Símbolos: condições = meio 13; temperatura ambiente  $27 \pm 20^\circ\text{C}$ ; taxa de aeração 1,0vvm; velocidade de aeração 400rpm;  $\circ-\circ$  - crescimento  $\mu_X = 0,32\text{h}^{-1}$ ;  $\Delta-\Delta$  = consumo



que explica o bom rendimento celular obtido.

Os valores do açúcar e do nitrogênio residual, respectivamente 0,4g/litro e 0,01g/litro, mostram que o meio está bem equilibrado. Por outro lado, se fosse necessário considerar, a disposição do efluente, esta seria facilitada pelo seu pequeno poder poluente.

Na literatura consultada foram encontrados poucos trabalhos específicos, referentes às exigências nutritivas das espécies do gênero *Rhodotorula* e nenhum trabalho sobre os parâmetros cinéticos de seu cultivo, em batelada, para que os presentes resultados pudessem ser comparados.

O valor de rendimento da eficiência de utilização do substrato e o tempo de duplicação são comparáveis com aqueles considerados bons, para cultivos de espécies do gênero *Candida*.

Embora o objetivo principal das experiências fosse a produção de carotenóides, os resultados sugerem que a biomassa, assim obtida, poderia ter uso alimentar, com alguma vantagem sobre a biomassa de espécies do gênero *Candida*, devido à presença de precursores da vitamina A.

#### Referências Bibliográficas

1. Bergmeyer, H.V. & Bernt, E. - Determination with glucose oxidase and peroxidase: methods of enzymatic analysis. New York, Academic Press, 3:1-20/51-214, 1970.
2. BSCS, VS - Biological science interation of experiments and ideas. 2.ed. New York, Prentice Hall, 1970.
3. Choi, S.Y.; Ryu, D.D.Y. & Rhee, J.S. - Production of microbiol lipid: effects of growth rate and oxigen on lipid synthesis and fatty acid composition of *Rhodotorula gracilis*. Biotechnol. Bioeng., 24:1-16/511-572, 1982.
4. Ciegler, A.; Arnold, M. & Anderson, R.F. - Microbiological production of carotenoids. V - Effects of lipids and related substances on production of β-caroteno. 7:981-1001, 1959.
5. Ciegler, A. - Microbiol carotenogenesis. Advances in Applied Microbiol., 7:1-34, 1965.
6. Lodder, J. - The yeast. Amsterdam, North Holland Publishing, 1970.
7. Ratledge, C. & Hall, M.J. - Accumulation of lipid by *Rhodotorula glutinis* in continuous culture. Biotechnol. Letters, 1:1-15/1-20, 1979.
8. Robertson, B.R. & Button, D.K. - Phosphate: limited continuous culture of *Rhodotorula rubra* kinetics of transport, leakage and growth. J. Bacteriol., 138:88-489-495, 1975.
9. Simpson, K.L.; Nakayama, T.O.M. & Chichester, C.O. - Biosynthesis of yeast carotenoids. J. Bacteriol., 88:1688-1694, 1964.

## SENSIBILIDADE DE LINHAGENS DE *PROTEUS MIRABILIS* PORTADORES DE PLASMÍDIO R AO DESOXICOLATO DE SÓDIO

Sérgio Olavo Pinto da Costa

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

Marisa Bianco

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

& Maria Christina Manhães Bonato

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

### **Resumo**

A presença de plasmídio R, em clones excretores e não excretors de protease, de uma linhagem de *Proteus mirabilis*, confere maior sensibilidade ao desoxicolato de sódio.

### **Summary**

*Increased sensitivity to sodium deoxycholate of *Proteus mirabilis* strains carrying plasmid R*

The presence of plasmid R confers to protease excreting and non-excreting clonal isolates of a single *Proteus mirabilis* strain a greater sensibility to sodium deoxycholate.

### **Introdução**

O estudo de indivíduos isolados revela que algumas amostras de *Proteus mirabilis* apresentam a condição de excretar protease (gelatinase), como caráter instável (5), onde grande número de indivíduos da população não excreta a enzima (colônias P-). Há evidências de que o caráter protease tem origem extracromossômica (4). Foi verificado, também, instabilidade ligada à presença do plasmídio R e as células da população que retêm o plasmídio R, excretam somente 50% do teor de protease em relação às aquelas desprovidas desse elemento (3).

Este trabalho tem por objetivo comparar o grau de sensibilidade ao desoxicolato de sódio entre células de uma mesma população de *P. mirabilis*, portadores ou não de plasmídio R e ainda, verificar se existe alguma relação com a incapacidade de excretar protease.

Tabela 1 - Amostras de *Proteus mirabilis* utilizadas.

Símbolos: N-17 isolada de material clínico humano por N.P. Souza (Santa Casa de Curitiba); L-68 isolada de material clínico humano por G.V.A. Pessoa (Instituto Adolfo Lutz); Ap = ampicilina; Km = canamicina; Sm = estreptomicina; Tc = tetraciclina; Cm = cloranfenicol; Hg = mercúrio

| Amostras                      | Características do clone                                    | Origem |
|-------------------------------|---|--------|
| N-17-11 (P <sup>+</sup> )     | protease-positivo   | N-17   |
| N-17-EB (P <sup>-</sup> )     | protease-negativo   | N-17   |
| L-68-73 (P <sup>+</sup> )     | protease-positivo   | L-68   |
| L-68-81 (P <sup>-</sup> )     | protease-negativo   | L-68   |
| L-68-79 (P <sup>+</sup> , R)  | protease-positivo e plasmídio R<br>(Ap, Km, Sm, Tc, Cm, Hg) | L-68   |
| L-68-79A (P <sup>-</sup> , R) | protease-negativo e plasmídio R<br>(Ap, Km, Sm, Tc, Cm, Hg) | L-68   |

## Material e Métodos

Amostras bacterianas - As amostras de *Proteus mirabilis* usadas neste trabalho, bem como suas propriedades mais relevantes, estão descritas na Tabela 1.

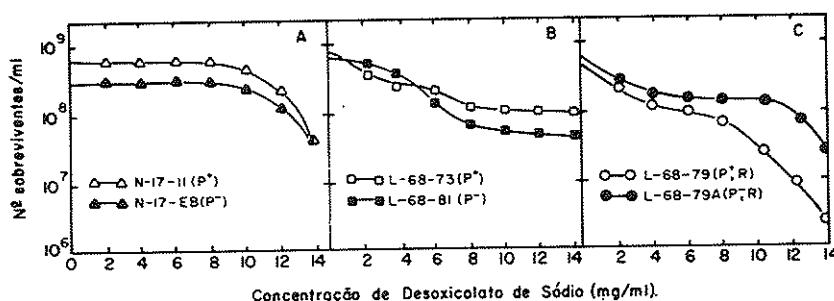
Meios de cultura - NB (Bacto Nutrient Broth, Difco); MM, meio mínimo (6) adicionado de 0,75µg/ml de ácido nicotínico.

Isolamento e caracterização de células produtoras de protease (P<sup>+</sup>) e não produtoras de protease (P<sup>-</sup>) - Para o isolamento de tais linhagens, utilizou-se a técnica de hidrólise da gelatina (5). Os indivíduos P<sup>-</sup> foram obtidos espontaneamente, com exceção do clone N-17-EB (P<sup>-</sup>), que resultou da ação curagênica do brometo de etidio ( $3,27 \times 10^{-3}$ M).

Cura do plasmídio R - Com base na concentração mínima inibitória para cada uma das drogas, testaram-se indivíduos da linhagem *P. mirabilis* L-68. Dada a alta instabilidade, a cura espontânea do plasmídio R é alta e sua confirmação foi feita pela eletroforese em gel de agarose.

Determinação da sensibilidade ao desoxicolato de sódio - As várias amostras foram, primeiramente, cultivadas em NB, por uma noite, a 37°C e depois semeadas em MM líquido, para dar, aproximadamente,  $10^5$  células por ml. Após incubação a 37°C, com 160 agitações reciprocas por minuto, por 24-30 horas, as culturas foram diluídas, convenientemente, em meio mínimo (sem os componentes glicose e ácido nicotínico). Aliquotas de 0,1ml foram espalhadas em placas, contendo MM sólido, adicionados de diferentes concentrações de, aproximadamente, 72 horas a 37°C, procedeu-se à contagem de colônias, a fim de se conhecer o número de sobreviventes por ml, em cada concentração da droga.

Figura 1 - Linhagens proteolíticas e não proteolíticas, abrigando ou não plasmídio R, são testadas quanto às suas sensibilidades ao desoxicolato de sódio. Células portadoras de plasmídio R (Ap, Km, Sm, Tc, Cm, Hg), independentemente de serem ou não excretoras de protease, apresentam maior sensibilidade ao desoxicolato de sódio



## Resultados e Discussão

Clones obtidos de duas diferentes linhagens de *P. mirabilis*, N-17 e L-68 (Fig. 1A, B), são muito menos sensíveis ao desoxicólico do que clones da linhagem L-68 (L-68-79 P<sup>+</sup>, R e L-68-79 P<sup>-</sup>, R) que carregam plasmídio R (Fig. 1C). Os fatores, excreção e não excreção de protease, parecem não interferir na maior sensibilidade ao desoxicólico apresentada pelos clones portadores de plasmídio R.

O desoxicólico de sódio é um agente de ação em superfície, e geralmente aceito como sendo capaz de romper interações entre fosfolipídios e outros componentes da membrana e parede celular (24). Desse modo, a sensibilidade ao desoxicólico de sódio é tomada como medida de acessibilidade a esses componentes e da força de suas ligações com a parede e a membrana (9).

Dante dos resultados (Fig. 1), pode-se supor que o fenômeno central, responsável pela sensibilidade aumentada ao desoxicólico de sódio, decorre de alguma alteração no envoltório bacteriano, causado pela presença do plasmídio R.

Estudo sobre o comportamento do plasmídio R, em várias bactérias hospedeiras, têm sido bem documentados nos últimos anos. No entanto, poucas são as informações relacionadas com o mecanismo pelo qual plasmídios R afetam a fisiologia bacteriana. Sabe-se, por exemplo, que eles podem interferir com a capacidade de crescimento e que a resistência para duas ou três drogas, prejudica o crescimento, de maneira mais acentuada do que quando apenas um marcador está presente (2).

Os plasmídios podem alterar, também, o reparo do DNA da célula hospedeira. Linhagens de *E. coli* e *Salmonella typhimurium*, carregando Col I<sup>+</sup> b-P9, são menos sensíveis à morte pela UV e à reversão de alguns mutantes auxotróficos, e mais sensíveis à indução do fago λ do que linhagens Col I<sup>-</sup> (10). A sensibilidade à radiação e à ação de mutágenos químicos, em *Pseudomonas aeruginosa*, também pode decorrer de modificações causadas pela presença de plasmídios (11).

Um dos maiores fatores, responsáveis pelo sucesso do sistema Ames, para detecção de mutágenos e carcinógenos (1, 14, 15), foi a introdução de plasmídio R na linhagem de *Salmonella typhimurium*, utilizada como testadora. O plasmídio pKM 101 é um dos vários que podem reduzir a morte, pela ação da UV (chamado efeito de proteção) e, ao mesmo tempo, aumentar a mutagênese para essa irradiação (12, 13, 20). Na linhagem testadora, esse plasmídio faz com que aumente a reversão de mutações de ponto e de mudanças do quadro de leitura, pela ação de uma variedade de mutágenos e carcinógenos testados.

A presença de plasmídio Col V, por exemplo, parece estar associada à patogenicidade de algumas linhagens de *E. coli* (22).

O plasmídio pCU3 confere à hospedeira *E. coli* K-12, maior sensibilidade ao bicloreto de mercúrio e ao bicloreto de cobalto do que as bactérias que não os abriga (21).

Alguns plasmídios R conferem à hospedeira *E. coli* maior sensibilidade à rifampicina, supostamente devida ao aumento da permeabilidade na membrana (16, 17, 18, 19). Essa foi a mesma explicação para o aumento da sensibilidade de *E. coli* ao ácido nalidíxico e à acriflavina, causada pelo fator R 100 (23). Em relação à termosensibilidade, para a replicação do DNA a 42°C, foi mostrado que o plasmídio R, Rts I interfere com o crescimento normal do hospedeiro nessa temperatura, devido a modificações que surgem na membrana (7).

Durante o estudo de várias linhagens de *P. mirabilis* carregando fatores R, verificou-se que o crescimento em forma de "bafo", em meio mínimo, podia ser aumentado por alguns plasmídios R e diminuídos por outros (8). Em adição, esses plasmídios R afetam o nível de enzima proteolítica, e em alguns casos, tornam a bactéria mais suscetível à ação do desoxicólico de sódio.

Desta feita, o fator R 1818 (também conhecido como R 46), que apresenta marcadores de resistência para estreptomicina, tetraciclina, espectinamicina e sulfonamida, aumenta o "bafo" e abole a excreção da protease pelo *P. mirabilis* F 67. O fator R-TEM (ou R6K), que apresenta genes para resistência à estreptomicina e ampicilina, reduz o "bafo" e aumenta a excreção da referida enzima. Contudo, os dados (8) não fazem referência a qualquer verificação, a fim de constatar se o transconjugante *P. mirabilis* R 1818 era protease-positiva ou negativa. Parece não ter havido essa preocupação, o que é explicável pelo desconhecimento, naquela época, do fenômeno de

heterogeneidade de população, em relação à excreção da protease (5).

A maior sensibilidade ao desoxicíclato de sódio, das células excretoras e não excretoras de protease, que abrigam o plasmídio R, pode ser evidência de que esse elemento seja o responsável pela alteração do envoltório bacteriano. Esse fato poderá explicar a notável redução da excreção de protease, em células portadoras do referido plasmídio (3).

#### Agradecimentos

Os autores são gratos a Maria Célia Frattini, pelo trabalho de datilografia dos manuscritos.

Este trabalho recebeu o auxílio 40.2510/82 do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

#### Referências Bibliográficas

1. Ames, B.N.; McCann, J. & Yamasaki, I. - Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* mammalian-microsome mutagenicity. *Mutat. Res.*, 31:347-364, 1975.
2. Aoki Watanabe, D.S. - Contribuição ao estudo do crescimento da *Escherichia coli*, sensível e resistente a drogas por mutação e aquisição de fatores R. São Paulo, Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, 153p., 1973. (Tese de Doutoramento).
3. Bonato, M.C.M.; Costa, S.O.P. & Bianco, M. - The influence of R plasmid on extracellular protease expression by *Proteus mirabilis*. *Microbial. Genet. Bull.*, 50:1-3, 1981.
4. Costa, S.O.P.; Bianco, M. & Bonato, M.C.M. - Genetic instability in *Proteus mirabilis* as evidence for plasmid-coded protease. *Microbial. Genet. Bull.*, 51:2-7, 1981.
5. Costa, S.O.P.; Bonato, M.C.M. & Bianco, M. - Instability of the protease (gelatinase) trait in *Proteus mirabilis*. I - A study of new isolated strains. *Rev. Microbiol.*, (S. Paulo), 13:35-45, 1982.
6. Davis, B.D. & Mingoli, E.S. - Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B12. *J. Bacteriol.*, 60:17-28, 1950.
7. Di Joseph, C.G.; Bayer, M.E. & Kaji, A. - Host cell growth in the presence of thermosensitive drug resistant factor R ts I. *J. Bacteriol.*, 115:399-410, 1973.
8. Hesslewood, S.R. & Smith, J.T. - Envelope alterations produced by R factors in *Proteus mirabilis*. *J. Gen. Microbiol.*, 85:146-152, 1974.
9. Hirota, Y.; Mordoh, J. & Jacob, P. - On the progress of cellular division in *Escherichia coli*. III - Thermosensitive mutants of *Escherichia coli* altered in process of DNA initiation. *J. Mol. Biol.*, 53:369-387, 1970.
10. Howarth, S. - Resistance to the bactericidal effect of ultraviolet radiation conferred in enterobacteria by the colicine factor Col. I. *J. Gen. Microbiol.*, 40:43-55, 1965.
11. Lehrbach, P.; Kung, A.H.C.; Lee, B.T.O. & Jacoby, G.A. - Plasmid modification of radiation and chemical mutagen sensitivity in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.*, 98:167-176, 1977.
12. Mac Phee, D.G. - Effect of rec mutations on the ultraviolet protecting and mutation-enhancing properties of the plasmid R-Utrecht in *Salmonella typhimurium*. *Mutat. Res.*, 19:356-359, 1973.
13. Matelmanns, K.E.; Babudri, N. & Samer, L. - Expression of the plasmid pKM 101 determined repair system in recA and lex-strains of *Escherichia coli*. *Molec. Gen. Genet.*, 145:303-306, 1976.
14. McCann, J. & Ames, B.N. - Detection of carcinogens as mutagens in *Salmonella*/microsome test: assay of 300 chemicals: discussion. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 73:950-954, 1976.

15. McCann, J.; Spingarn, N.E.; Kobori, J. & Ames, B.N. - Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmid. Proc. Natl. Acad. Sci., (Wash.), 72:979-983, 1975.
16. Riva, S.; Fietta, A.M. & Silvestri, L.G. - R factor determined changes in permeability of *E. coli* towards rifampicin and other antibiotics. In: Kroméry, L. & Watanabe, T., eds. - Bacterial plasmids and antibiotic resistance. Berlin, Springer-Verlag, p.343-348, 1972.
17. Romero, E.; Riva, S.; Fietta, A.M. & Silvestri, L.G. - Effects of R-factors on rifampicin resistance in *E. coli*. Nature (Lond.), 234:56-58, 1971.
18. Rowbury, R.J. - Bacterial plasmids with particular reference to their replication and transfer properties. Prog. Biophys. Molec. Biol., 33:271-317, 1977.
19. Scotti, R.; Silvestri, L.G. & Romero, E. - Distribution of R factors that increase susceptibility to rifampicin of rif-r mutants in *Escherichia coli*. Antimicrob. Ag. Chemother., 6:121-123, 1974.
20. Walker, G. - Isolation and characterization of mutants of the plasmid pKM 101 deficient in their ability to enhance mutagenesis and repair. J. Bacteriol., 133:1203-1211, 1978.
21. Wang, P.Y.; Relf, J.; Palchadhuri, S. & Iyer, U.N. - Plasmid conferring increased sensitivity to mercuric chloride and cobalt chloride found in some laboratory strains of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol., 133:1042-1043, 1978.
22. Williams-Smith, H. & Huggins, M.B. - Further observations on the association of the colicine V plasmid of *Escherichia coli* with pathogenicity and with survival in the alimentary tract. J. Gen. Microbiol., 92:335-350, 1976.
23. Yoshikawa, M. - Drug sensitivity and drug resistance associated with the presence of an R-factor. Genet. Res., 17:1-7, 1971.
24. Zwaig, R.N. & Luria, S.E. - Genetics and physiology of colicin-tolerant mutants of *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 94:1112-1123, 1967.

## CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS TÓXICAS PRODUZIDAS POR ISOLADOS DO GÊNERO *ASPERGILLUS*, *PENICILLIUM* E *FUSARIUM* ASSOCIADOS AO MILHO E ARROZ

Jocellem Mastrodi Salgado  
 & Luiz Carlos Basso

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

### Resumo

É conhecido o prejuízo que causa aos homens e animais o consumo de substâncias tóxicas produzidas por fungos. Alimentos como trigo, milho, aveia, centeio, sementes de algodão e seus subprodutos, poderão ser substratos para a produção de micotoxinas, resultando em micotoxicose em homens e animais. Mesmo tendo sido constatados altos índices de contaminação por fungos toxicogênicos (enfase às aflatoxinas) em alimentos destinados ao consumo interno brasileiro, as dimensões do problema em nosso meio ainda são desconhecidos. O presente trabalho teve por objetivo identificar e quantificar toxinas associadas ao milho e arroz que estariam relacionadas com a morte de animais em experimentos conduzidos anteriormente. Os resultados obtidos, levaram à seguinte conclusão: espécies do fungo do gênero *Fusarium* produtoras de zearalenone determinaram alta incidência de letalidade nos animais.

### Summary

*Mycotoxins associated with corn and rice produced by isolates of Aspergillus, Penicillium and Fusarium*

It is well known the damage that fungal toxic substances causes to man and animals. Food derived from wheat, corn, oat, barley, cotton, etc., can serve as a substrate for the production of mycotoxins. Under the Brazilian conditions, the dimension of the problem is not known yet, even though levels of food contamination by toxicogenic fungi (mainly the producers of aflatoxins) have been detected. The present study had the following objective: identify and quantify the toxins associated with corn and rice that could be related to the death of animals previously studied. The results of this research led to the following conclusion: species of *Fusarium* which produced zearalenone determined high incidence of lethality in the animals.

### Introdução

Micotoxicoses são doenças de natureza aguda ou crônica, resultantes da ingestão de alimentos contaminados com metabólitos tóxicos produzidos por fungos. Entre vários efeitos nocivos à saúde humana e animal, foi constatada a carcinogenicidade de

algumas micotoxinas como a aflatoxina, patulina, ácido penicílico e esterigmatocistina.

Os mais altos índices de contaminação por micotoxinas são encontrados em alimentos provenientes de regiões tropicais ou semitropicais, onde o clima favorece o desenvolvimento de fungos toxicogênicos. Nestas mesmas regiões, o consumo per capita de alimentos é baixo e a subnutrição uma realidade. Como animais de laboratório mantidos em dietas deficientes são mais suscetíveis aos efeitos tóxicos das aflatoxinas do que animais mantidos em dietas completas, é de se esperar, que o mesmo ocorra para o homem.

A alta incidência de hepatomas humanos em zonas tropicais do Quênia, Moçambique e Tailândia, onde os habitantes estão expostos à ingestão regular de alimentos contaminados (2), realça a importância social e a necessidade do estudo do problema das micotoxinas em nosso meio, o que não foi feito até agora (1).

Recentemente, as micotoxinas despertaram um renovado interesse. De um lado, a descoberta de alucinógenos produzidos por fungos e, de outro, os problemas ligados à alimentação animal, especialmente os provocados pela aflatoxina. Essa micotoxina é responsável por perdas significativas na avicultura e pecuária, devido ao uso constante de tortas oleaginosas na alimentação animal.

A partir do isolamento e caracterização das aflatoxinas é que se evidenciou a importância de fungos contaminantes de sementes, no desenvolvimento de processos patológicos em animais e sua possível implicação em patologia humana, com indícios de ação hepatocarcinogênica.

Por esses problemas, surgidos na alimentação humana e animal, foram conduzidas pesquisas sobre a produção de toxinas por fungos, associadas a cereais utilizados na alimentação. Esses trabalhos indicaram que numerosos fungos, pós-colheita, dependendo de condições predisponentes, poderão produzir outras toxinas, além das aflatoxinas, igualmente tóxicas ao homem e animais, com diferentes quadros sintomatológicos.

Atualmente, aceita-se que outras espécies de fungos, além das do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, possam produzir micotoxinas, embora somente poucas tenham sido estudadas. No Brasil, poucos são os estudos sobre micotoxinas e os existentes enfatizam as aflatoxinas.

O presente trabalho teve por objetivo identificar e quantificar toxinas associadas ao milho e arroz, que estariam relacionadas com a morte de animais, em experimentos conduzidos anteriormente (5, 6, 7).

## Material e Métodos

**Isolados** - Isolados de *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*, já foram estudados (5) e determinados como letais para ratos albinos em ensaios biológicos (6). No presente trabalho, foi feita a identificação do princípio tóxico presente nas rações, através de análise em camada delgada.

**Análise cromatográfica - Extração** - 50 gramas da amostra representativa de cada isolado e obtida por Salgado & Carvalho (6), foi colocada em um frasco de 500ml com tampa esmerilhada. Em seguida, adicionou-se 25ml de água destilada, 25 gramas de terra diatomácea e 250ml de clorofórmio; agitou-se por 30 minutos, filtrou em papel pregueado. Quando a filtração era vagarosa, utilizava-se funil Buchner com vácuo moderado para evitar a concentração da amostra. A primeira porção de 50ml do filtrado, foi coletada e submetida a clarificação na coluna de silice gel.

**Análise em coluna** - No fundo de uma coluna cromatográfica de 22mm de diâmetro por 30mm de comprimento, colocou-se lâmina de vidro em seguida, adicionou-se 2,5 gramas de sulfato de sódio anidro formando uma base uniforme para a silice gel. A seguir, adicionou-se 3 gramas de silice gel G art. 7734 (0,063-0,200mm) Merck e clorofórmio até a altura de meia coluna. As paredes foram lavadas e agitadas com 10ml de clorofórmio para remover a silice gel. Quando a taxa de sedimentação diminuiu, descartou-se o clorofórmio deixando aproximadamente 6cm acima da silice gel. Vagarosamente, adicionou-se 7,5 gramas de sulfato de sódio anidro, permitindo-se que o cloro-

fórmico encobrisse o topo do sulfato de sódio.

Em seguida, adicionou-se 75ml de hexano em 25ml de extrato aplicando na coluna e eluíndo-se com um fluxo de 10/20ml/minuto.

Continuou-se a eluição com 75ml de benzeno e eluiu-se a zearalenona com 125ml de acetona: Benzeno (5:15). Esta foi a fração 1. Lavou-se a coluna com 75ml de éter etílico anidro, descartou-se a lavagem e eluíram-se as aflatoxinas com 75ml de metanol: clorofórmio (3:97). Esta foi a fração 2. As ocratoxinas foram eluídas com 120ml de ácido acético glacial: Benzeno (1:9). Esta foi a fração 3. Cada fração foi coletada a partir do instante da adição do eluente, até a adição do eluente seguinte.

As frações foram evaporadas em evaporador rotatório a vácuo, a 60°C.

Cada resíduo foi transferido quantitativamente para frasco contendo 500µg de benzeno, vedado com tampa de polietileno e guardado para análise em camada delgada.

*Cromatografia em camada delgada - Placas de silica gel GHR (Merck 7331).*

*Aflatoxinas* - Com o auxílio de uma microseringa, aplicou-se aliquotas de 5, 10 e 20µl da fração 2, juntamente com padrões de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>.

As placas foram desenvolvidas com acetona: clorofórmio (1:9) como solvente, a temperatura de 23-25°C, durante 40 minutos. Após esse período, as placas foram removidas, deixou-se evaporar o solvente, e as mesmas foram observadas sob luz ultra violeta de comprimento de onda curta (254nm) e longo (366nm).

A quantificação foi efetuada pela comparação da fluorescência das amostras, com a fluorescência de quantidades conhecidas dos padrões de aflatoxinas.

*Zearalenona e ocratoxina* - De modo semelhante foram cromatografadas as frações F-1 (contendo zearalenona) e as frações F-3 (contendo ocratoxinas). O solvente empregado foi ácido acético glacial:benzeno (1:9). Para confirmação das toxinas, outros solventes foram empregados: (a) etanol:clorofórmio (1:9); (b) tolueno:acetato de etila:ácido fórmico (90%) e (c) ácido acético glacial:benzeno:H<sub>2</sub>O (10:90:1).

## Resultados e Discussão

Os resultados da identificação e quantificação das micotoxinas (zearalenona, aflatoxina e ocratoxina) produzidas por isolamento dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, e que estariam relacionados com a morte de animais em trabalhos anteriores (6), aparecem dispostos na Tabela 2.

Analisando os resultados da identificação e quantificação das micotoxinas (zearalenona, aflatoxina e ocratoxina) produzidas por isolados dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* (Tabela 2), pode-se observar que houve correlação entre teor de zearalenona e número de ratos mortos, indicando provavelmente ser essa toxina a responsável pela morte dos animais. De acordo com Marasas & Rensburg (3), zearalenona é um composto altamente ativo, e em níveis de 1-5ppm na ração pode causar efeitos fisiológicos indesejáveis, resultando em perdas econômicas.

Tabela 1 - Procedência dos isolados dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Símbolos: \* = O número ao lado do gênero indica o número de protocolo da cultura

| Isolados                    | Hospedeiro | Variedade          | Procedência   |
|-----------------------------|------------|--------------------|---------------|
| <i>Fusarium</i> sp. (8)*    | milho      | Piranão            | Água Santa    |
| <i>Fusarium</i> sp. (9)     | milho      | C 501              | Cargill       |
| <i>Fusarium</i> sp. (10)    | milho      | Comp. plantas      | ESALQ         |
|                             |            | baixa              |               |
| <i>Fusarium</i> sp. (12)    | milho      | Agroceres 62       | Água Santa    |
| <i>Fusarium</i> sp. (14)    | milho      | Agroceres 62       | Água Santa    |
| <i>Fusarium</i> sp. (35)    | milho      | Agroceres 64       | Piracicaba    |
| <i>Fusarium</i> sp. (27)    | milho      | Piranão            | Quaira        |
| <i>Fusarium</i> sp. (64)    | milho      | TG E               | Jacarezinho   |
| <i>Fusarium</i> sp. (38)    | milho      | Comp. plantas      | ESALQ         |
|                             |            | baixa              |               |
| <i>Fusarium</i> sp. (29)    | milho      | C 507              | Cargill       |
| <i>Fusarium</i> sp. (21)    | milho      | Agroceres 62       | Água Santa    |
| <i>Aspergillus</i> sp. (82) | milho      | TG E               | Jacarezinho   |
| <i>Fusarium</i> sp. (32)    | milho      | C 501              | Cargill       |
| <i>Fusarium</i> sp. (68)    | milho      | TG E               | Jacarezinho   |
| <i>Penicillium</i> sp. (92) | milho      | TG E               | Jacarezinho   |
| <i>Fusarium</i> sp. (40)    | milho      | TG E               | Sta. Cruz     |
|                             |            |                    | Palmeiras     |
| <i>Fusarium</i> sp. (74)    | milho      | TG E               | Jacarezinho   |
| <i>Fusarium</i> sp. (83)    | milho      | AG 28              | Sto. Ant.     |
|                             |            |                    | Platina       |
| <i>Fusarium</i> sp. (109)   | milho      | TG E               | Jacarezinho   |
| <i>Fusarium</i> sp. (11)    | arroz      | Aguilha bico torto | Alegrete - RS |

Outros isolados que causaram a morte dos animais (Tabela 2), sem significante teor das toxinas testadas, provavelmente o fizeram por outros princípios tóxicos produzidos pelos mesmos isolados, princípios esses não estudados no presente trabalho.

No Brasil, poucos são os estudos sobre micotoxinas e os existentes, enfatizam apenas as aflatoxinas. Entretanto, os resultados obtidos no presente trabalho, demonstram que existem outros fungos de pós-colheita, os quais sob condições favoráveis, poderão produzir outras toxinas, além das aflatoxinas, igualmente tóxicas ao homem e animais, com diferentes quadros sintomatológicos.

### Conclusão

Os resultados do presente trabalho levaram à seguinte conclusão: espécies do fungo do gênero *Fusarium*, produtoras de zearalenona, determinaram alta incidência de letalidade nos animais.

### Agradecimentos

Os autores expressam seus agradecimentos à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro concedido para a realização desta pesquisa e ao Dr. R.M. Eppley, pela concessão dos padrões de micotoxina.

### Referências Bibliográficas

1. Barbosa, M.L.F. - Considerações e perspectivas sobre o problema das micotoxinas no Brasil. Anais do I Encontro Nacional de Micotoxinas, São Paulo, Sociedade Brasileira de Microbiologia, p.5-10, 1980.
2. Fishbein, L. - Health and toxicological aspects of mycotoxins. Nairobi, Joint FAO/WHO/UNEP Conference on Mycotoxins, Doc. MYC-4b, 14p. 1977.
3. Marasas, W.F.O. & Rensburg, van J. - In: - Horsfall, J.G. & Cowling, E.B., eds. - Plant disease: an advance treatise. New York, Academic Press, vol.4, p.357-379, 1979.
4. Salgado, J.M. - Levantamento de fungos toxicogênicos associados a cereais e seus subprodutos através de ensaio biológico com ratos albinos. Piracicaba, ESALQ/USP, 152p., 1979. (Tese de Doutoramento).
5. Salgado, J.M. & Carvalho, P.C.T. de - Fungos toxicogênicos associados a cereais. I - Levantamento da micoflora associada a milho, trigo e arroz. Rev. Microbiol. (São Paulo), 11:60-63, 1980.
6. Salgado, J.M. & Carvalho, P.C.T. de - Fungos toxicogênicos associados a cereais. II - Bioensaio com ratos albinos, com os isolados letais provenientes de milho, trigo e arroz. Rev. Microbiol. (São Paulo), 12:92-95, 1981.
7. Salgado, J.M. & Carvalho, P.C.T. de - Fungos toxicogênicos associados a cereais. III - Bioensaio com ratos albinos, com isolados não letais de milho, trigo e arroz. Rev. Microbiol. (São Paulo), 12:96-104, 1981.

Tabela 2 - Identificação e quantificação das micotoxinas (zearalenona, aflatoxina e ocratoxina) produzidas por isolados dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Número de animais aos quais essas toxinas foram letais.

Símbolos: \* = O número ao lado do gênero representa o número do protocolo da cultura;  
\*\* = dados já publicados (4)

| Isolados                    | Teores de micotoxina em ppm |                           |              | Nº de ratos mortos** |
|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|--------------|----------------------|
|                             | Zearalenona                 | Aflatoxina B <sub>1</sub> | Ocratoxina C |                      |
| <i>Fusarium</i> sp. (8)*    | <16                         | -                         | -            | (3)                  |
| <i>Fusarium</i> sp. (9)     | -                           | -                         | -            | (1)                  |
| <i>Fusarium</i> sp. (10)    | 16                          | -                         | -            | (3)                  |
| <i>Fusarium</i> sp. (12)    | 8                           | -                         | -            | (3)                  |
| <i>Fusarium</i> sp. (14)    | -                           | -                         | -            | (1)                  |
| <i>Fusarium</i> sp. (35)    | 8                           | -                         | -            | (1)                  |
| <i>Fusarium</i> sp. (27)    | <4                          | -                         | -            | (1)                  |
| <i>Fusarium</i> sp. (64)    | 40                          | -                         | -            | (3)                  |
| <i>Fusarium</i> sp. (38)    | 8                           | -                         | -            | (2)                  |
| <i>Fusarium</i> sp. (29)    | <4                          | -                         | -            | (1)                  |
| <i>Fusarium</i> sp. (21)    | <4                          | -                         | -            | (3)                  |
| <i>Aspergillus</i> sp. (82) | -                           | 0,5                       | 0,1          | (1)                  |
| <i>Fusarium</i> sp. (32)    | 4                           | -                         | -            | (1)                  |
| <i>Fusarium</i> sp. (68)    | 16                          | -                         | -            | (3)                  |
| <i>Penicillium</i> sp. (92) | -                           | -                         | -            | (3)                  |
| <i>Fusarium</i> sp. (40)    | =16                         | -                         | -            | (3)                  |
| <i>Fusarium</i> sp. (74)    | >16                         | -                         | -            | (3)                  |
| <i>Fusarium</i> sp. (83)    | = 4                         | -                         | -            | (1)                  |
| <i>Fusarium</i> sp. 109     | >16                         | -                         | -            | (3)                  |
| <i>Fusarium</i> sp. 11      | 8                           | -                         | -            | (3)                  |

## ESTUDO COMPARATIVO ENTRE TRICHODERMA VIRIDE E MYROTHECIUM VERRUCARIA NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS

Heládio Maynart de Faro  
 Alfredo Eduardo Maiorano  
 & Haroldo Hiss

Centro de Pesquisas Químicas  
 Instituto de Pesquisas e Estudos Industriais  
 Caixa Postal 721  
 09700 São Bernardo do Campo SP, Brasil

### Resumo

Estudo comparativo da produção de enzimas celulolíticas entre *Myrothecium verrucaria* e quatro variedades de *Trichoderma viride*, pelo processo de fermentação submersa em frascos agitados. As variedades de *T. viride* ATCC 24449 e ATCC 26921 apresentaram atividades enzimáticas finais e velocidades máximas de produção de celulase significativamente maiores do que os demais microrganismos testados. A parcela de celulase extracelular, que é adsorvida pela celulose, não é a mesma para todos os microrganismos testados, sendo as celulases produzidas pelas variedades ATCC 24449 e ATCC 26921, as que são menos adsorvidas.

### Summary

*Comparative study between Trichoderma viride and Myrothecium verrucaria for the production of cellulolytic enzymes*

Comparative study of *M. verrucaria* and four strains of *T. viride* for the production of cellulolytic enzymes under shake flask conditions. The *T. viride* ATCC 24449 and *T. viride* ATCC 26921 showed higher final enzymatic activity and maximum rate of cellulase production than the other microorganisms tested. The quantity of cellulase adsorbed by cellulose is conditioned on the microorganism that produce the cellulase.

### Introdução

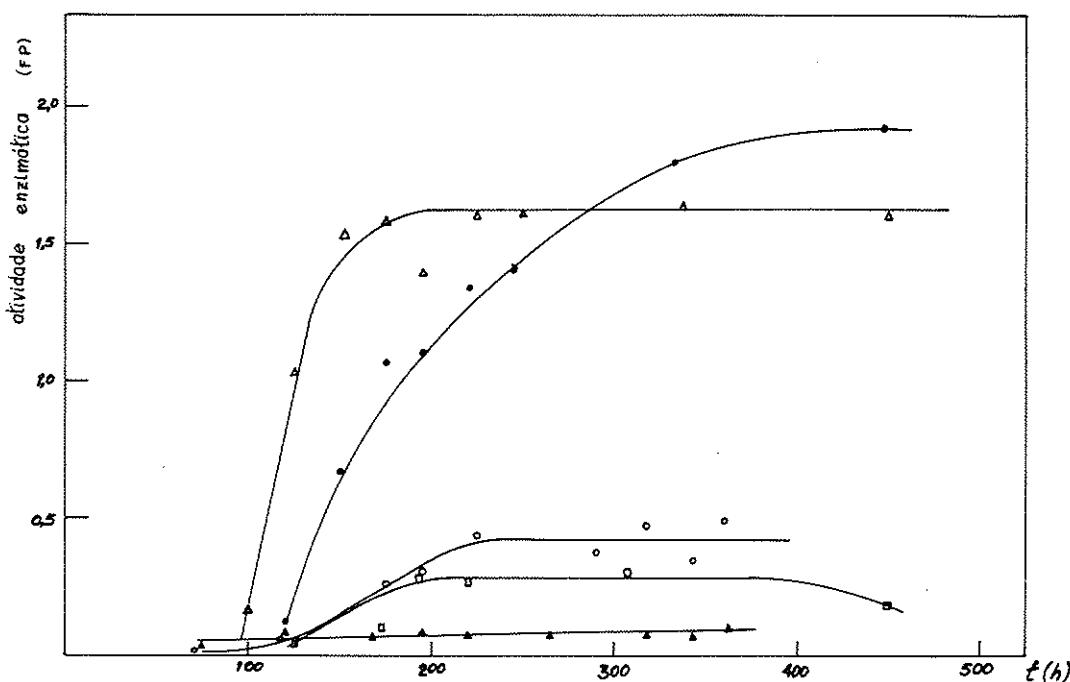
Os materiais celulósicos, dada sua grande quantidade e potencialidade de utilização como fonte renovável de energia, têm despertado o interesse de muitos pesquisadores. O aproveitamento energético da celulose pode ser realizado de várias maneiras entre as quais citamos a queima direta, a gaseificação e produção de álcool etílico.

O processo de produção do álcool etílico tem como etapas principais o pré-tratamento do material celulósico, a hidrólise, a fermentação e a destilação. Destas, a hidrólise é uma das fases limitantes do processo e pode ser realizada tanto por via ácida como enzimática. A hidrólise enzimática tem se mostrado mais adequada (4), apesar desta enfrentar problemas quanto ao pré-tratamento (3) dos materiais celulósicos e quanto à disponibilidade de microrganismos produtores de enzimas, com alta atividade celulolítica (9).

O interesse na utilização de enzimas celulolíticas deve-se em parte, ao aproveitamento dos resíduos celulósicos (bagáço de cana e resíduos agrícolas) para produção de álcool etílico e também como auxiliar na sacarificação do amido de mandioca (8). No processo de obtenção de álcool etílico, a partir da mandioca, as fases de dextrinização e sacarificação do amido podem ser melhoradas com o emprego de enzimas celulolíticas, pois estas hidrolisam as fibras celulósicas, que são protetoras dos grãos de amido, facilitando, assim, o ataque das amilases.

Entre os vários microrganismos produtores de enzimas celulolíticas, somente alguns fungos produzem celulase extracelular capaz de hidrolisar celulose nativa (2). Entre estes fungos, destacam-se: *Trichoderma viride*, *Trichoderma lignorum* e *Myrothecium verrucaria*. O presente trabalho relata os resultados de um estudo comparativo entre várias linhagens de *Trichoderma viride* e *Myrothecium verrucaria* quanto à produção de enzimas celulolíticas.

**Figura 1 - Atividade celulolítica (FP) em função do tempo de fermentação (t).**  
**Símbolos:** (●) = *T. viride* ATCC 24449; (Δ) = *T. viride* ATCC 26921; (○) = *M. verrucaria* ATCC 9095; (■) = *T. viride* ATCC 32098; (▲) = *T. viride* IB 267



#### Material e Métodos

**Microrganismos** - Foram testados *T. viride* ATCC 32098, *T. viride* ATCC 24449, *T. viride* ATCC 26921, *T. viride* IB 267, conservados em meio de Batata-Dextrose-Agar (1) e *Myrothecium verrucaria* ATCC 9095, conservado em meio Extrato-de-Malte-Agar marca Lalm ref. 37.

**Inóculo** - A um tubo de cultura pura foi adicionada água destilada e esterilizada e os esporos foram colocados em suspensão com auxílio de uma alça metálica (níquel-cromo). Cinco ml desta suspensão foram utilizados para inocular 50ml de meio de cultura sólido, descrito anteriormente, contido em Erlenmeyer de 1 litro de capacidade. Após inoculação, os Erlenmeyers foram incubados a 30°C por 10 dias. Ao

final deste período, foram adicionados 50ml de uma solução esterilizada em Tween 80 (0,1% v/v) e algumas pérolas de vidro. Após agitação manual, filtrava-se a suspensão, constituída por fragmentos de meio semi-sólido e esporos, em lâ de vidro (7).

A suspensão de esporos, obtida desta filtração, era usada como inóculo nos ensaios de fermentação. Em todos os ensaios, a concentração do inóculo era previamente determinada por contagem direta em hemacitômetro.

*Meio de cultivo* - Foi usado o meio descrito por Mandels & col. (5), usando-se como fonte de celulose, papel de filtro Whatman nº 1, cortado em quadrados de 5 x 5mm. 50ml de meio foram distribuídos em Erlenmeyers de 250ml com, 0,5g de celulose. Após esterilização, os Erlenmeyers foram inoculados com 1,0ml de suspensão de esporos, previamente mencionada e incubados em agitador reciproco a 30°C, com frequência de agitação de 100gpm e amplitude de 50mm.

*Determinação da atividade enzimática* - A cultura foi filtrada em membrana Millipore CSWP 04700. No filtrado foi realizada a determinação da atividade enzimática, pelo método "Filter Paper", descrito por Mandels & col. (6). A atividade celulolítica foi expressa em mg de glicose formada.

Tabela 1 - Parâmetros cinéticos obtidos a partir da Figura 1

|                                | Velocidade máxima de produção (FP/hx10 <sup>2</sup> ) | Máxima atividade enzimática (FP) | Tempo até máxima atividade (h) | Produtividade (FP/hx10 <sup>2</sup> ) |
|--------------------------------|---|----------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| <i>T. viride</i> ATCC 24449    | 1,96  | 1,88                             | 390                            | 0,48                                  |
| <i>M. verrucaria</i> ATCC 9095 | 0,26  | 0,43                             | 390                            | 0,11                                  |
| <i>T. viride</i> ATCC 26921    | 9,67  | 1,60                             | 205                            | 0,78                                  |
| <i>T. viride</i> ATCC 32098    | 0,27  | 0,30                             | 275                            | 0,11                                  |
| <i>T. viride</i> IB 267        | 0,05  | 0,12                             | 300                            | 0,04                                  |

Tabela 2 - Comparação entre a atividade enzimática máxima na solução filtrada e a atividade enzimática total

|                                | Máxima atividade enzimática (FP) |                  |             |
|--------------------------------|----------------------------------|------------------|-------------|
|                                | Total                            | Solução filtrada | Diferença % |
| <i>T. viride</i> ATCC 24449    | 2,34                             | 1,88             | 24,47       |
| <i>M. verrucaria</i> ATCC 9095 | 1,14                             | 0,43             | 165,12      |
| <i>T. viride</i> ATCC 26921    | 2,07                             | 1,60             | 29,38       |
| <i>T. viride</i> ATCC 32098    | 0,80                             | 0,30             | 166,67      |
| <i>T. viride</i> IB 267        | 0,37                             | 0,12             | 208,33      |

#### Resultados e Discussão

Os microrganismos testados apresentaram comportamento bastante diverso, quanto à produção de celulase extracelular. A atividade enzimática celulolítica (FP), em função do tempo de fermentação para os microrganismos testados, mostra claramente, que *T. viride* ATCC 26921 e *T. viride* ATCC 24449 se destacam dos demais, quanto à máxima atividade enzimática celulolítica (Figura 1).

Os principais parâmetros cinéticos (Tabela 1) foram construídos com dados da Figura 1. Nota-se que, em relação à velocidade máxima de produção de enzimas e a produtividade, *T. viride* ATCC 26921 mostra valores destes parâmetros maiores em cerca de 4,9 e 1,6 vezes, respectivamente, em relação a *T. viride* ATCC 24449. Apesar das diferenças citadas, os valores de máxima atividade enzimática são relativamente próximos (com diferença porcentual relativa de, aproximadamente, 17%), embora *T. viride* ATCC 26921 alcance, aproximadamente, na metade do tempo de *T. viride* ATCC 24449.

Outro aspecto importante, notado, diz respeito à adsorção da celulase pela celulose, fato já observado por outros pesquisadores (10). Com a finalidade de determinar-se toda a celulase produzida pelo microrganismo, o conteúdo de uma amostra final do ensaio de fermentação era fragmentado em presença de pérolas de vidro, com agitação manual. A seguir, era filtrado em membrana Millipore, determinando-se a atividade celulolítica.

Uma parcela significativa da celulase extracelular fica adsorvida na celulose residual (Tabela 2). Desde que a celulase consiste em uma mistura de exo e endo-glu-

canases, agindo sinergeticamente sobre a celulose (10) e que cepas diferentes de microrganismos podem produzir celulases com proporções diferentes de endo e exo-glucanases, é provável que estas enzimas sejam adsorvidas, diferentemente, pela celulose residual, levando, desta maneira, o complexo enzimático celulase, a apresentar uma adsorção global diferente, variando de cepa para cepa. Por outro lado, a diferença de adsorção pode ser devida à maior ou menor concentração de celulose residual, embora a produção de celulase não esteja, necessariamente, associada à quantidade de material celulósico hidrolisado (4).

Sob ponto de vista industrial, este aspecto é importante, para a escolha do microrganismo produtor de celulase, uma vez que as enzimas, menos adsorvidas, apresentam maior rendimento de separação do caldo de fermentação.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

#### Referências Bibliográficas

1. American Type Culture Collection - Catalogue of strains. 14.ed. Maryland, USA, vol.1, p.525, 1980.
2. Enari, T.M. & Markkanen, P. - Production of cellulolytic enzymes by fungi. *Advan. Biochem. Eng.*, 5:1-24, 1977.
3. Kelsey, R.G. & Shafizadeh, F. - Enhancement of cellulose accessibility and enzymatic hydrolysis by simultaneous wet milling. *Biotechnol. Bioeng.*, 22:1025-1036, 1980.
4. Linko, M. - An evaluation on enzymatic hydrolysis of cellulosic materials. *Advan. Biochem. Eng.*, 5:27-46, 1977.
5. Mandels, M. & Weber, J. - The production of cellulases. *Adv. Chem. Ser.*, 95:341-414, 1969.
6. Mandels, M.; Andreotti, R. & Roche, C. - Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 6:21-23, 1976.
7. Martin, V.M.N.C. - Contribuição ao estudo do cultivo de *Aspergillus oryzae* em meio contendo farinha de mandioca como principal fonte de carbono. São Paulo, Escola Politécnica, 1973. (Tese de Mestrado).
8. Menezes, J.J.B.; Arakaki, T.; Delano, P.R. & Sales, A.M. - Fungal cellulases as an aid for the saccharification of cassava. *Biotechnol. Bioeng.*, 20:555-565, 1978.
9. Reese, E.T. - Summary statement on enzyme system. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 5:77-80, 1975.
10. Sun, T.H. - Comments on the papers presented at the cellulase production session. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 6:83-89, 1976.

## RESISTÊNCIA TÉRMICA DE ESPOROS DE *BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS FS 1518* EM SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO M/15 (pH = 7,0)

Renato Baruffaldi

Thereza Christina Vessoni Penna

Ricardo Schuch

Luiz Antonio Gioielli

Ronaldo Nogueira de Moraes Pitombo

Irene Alexeevna Machoshvili

& Lúcia Eiko Abe

Deptº de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP

Caixa Postal 30786

01051 São Paulo SP, Brasil

### Resumo

Usou-se a técnica de tubos capilares e o cálculo estatístico do Número Mais Provável de sobreviventes na determinação da resistência térmica de esporos de *Bacillus stearothermophilus* FS 1518 em solução tampão fosfato M/15 (pH = 7,0). Para uma população inicial de  $4,84 \times 10^4$  esporos/ml os valores "D", em minutos, estimados a partir do número de amostras com crescimento positivo e de esporos sobreviventes obtidos da equação de Halvorson foram, respectivamente: 3,57 e 3,70 a 250°F; 1,63 e 1,65 a 255°F; 0,84 e 0,86 a 260°F; 0,36 e 0,37 a 265°F; 0,16 e 0,16 a 270°F. O valor de z variou de 14,9°F a 15,5°F e correspondeu a uma energia de ativação de 89,93 Kcal/mol.

### Summary

*Thermal resistance of spores of Bacillus stearothermophilus FS 1518 in phosphate buffer M/15 (pH = 7.0)*

Heat resistance parameters were determined for the spores of *Bacillus stearothermophilus* FS 1518 in phosphate buffer M/15 (pH = 7,0), using the capillary tube method. For an initial population of  $4,84 \times 10^4$  spores/ml, the "D" values obtained from the number of positive growth samples and of outliving spores estimated from Halvorson equation, were, respectively: 3.57 and 3.70 at 250°F; 1.63 and 1.65 at 255°F; 0.84 and 0.86 at 260°F; 0.36 and 0.37 at 265°F; 0.16 and 0.16 at 270°F. The interval of z value was 14.9 - 15.5°F, corresponding to an activation energy of 89,93 Kcal/mol.

### Introdução

Os esporos de *Bacillus stearothermophilus* FS 1518, por apresentarem a maior termoresistência, experimentalmente, verificada (11), são, largamente, empregados como parâmetros da eficácia dos processos de esterilização (1, 11).

As células vegetativas de *B. stearothermophilus*, ao se desenvolverem em alimentos

enlatados de baixa acidez, causam alteração do tipo "FLATSOUR". Os esporos de *B. stearothermophilus* são frequentemente encontrados em branqueadores e nos rotores das bombas centrífugas.

Devido a enorme variação na resistência térmica de esporos de mesma cepa de microrganismos, em diferentes substratos, preparados aparentemente sob condições idênticas, emprega-se, na maioria dos desenvolvimentos TDT, a solução tampão fosfato M/15 (pH = 7,0) como substrato de aquecimento de referência (11).

O método de aquecimento de microrganismo em tubos TDT, selados, na determinação da resistência térmica, tem sido largamente empregado, desde a introdução por Bigelow & Esty em 1920 (11). São utilizados tubos de diâmetro variando entre 3 e 10mm (1, 2, 4, 5, 7, 11), ampolas (11) ou frascos de soro selados de 3 a 5cm<sup>3</sup> de capacidade (8). A determinação do número de esporos sobreviventes é realizada diretamente por contagem de colônias ou, indiretamente, através do procedimento estatístico do Número Mais Provável, quando o desenvolvimento dos esporos sobreviventes é evidenciado ou pela formação de gás ou por produção de ácido que muda para amarelo a cor do indicador púrpura de bromocresol.

O método dos tubos capilares, primariamente, desenvolvido por Stern & Proctor (10), apresenta extensa aplicação, podendo ser empregado em opção aos tubos TDT no estudo da termoresistência de esporos (3, 8). A dimensão dos tubos capilares favorece a transferência de calor no aquecimento e resfriamento do meio inoculado, considerados instantâneos.

O objetivo do trabalho em questão é avaliar a termoresistência dos esporos de *Bacillus stearothermophilus* FS 1518 em meio de tampão fosfato M/15 (pH = 7,0), utilizando o método dos tubos capilares e o procedimento estatístico do Número Mais Provável de esporos sobreviventes, empregando o caldo triptona-glicose-púrpura de bromocresol como meio de subcultura.

#### **Material e Métodos**

A preparação das suspensões aquosas de esporos, realizada de acordo com Stumbo (11), consistiu na produção dos esporos de *Bacillus stearothermophilus* FS 1518 em ágar nutritivo, purificação e armazenamento a temperatura de 4°C.

A resistência térmica dos esporos foi medida pelo método de Stern & Proctor (10).

Aliquotas de 0,01ml de solução tampão fosfato M/15 (pH = 7,0), inoculada com suspensão de esporos (10<sup>4</sup>/ml), previamente aquecida a temperatura de 100°C durante 20 minutos, foram transferidas, com o auxílio de microseringa (1/1000) "Terumo-UMSG-10-N 50 B", para tubos capilares selados à chama e estocados a 4°C durante 12 horas. Os tubos capilares apresentavam as seguintes dimensões: 76mm de comprimento, 105mm de diâmetro externo e 0,8mm de diâmetro interno.

Para o tratamento térmico, dez tubos capilares, inoculados, foram utilizados para cada tempo de aquecimento, dispostos vertical e isoladamente em cestos de aço inoxidável e mergulhados em banho de óleo agitado, termostaticamente controlado. Para cada temperatura foram utilizados cinco tempos diferentes (Tabela 1), procedendo-se o resfriamento em água a temperatura de 5°C.

Cada tubo capilar, após resfriamento, foi transferido para tubo de ensaio contendo 3ml de caldo triptona-glicose-púrpura de bromocresol. O tubo capilar com inóculo sem ser submetido ao aquecimento foi transferido para 3ml de água destilada estéril. Os capilares foram quebrados com o auxílio de bastão de vidro.

A contagem inicial de esporos foi realizada empregando-se "Plate Count Agar" (Difco) adicionado de 0,1% de amido, a partir da suspensão aquosa.

As culturas foram incubadas a 55°C por 48 horas, para efeito de contagem e 168 horas para os meios com indicador, cuja viragem de cor de púrpura para amarelo decorria de alteração no valor de pH, provocada por crescimento microbiano.

#### **Resultados e Discussão**

Para tubos capilares o "lag" de aquecimento, se existente, é considerado

desprezível e portanto, o tempo de trabalho não é corrigido (10, 11). Admite-se, assim, que a solução tampão fosfato M/15 (pH = 7,0), inoculada de esporos de *B. stearothermophilus* FS 1518, atingiu a temperatura de tratamento no momento da imersão dos tubos capilares no meio de aquecimento.

Os dados obtidos de resistência térmica dos esporos de *B. stearothermophilus*, em solução tampão, através da técnica do tubo capilar, apresentados na Tabela 1, permitem calcular os valores "D" a partir do número inicial de microrganismos e de sobreviventes, após um tempo definido, para cada temperatura estudada. Para tanto, assume-se a morte dos esporos como sendo logarítmica comparável a uma reação de primeira ordem.

O cálculo do tempo de redução decimal foi realizado através do procedimento estatístico do Número Mais Provável de sobreviventes (11), utilizando-se a equação:

$$D = \frac{t}{\log a - \log b}$$

onde: a é a população inicial de esporos, por mililitro de solução tampão fosfato, aproximadamente, igual a  $4,84 \times 10^4$ ; b é o número de amostras que se mostraram positivas para o crescimento em subculturas ou o Número Mais Provável de esporos sobreviventes e t é o tempo de aquecimento a temperatura de tratamento.

O Número Mais Provável de esporos sobreviventes foi determinado pela equação de Halvorson & Ziegler (11):  $\bar{x} = \frac{2,303}{V} \cdot \log \frac{n}{q}$

onde:  $\bar{x}$  é o Número Mais Provável de esporos sobreviventes, por mililitro de solução tampão fosfato; V é o volume, em mililitros, de cada amostra aquecida; n é o número de amostras replicadas sujeitas a mesma combinação tempo-temperatura de aquecimento; q é o número de amostras, submetidas a esta combinação tempo-temperatura de aquecimento, que resultaram negativas para crescimento em subculturas.

A partir das constantes de velocidade de destruição térmica (Tabela 2), e do inverso das temperaturas de tratamentos, aplicou-se o método de regressão linear, através dos mínimos quadrados, determinando-se a inclinação da reta (Figura 1), que forneceu o valor de energia de ativação igual a 89,93 Kcal/mol. Se comparada ao dado proposto por Shih (9), de 88,6 Kcal/mol, verifica-se que os valores são muito próximos.

A partir das curvas de tempo de sobrevivência, de morte e dos tempos médios de redução decimal em função da temperatura de tratamento, obtiveram-se os valores de "z" num intervalo de 14,9°F a 15,5°F (Figura 2).

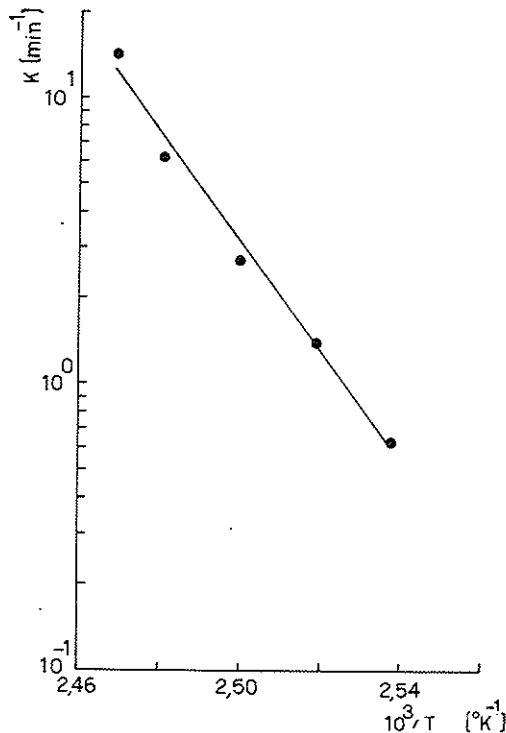
O intervalo de tempo de redução decimal, a temperatura de 250°F, obtido, foi de 3,57 a 3,70 minutos; coincidente ao proposto por Stumbo (11) e Karel (6); ao encontrado por Gibriel (4), ao utilizar salmouras de quiabo, feijão e ervilha como substratos de aquecimento; e ao obtido por Mikolajcik (8) ao empregar meios à base de proteína de leite e de soja.

Tabela 1 - Dados de resistência térmica e de redução decimal (D), de esporos de *Bacillus stearothermophilus* FS 1518, em solução tampão fosfato M/15 (pH = 7,0), empregando-se a técnica do tubo capilar.

Símbolos:  $\bar{x}$  = Número Mais Provável de esporos sobreviventes calculado pela equação de Halvorson; A = valor "D" calculado a partir de  $\bar{x}$ ; B = valor "D" calculado a partir do número de amostras positivas

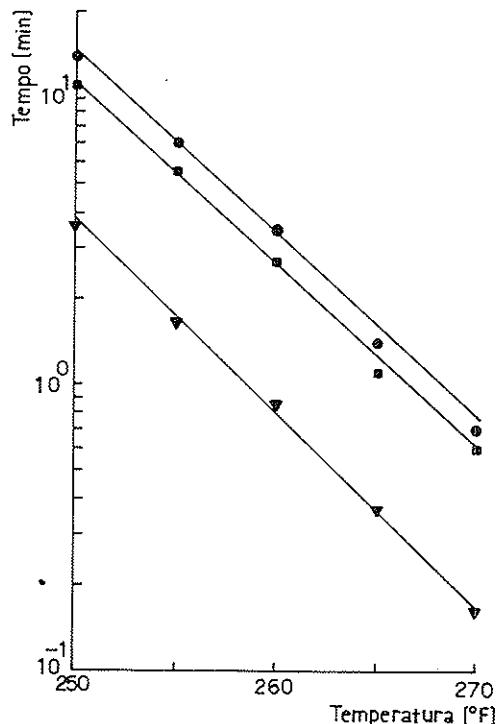
| Temperatura (°F) | Tempo (min) | Nº amostras aquecidas | Nº amostras positivas | $\bar{x}$ | Valor "D" (min) |       |
|------------------|-------------|-----------------------|-----------------------|-----------|-----------------|-------|
|                  |             |                       |                       | A         | B               |       |
| 250              | 0,0         | 10                    | 10                    |           |                 |       |
|                  | 6,0         | 10                    | 10                    |           |                 |       |
|                  | 9,0         | 10                    | 9                     |           |                 |       |
|                  | 11,0        | 10                    | 4                     | 5,10      | 3,695           | 3,568 |
|                  | 14,0        | 10                    | 0                     |           |                 |       |
| 255              | 20,0        | 10                    | 0                     |           |                 |       |
|                  | 0,0         | 10                    | 10                    |           |                 |       |
|                  | 3,0         | 10                    | 8                     |           |                 |       |
|                  | 4,5         | 10                    | 8                     | 2,23      | 1,648           | 1,625 |
|                  | 5,5         | 10                    | 2                     |           |                 |       |
| 260              | 7,0         | 10                    | 0                     |           |                 |       |
|                  | 10,0        | 10                    | 0                     |           |                 |       |
|                  | 0,0         | 10                    | 10                    |           |                 |       |
|                  | 1,5         | 10                    | 10                    |           |                 |       |
|                  | 2,2         | 10                    | 8                     | 3,57      | 0,862           | 0,842 |
| 265              | 2,7         | 10                    | 3                     |           |                 |       |
|                  | 3,5         | 10                    | 0                     |           |                 |       |
|                  | 5,0         | 10                    | 0                     |           |                 |       |
|                  | 0,0         | 10                    | 10                    |           |                 |       |
|                  | 0,7         | 10                    | 7                     |           |                 |       |
| 270              | 1,1         | 10                    | 4                     | 5,10      | 0,370           | 0,357 |
|                  | 1,4         | 10                    | 0                     |           |                 |       |
|                  | 1,7         | 10                    | 0                     |           |                 |       |
|                  | 2,5         | 10                    | 0                     |           |                 |       |
|                  | 0,0         | 10                    | 10                    |           |                 |       |
|                  | 0,4         | 10                    | 10                    |           |                 |       |
|                  | 0,6         | 10                    | 1                     |           |                 |       |
|                  | 0,7         | 10                    | 0                     | 1,05      | 0,164           | 0,163 |
|                  | 0,9         | 10                    | 0                     |           |                 |       |
|                  | 1,2         | 10                    | 0                     |           |                 |       |

**Figura 1 - Efeito da temperatura na constante de velocidade de reação para esporos de *Bacillus stearothermophilus* FS 1518 em solução tampão fosfato M/15 (pH = 7,0).**



**Figura 2 - Curvas de destruição térmica para esporos de *Bacillus stearothermophilus* FS 1518 em tampão fosfato M/15 (pH = 7,0).**

Símbolos: ( $\nabla$ ) = tempo de destruição térmica; ( $\blacksquare$ ) = tempo de sobrevivência; ( $\bullet$ ) = tempo de morte



Os valores obtidos por Hayakawa (5) ( $D_{250^{\circ}F} = 1,2\text{min}$ ), Collier (2) ( $D_{250^{\circ}F} = 9,0\text{min}$ ), Borzani (1) ( $D_{250^{\circ}F} = 1,8\text{min}$ ), empregando solução tampão fosfato M/15 (pH = 7,0), como substrato de aquecimento, e por Davies (3) que encontrou  $D_{250^{\circ}F} = 6,45\text{min}$  para o leite e  $D_{250^{\circ}F} = 13,10\text{min}$ , para a água destilada, utilizando o método dos tubos capilares, apresentaram-se bastante distintos entre si e aos valores do trabalho em questão.

O intervalo de valores z calculados ajusta-se àquele proposto por Stumbo (11), Shih (9), distanciando-se muito do valor z obtido por Leitão (7) ( $z = 30,6^{\circ}F$ ) que estudou a resistência térmica de esporos de *B. stearothermophilus* FS 1518 em purê de banana, com pH = 6,6.

Embora a solução tampão fosfato M/15 (pH = 7,0) seja considerada substrato de aquecimento de referência, no estudo da determinação térmica de esporos, se a metodologia empregada for uniforme, os valores  $D_{250^{\circ}F}$ , para esporos de mesma cepa, não coincidem. Provavelmente devido a fatores ambientais, condições de esporulação, cepa de microrganismos, método de enumeração, tipo de equipamento utilizado para os tratamentos térmicos.

**Tabela 2 - Constantes de velocidade de destruição térmica (K) e tempos médios de redução decimal (D) de esporos de *Bacillus stearothermophilus* FS 1518 em solução fosfato M/15 (pH = 7,0)**

| Temperatura (°F) | D (min) | K(min⁻¹) |
|------------------|---------|----------|
| 250              | 3,64    | 0,63     |
| 255              | 1,64    | 1,40     |
| 260              | 0,85    | 2,71     |
| 265              | 0,37    | 6,22     |
| 270              | 0,16    | 14,39    |

Para os esporos de *B. stearothermophilus* FS 1518, considerados parâmetros de esterilização, o tratamento efetuado a 121°C para reduzí-los de 5 ciclos logarítmicos, requer 20 minutos, e se mostra suficiente para inativar os esporos de *Clostridium botulinum* de 12 ou mais ciclos logarítmicos, assumindo a solução tampão fosfato M/15 (pH = 7,0), como substrato de aquecimento de referência.

#### Referências Bibliográficas

1. Borzani, W.; Lima, U. de A. & Aquarone, E. - Biotecnologia: engenharia bioquímica. São Paulo, Edgard Blücher, p.96-104, vol.3, 1975.
2. Collier, C.P. & Townsend, D.T. - The resistance of bacterial spores to superheated steam. *J. Food Technol.*, 10:477-481, 1956.
3. Davies, F.L.; Underwood, H.M.; Perkins, A.G. & Burton, H. - Thermal death Kinetics of *Bacillus stearothermophilus* spores at ultra-high temperatures. *J. Food Technol.*, 12:115-129, 1977.
4. Gribel, A.Y. & Abd-Et, A.T.H. - Measurement of heat resistance parameters for spores isolated from canned products. *J. Appl. Bact.*, 36:321-327, 1973.
5. Hayakawa, K. - Modernos conceitos e técnicas na avaliação da esterilização de alimentos. Campinas, Fundação CTIPTA, 236p., 1971.
6. Karel, M.; Fennema, O.R. & Lund, D.B. - Principles of food science. II - Physical principles of food preservation. New York, Marcel Dekker, v.4, p.31-92, 1975.
7. Leitão, M.F. de F.; Falomir, C.A.O.; Ciampi, C. & Quast, D. - Resistência térmica de *Bacillus stearothermophilus* FS 1518 e *Clostridium PA* 3679 em purê de banana natural. *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, 8:313-327, 1977.
8. Mikolajcik, E.M. & Rajkowski, T. - Simple technique to determine heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores in fluid systems. *J. Food Prot.*, 43:799-804, 1980.
9. Shih, S.C.; Cuevas, R.; Porter, V.L. & Cheryan, M. - Inactivation of *Bacillus stearothermophilus* spores in soybean water extracts at ultra-high temperatures in scraped-surface heat exchanger. *J. Food Prot.*, 45:145-149, 1982.
10. Stern, J.A. & Proctor, B.E. - A micro-method and apparatus for the multiple determination of rates of destruction of bacteria and bacterial spores subjected to heat. *J. Food Technol.*, 8:139-143, 1954.
11. Stumbo, C.R. - Thermobacteriology in food processing. New York, Academic Press, 329p., 1973.

**APLICAÇÃO DO LAL (LIMULUS AMEBOCYTE LYSATE) PARA A DETECÇÃO  
DE PIROGÊNIO EM SOROS HIPERIMMUNES. ESTUDO COMPARATIVO COM O  
MÉTODO TRADICIONAL EM COELHOS**

Mary Dalva Caparroz Vancetto  
 Maria Laura Sales Rodrigues Lima  
 Estevam Rubens Gonçalves Moura  
 Newton Pereira Santos  
 & Bruno Soerensen

Divisão de Microbiologia e Imunologia  
 Instituto Butantan  
 Av. Vital Brasil, 1500  
 05503 São Paulo SP, Brasil

**Resumo**

Para a liberação dos soros hiperimunes é recomendada em normas da O.P.S./O.M.S., a realização da prova de pirogênio em coelhos. Existem trabalhos com o intuito de substituir o método "in vivo" por um método "in vitro" na detecção de substâncias pirogênicas, pois, o método "in vivo" exige condições constantes quanto às características físicas do animal de prova, do ambiente de trabalho e na execução da prova, condições difíceis de serem conseguidas. Estudou-se comparativamente ao método "in vivo" a eficiência da prova "in vitro" LAL (Limulus Amebocyte Lysate) para detecção de pirogênio em soros hiperimunes. Os autores concluem que é indispensável que o soro hiperimune a ser testado esteja com uma concentração proteica abaixo de 10g% para não se ter uma resposta falso-negativa. Das provas de pirogênio positivas em coelhos, 40,00% foram devidas à presença de endotoxinas bacterianas de germes Gram negativos e 46,66% decorrentes de outros fatores. Em número reduzido de soros (13,33%), foram detectadas pequenas quantidades de endotoxinas bacterianas de germes Gram negativos pela prova "in vitro" LAL que não foram capazes de induzir hipertermia em coelhos.

**Summary**

*Application of the LAL (Limulus Amebocyte Lysate) for detection of pyrogen in hyperimmune serums. Comparative study with the traditional method in rabbits*

For liberation of the hyperimmune sera is recommended by O.P.S./O.M.S. norms the realization of the pyrogen proof in rabbits. There are proceedings with intention to replace the "in vivo" method by an "in vitro" method for the detection of the pyrogenic substances since the "in vivo" method requires constant conditions of physical characteristics of the experimental animal, the work environment and the proof execution. Comparatively it was studied the efficiency of the "in vitro" proof LAL (Limulus Amebocyte Lysate) to the "in vivo" method for pyrogen detection in hyperimmune sera. The authors conclude that is indispensable for the

hyperimmune serum to be tested a protein concentration under 10g% in order to avoid false-negative results. 40.00% of the positive pyrogen proofs in rabbits, was due to the presence of bacterial endotoxin by Gram negative germs and 46,66% by other factors. In a reduced number of sera (13,33%) the "in vitro" LAL test detected quantities of bacterial endotoxins of Gram negative germs that were not able to induce hyperthermia in rabbits.

### Introdução

Para a liberação de soros hiperimunes é recomendada em normas da O.P.S./O.M.S., a realização da prova de pirogênio em coelhos (9). Esta prova, entretanto, exige condições constantes na sua metodologia, tais como raça do animal, sexo, peso, idade, condições de saúde, temperatura ambiental, ausência de ruídos e todo cuidado no momento da manipulação do animal, condições estas que com relativa frequência não se pode conseguir.

Existem trabalhos com o intuito de substituir o método "in vivo" por um método "in vitro" na detecção de substâncias pirogênicas. A partir de estudos feitos por Bang (1) sobre a coagulação intravenosa em caranguejos da espécie *Limulus polyphemus* por bactérias Gram negativas, Levin & Bang (4) constataram que esta coagulação ocorria na presença de bactérias Gram negativas e, que a gelificação ocorria na presença de endotoxinas e proteínas coaguláveis encontradas nos amebócitos destes animais (5), originando o reagente LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*).

Evidentemente, não somente as endotoxinas detectáveis através da prova "in vitro" LAL determinam pirogênio no produto, fator este que limita as possibilidades da referida prova.

O objetivo deste trabalho é avaliar a eficiência desta prova, para a detecção de pirogênio em soros hiperimunes em comparação ao método oficial, em coelhos.

### Material e Métodos

*Soros hiperimunes produzidos em cavalos pelo Instituto Butantan - Anti-ofídico, anti-botrópico, anti-crotálico, anti-elápido, anti-laqüético, anti-botrópico-laquético, anti-escorpiônico, anti-aracnídico, anti-loxoscelílico, anti-tetânico, anti-diftérico, anti-gangrenoso e anti-botulínico "AB".*

Tabela 1 - Preparo dos controles positivos das amostras

| Amostras<br>(soros, água des-<br>tilada ou solu-<br>ção salina) | Volume adicionado<br>(ml) | Endotoxina<br>adicionada<br>(ml) | Agitação me-<br>cânica por<br>60 segundos | Concentração<br>final de en-<br>dotoxina |
|---|---------------------------|----------------------------------|---|--|
| Mistura I<br>9,0ml da amostra                                   | -                         | 1,0ml <i>E.coli</i><br>2,0ng/ml  |   | 0,20ng/ml                                |
| Mistura II<br>5,0ml da amostra                                  | 5,0ml Mistura I           | -                                |   | 0,10ng/ml                                |
| Mistura III<br>5,0ml da amostra                                 | 5,0ml Mistura II          | -                                |   | 0,05ng/ml                                |

*Reagentes LAL: "Limulus Amebocyte Lysate Pyrogent" - Single test Mallinckrodt Inc.*  
- As amostras dos soros hiperimunes foram colhidas em frascos apirogênicos, para testes "in vitro" e "in vivo".

Os testes de pirogênio "in vivo" foram feitos conforme normas da O.P.S./O.M.S. (9), usando-se 3 coelhos com peso igual ou acima de 1,5kg por prova. Através de termômetros retais, determinava-se a temperatura normal de cada coelho que não deveria estar abaixo de 38,9°C e nem acima de 39,8°C. Após 30 minutos, injetava-se pela veia marginal da orelha o soro teste, numa quantidade de 3ml por Kg de peso do animal. Registravam-se as temperaturas logo após as inoculações e também, após 1, 2 e 3 horas. O aumento de temperatura aceito é de até 1,1°C para um dos três coelhos e, 2,8°C para a soma das 3 temperaturas (7). Em caso de repetições de provas duvidosas, usavam-se 5 coelhos.

Para o teste "in vitro" empregamos: a) Endotoxina de *E. coli* liofilizada, reconstituída com 5,0ml de água destilada tornada apirogênica por agitação mecânica por 30 minutos, resultando 2,0ng/ml de atividade; b) Tubos-teste contendo um lisado de amebócitos de *Limulus* liofilizado, capaz de detectar de 0,01-0,05ng/ml de endotoxina de *E. coli* e de 0,015-0,250ng/ml de endotoxina de referência FDA.

Nos soros testados foram observados os limites aceitáveis de pH (6,0 a 7,5); concentração de proteína ( $\leq 10\%$ ); de cloreto ( $\leq 3\%$ ) e do fenol ( $< 1\%$ ), pois, se estes parâmetros estivessem discordantes, teríamos uma resposta inibitória na formação do gel (6).

Em determinados casos, foi necessária a correção da concentração de proteína dos soros quando esta se encontrava igual ou acima de 10%. Estes soros foram diluídos 1:2 em água destilada apirogênica e em solução salina 0,85% apirogênica, a fim de se observar qual seria o melhor diluente.

De acordo com a sensibilidade do lote de "LAL" usado, adicionava-se diretamente aos tubos-teste contendo o lisado de amebócitos de *Limulus* liofilizado, 0,25ml de cada amostra de solução controle a ser testada: a) Amostras - 0,25ml de soro, água destilada despirogenizada ou solução salina 0,85% despirogenizada; b) Controles positivos - Para cada amostra testada, foram feitos três controles contendo diferentes concentrações de endotoxina de *E. coli* conforme a Tabela 1.

Os tubos colocados em banho-maria a 37°C foram deixados por 1 e 2 horas (6, 8).

As leituras foram feitas retirando-se cuidadosamente os tubos do banho-maria e invertendo-os a 180° para se observar a formação ou não do gel. Um teste positivo é definido quando há formação de um gel firme, capaz de manter-se íntegro quando o tubo é invertido à 180° e um teste negativo é caracterizado pela ausência total de gel ou pela formação de uma massa viscosa que não se mantém íntegra quando invertida à 180°. Isto acontece quando a concentração de endotoxina é menor que o nível mínimo de sensibilidade, podendo causar flocação, granulação e/ou aumento da viscosidade. Tais reações são, entretanto, consideradas negativas (3, 6).

Tabela 3 - Resultado das provas de pirogênia realizadas "in vivo" em coelhos e "in vitro" pelo LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*), em soros hipermunes.

Símbolos: \* = Soro diluído 1:2 em água destilada e solução salina - 0,85%, despirogenizadas

Tabela 2 - Comparação dos resultados obtidos através das provas "in vitro" - LAL e "in vivo" em coelhos para detecção de pirogênio

| Soros            | Nº de soros testados | Resultados idênticos para os dois tipos de testes | Resultados % |
|------------------|----------------------|---|--------------|
| Anti-peçonhentos | 70                   | 48  | 68,57        |
| Anti-tóxicos     | 20                   | 15  | 75,00        |
| Total            | 90                   | 63  | 70,00        |

| Resultados                                   | Negativo para as provas "in vivo" e "in vitro" | Positivo para as provas "in vivo" e "in vitro" | Positivo para as provas "in vitro" e negativo para as "in vivo" | Negativo para as provas "in vitro" e positivo para "in vivo" |
|--|--|--|---|--|
| Soros  |  |  |   |  |
| Anti-peçonhentos ( $TP \geq 10\text{g}\%$ )  | 31/54 (57,41%)                                 | 0/54 (0,00%)                                   | 0/54 (0,00%)  | 11/54 (20,37%)   |
| Anti-peçonhentos* ( $TP \geq 10\text{g}\%$ ) | 31/54 (57,41%)                                 | 7/54 (12,96%)                                  | 5/54 (9,26%)  | 11/54 (20,37%)   |
| Anti-tóxicos ( $TP \geq 10\text{g}\%$ )      | 6/19 (31,58%)                                  | 0/19 (0,00%)                                   | 0/19 (0,00%)  | 5/19 (26,31%)  |
| Anti-tóxicos* ( $TP \geq 10\text{g}\%$ )     | 6/19 (31,58%)                                  | 8/19 (42,11%)                                  | 0/19 (0,00%)  | 5/19 (26,31%)  |
| Anti-peçonhentos ( $TP < 10\text{g}\%$ )     | 8/16 (50,00%)                                  | 2/16 (12,50%)                                  | 1/16 (6,25%)  | 5/16 (31,25%)  |
| Anti-tóxicos ( $TP < 10\text{g}\%$ )         | 0/1 (0,00%)                                    | 1/1 (100,00%)                                  | 0/1 (0,00%)   | 0/1 (0,00%)  |

## Resultados

Os resultados foram idênticos tanto para os soros diluídos em solução salina 0,85%, como quando diluídos em água destilada, acontecendo o mesmo com os controles.

As leituras realizadas após 1 e 2 horas de incubação a 37°C foram idênticas.

Os resultados foram idênticos nas provas "in vivo" e "in vitro" em 68,57% dos soros anti-peçonhetos e 75,00% dos soros anti-tóxicos, fornecendo uma concordância global de 70,00% (Tabela 2).

As provas realizadas com soros com taxas proteicas iguais ou superiores a 10g% foram sempre negativas, entretanto, após diluição, apresentavam uma positividade de 12,96% e 42,11% respectivamente para os soros anti-peçonhetos e anti-tóxicos (Tabela 3).

A positividade das provas de pirogênio realizadas em coelhos foi de 86,66%, dos quais 40,00% também foram detectados através da prova "in vitro" (Tabela 4).

A positividade das provas "in vitro" não detectada nas provas "in vivo" foi de 13,33% (Tabela 4).

## Discussão

Foi verificado que, conforme assinalado na literatura (6), existe interferência na prova "in vitro" quando a concentração proteica do material biológico é igual ou superior à 10g% (Tabela 3).

No total de 45 soros positivos, 86,66% foram detectados através da prova "in vivo" em coelhos e 53,33% através da prova "in vitro", sendo que 40,00% destes resultados foram coincidentes para as duas provas, podendo ser decorrentes da presença de endotoxinas de bactérias Gram negativas. Dos soros positivos pela prova "in vitro", 13,33% não foram detectados pela prova "in vivo", talvez devido ao teste LAL ter maior sensibilidade na detecção de endotoxinas de bactérias Gram negativas (2, 8, 10) (Tabela 4).

Dos soros pirogénicos detectados somente através da prova "in vivo" em coelhos, 46,66% poderiam ser decorrentes de outras substâncias pirogênicas que não endotoxinas de bactérias Gram negativas (6) (Tabela 4), o que explicaria o resultado negativo pela prova "in vitro".

## Conclusão

É indispensável a diluição dos soros hiperimunes com taxa proteica igual ou acima de 10g% pois existe interferência de taxas proteicas elevadas nas provas "in vitro" LAL.

Nas amostragens estudadas, pode-se concluir que 40,00% das provas de pirogênio positivas em coelhos, foi devido à presença de endotoxinas bacterianas por germes Gram negativos e 46,66%, decorrentes de outros fatores. O conteúdo de pequenas quantidades de endotoxinas bacterianas, de germes Gram negativos detectados pela prova "in vitro" LAL e que não foi capaz de introduzir hipertermia em coelhos, foi de 13,33%.

O LAL é um teste de muita sensibilidade na detecção de endotoxinas, podendo ser utilizado na triagem de soros, e se positivo, não precisará da utilização do teste "in vivo", se negativo, o teste "in vivo" deverá ser feito.

Tabela 4 - Resultados positivos dos testes de pirogênio realizados "in vivo" (coelhos) e "in vitro" (LAL)

| Totais   | Soros com resultados positivos |
|--|--------------------------------|
| Total de soros positivos                           | 45                             |
| total de soros positivos em coelhos                | 39 (86,66%)                    |
| Total de soros positivos com "LAL"                 | 24 (53,33%)                    |
| Total de soros positivos exclusivamente em coelhos | 21 (46,66%)                    |
| Total de soros positivos exclusivamente com "LAL"  | 06 (13,33%)                    |
| Total de resultados coincidentes                   | 18 (40,00%)                    |
| Total de resultados discordantes                   | 27 (60,00%)                    |

## Referências Bibliográficas

- Bang, F.B. - A bacterial disease of *Limulus polyphemus*. Bull. John Hopkins Hosp., 98:325-351, 1956.

2. Cooper, J.F.; Levin, J. & Wagner, H.N. - Quantitative comparison of in vitro and in vivo methods for the detection of endotoxin. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 78:138-148, 1971.
3. Clinical Medicine, 78:138-148, 1971.  
Guia para la solucion de problemas con la prueba pyrogen (IAL). Missouri, Mallinckrodt Inc., 1980.
4. Levin, J. & Bang, F.B. - The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. *Bull. Jonh Hopkins Hosp.*, 11:265, 1965.
5. Levin, J. & Bang, F.B. - Clottable protein in *Limulus*: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. *Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica*, 19:186-197, 1968.
6. Millis, D.F. - Pyrogen (*Limulus Amebocyte Lysate*) for detection of endotoxins. Mallinckrodt Inc., U.S. licence 77/U.S.A., 1978.
7. Ministério da Saúde/ Central de Medicamentos/ Organização Pan-Americana de Saúde - Seminário sobre técnicas e normas de produção e controle de vacinas e soros de uso humano no Brasil. Brasília, D.F., 27 a 31 de maio de 1974.
8. Noordwijk, F. van & Fong, J. de - Comparison of the *Limulus* test for endotoxin with the rabbit test for pyrogens of the European Pharmacopeia. *J. Biol. Stand.*, 4:131-139, 1976.
9. Organización Panamericana de la Salud - Manual de procedimientos: producción y pruebas de control en la preparación de antisueros diftérico, tetánico, botulínico, anti-venenos y de la gangrena gaseosa. Edición revisada, 1977.
10. Rojas-Corona, R.R.; Skarnes, R.; Tamakura, S. & Fine, J. - The *Limulus* coagulation test for endotoxin: a comparison with other assay methods. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 132:599-601, 1969.

## MANNOSE-RESISTANT HEMAGGLUTININS AND PILI IN *ESCHERICHIA COLI* ASSOCIATED TO URINARY TRACT INFECTIONS

João Ramos C. Andrade  
Francisco Montenegro de Melo  
Lilian Dickie

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

Mildeh Rodrigues de Santa Rosa

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

& Italo Suassuna

Faculdade de Ciências Médicas UERJ  
Serviço de Microbiologia e Imunologia

### **Summary**

Several mannose-resistant hemagglutinins were found in *Escherichia coli* from urinary infections. The most frequent hemagglutinin appears in serogroup O6 and is only active against sheep erythrocytes. Hemagglutinins and pili were identical. No correlation was found between HA patterns and either K or H antigens.

### **Resumo**

*Pili hemaglutinante manose-resistente em Escherichia coli isoladas de infecções do trato urinário*

Em *Escherichia coli*, isoladas de infecções urinárias, foram detectadas diversas hemagglutininas (pili) manose-resistentes. A mais frequente delas associa-se ao sorogrupo O6, aglutinando apenas hemácias de carneiro.

Some *Escherichia coli* "adhesins" cause mannose-resistant hemagglutination (MRHA) for erythrocytes of different animal species. By electron microscopy examination the majority of these hemagglutinins appears as rod-shaped structures called pili (MR pili). The role of MR pili in *E. coli* virulence is well established for enterotoxigenic *E. coli* colonization of intestinal epithelial surfaces (Gaastra, W. & de Graaf, F.K. - *Microbiol. Rev.*, 46:129-161, 1982). In urinary tract infections (UTI) MR pili adherence to uroepithelial cells is an important step in the colonization of urinary tract by uropathogenic *E. coli* (*E. coli* UTI). The ability of *E. coli* UTI to adhere to uroepithelial cells correlates with their ability to cause a MRHA of human erythrocytes (Källenius, G. & Mölby, R. - *FEMS Microbiol. Lett.*, 5:295-299,

human erythrocytes (Källenius, G. & Mölby, R. - FEMS Microbiol. Lett., 5:295-299, 1979; Väistönen, V. & col. - Lancet, ii:1366-1369, 1981; Väistönen, V. & col. - Lancet, i:1192, 1982). In the present study we have investigated hemagglutination (HA), patterns, electron microscopy aspects and antigenic specificities of *E. coli* UTI MR pili.

We have studied 37 *E. coli* strains isolated from UTI. Bacteria were grown in colonization factor antigen (C.F.A.) agar (Evans, D.G. & Evans Jr., D.J. - Infect. Immun., 21:638-647, 1978) at 37°C and slide HA tests were performed at 4°C and 37°C with human (groups A and B), bovine, guinea-pig, sheep, rabbit and fowl erythrocytes resuspended in phosphate buffered saline (PBS) containing 0.5% D-mannose. Piliation was studied by electron microscopy (negative staining) in a Phillips EM 301 microscope. Antisera were prepared for some MR pili-producing strains and were absorbed with homologous non-piliated strains grown in C.F.A. agar at 25°C to give pili-specific antisera. Antisera titrations were carried in tube and slide agglutination tests using two-fold serial dilutions.

Table 1 - HA patterns and antigenic relationships of MR pili of *E. coli* UTI.

Symbols: HU = human; BO = bovine; FO = fowl; GP = guinea-pig; RB = rabbit; SH = sheep; +, (+), - = decrescent intensities of MRHA reactions; +/- = MRHA positive at 4°C/negative at 37°C; +/(+) = MRHA positive at 4°C and 37°C; (\*) = absorbed antisera gave titers  $\leq 1:20$  against O, K and H homologous antigens; (\*\*) = reciprocal of dilutions (slide agglutination tests); *E. coli* UTI = uropathogenic *E. coli*

| HA pat-<br>terns | Strains | Serogroup    | MRHA  |    |     |     |     |         | Pili-specific antisera * |     |    |     |      |
|------------------|---------|--------------|-------|----|-----|-----|-----|---------|--------------------------|-----|----|-----|------|
|                  |         |              | HU    | BO | FO  | GP  | RB  | SH      | 30                       | 34  | 32 | 6   | 10   |
| A                | 8       | 06:K2:H31    | -     | -  | -   | -   | -   | +/(+)   | 160**                    | -   | -  | -   | -    |
|                  | 23      | 06:K14:H-    | -     | -  | -   | -   | -   | +/ -    | 160                      | -   | -  | -   | -    |
|                  | 24      | 06:K?:H7     | -     | -  | -   | -   | -   | +/-     | -                        | -   | -  | 80  | 40   |
|                  | 29      | 06:K53:H7    | -     | -  | -   | -   | -   | (+)/ -  | -                        | -   | -  | 20  | 80   |
|                  | 30      | 06:K2:H31    | -     | -  | -   | -   | -   | (+)/(+) | 160                      | -   | -  | -   | -    |
| B                | 16      | rough:K?:H-  | +/(+) | -  | -   | -   | -   | -       | -                        | -   | 40 | -   | -    |
|                  | 21      | 075:K5:H-    | +     | -  | -   | -   | -   | -       | -                        | 40  | -  | -   | -    |
|                  | 32      | (024):K2:H-  | +     | -  | -   | -   | -   | -       | -                        | 40  | -  | -   | -    |
|                  | 34      | 018a,c:K5:H- | +     | -  | -   | -   | -   | -       | -                        | 160 | -  | -   | 1280 |
| C                | 6       | 06:K13:H1    | +/(+) | -  | -   | -   | -   | (+)/ -  | -                        | -   | -  | 640 | 40   |
|                  | 9       | 04:K?:H5     | +     | -  | -   | -   | -   | +/ -    | -                        | 80  | -  | 640 | 1280 |
|                  | 13      | 018a,c:K5:H- | +     | -  | -   | -   | -   | +/ -    | -                        | 160 | -  | -   | 1280 |
| D                | 4       | 04:K12:H5    | +     | -  | -   | +/- | -   | +/-     | -                        | 80  | -  | 640 | 1280 |
|                  | 17      | 07:K1:H-     | +     | -  | -   | +/- | -   | +/-     | -                        | -   | -  | -   | -    |
| E                | 2       | 06:K?:H7     | (+)   | +  | -   | +   | (+) | (+)     | -                        | 40  | -  | 40  | -    |
| F                | ELT     | 06:K53:H7    | +     | -  | -   | +   | +   | +       | -                        | -   | -  | 40  | -    |
| G                | 3       | 02:K1:H4     | +     | -  | -   | -   | (+) | (+)     | -                        | -   | -  | -   | -    |
| H                | 10      | 018a,c:K5:H- | +     | -  | (+) | -   | (+) | (+)     | -                        | -   | -  | 80  | 1280 |

Table 1 shows that 18 strains (48%) produced pili with different HA patterns. Type A HA pattern was found in 27% of piliated strains and 13% of all *E. coli* UTI examined. Utilization of both sheep and human erythrocytes enabled us to detect all piliated strains. No morphological differences were found among MR pili of different HA patterns. We concluded that hemagglutinins and pili were identical because both pili visualized by electron microscopy and MRHA were lost when piliated strains were grown in C.F.A. agar at 25°C (Duguid, J.P. & col. - J. Med. Microbiol., 12:213-227, 1978). Seventy-two per cent of all serogroup 06 strains (11), 75% of 018a,c strains (4) and all 04 (2), 02 (1), 07 (1), 024 (1) and 075 (1) strains were piliated. MR pili were absent in 09 (2), 01 (1), 08 (1), 013 (1), 020 (1) and 068 (1) strains. We found strong correlation between type A HA pattern and serogroup 06 (Table 1). No correlation was found between HA patterns and either K or H antigens. The cross-agglutination tests with absorbed antisera reveal that

pili with identical HA patterns or pili from strains of the same serogroup show great antigenic variations with exceptions such as pili from strains 8, 23 and 30 which were similar antigenically. None of pilated strains reacted with CFA/I or CFA/II antisera.

The present study shows that *E. coli* strains belonging to the most frequent serogroup (O6) associated to UTI (Mabeck, C.E. & col. Acta Med. Scand., 190:279-282, 1971; Oliveira, E.F.R. & col. - Rev. Ass. Med. Brasil., 23:217-219, 1977) produced a MR pili adhering only to sheep erythrocytes. These MR pili didn't adhere to human erythrocytes as other MR hemagglutins described in UTI did. In contrast with the close correlation between HA patterns and hemagglutinins, antigenic specificities for the MR pili of enterotoxigenic *E. coli* (CFA/I, CFA/II, K88, K99) a dissociation between HA patterns and antigenic specificities for MR pili of *E. coli* UTI was found. Further investigation will clarify MR pili antigenic relationships, its incidence in cystitis and pyelonephritis, and adhesive properties to uroepithelial cells.

#### Acknowledgments

This study was supported by FINEP (Conv. FINEP-JEPRJ 3.4.82/0270-00) and CNPq (105459-82). The electron microscopy procedures were also supported by FINEP (Ac. FINEP-FUJB 4.3.83/0018.00). We thank Ida and Frits Ørskov (International Escherichia and Klebsiella Centre, Copenhagen) for serogrouping of *E. coli* strains.

## SOROTIPOS DE *SHIGELLA* EM GASTROENTERITES NO RIO DE JANEIRO\*

Lúcia Martins Teixeira

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

Ivone Rocco Suassuna

Hospital Universitário UFRJ  
 Ilha do Fundão  
 21941 Rio de Janeiro RJ, Brasil

& Italo Suassuna

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

### Resumo

Comparação do comportamento bioquímico e sorológico de 175 amostras de *Shigella* isoladas de coprocultura de pacientes com gastroenterite aguda de intensidade variável, ou história de diarréia crônica, na cidade do Rio de Janeiro, em dois períodos: 1960 a 1969 (89 amostras) e 1970 a 1978 (86 amostras). Foi evidenciada a prevalência do subgrupo B (64,00%) seguido do subgrupo D (26,30%) e a baixa incidência dos subgrupos C (5,70%) e A (4,00%). A sorotipagem revelou a predominância dos sorotipos B<sub>2</sub> (26,80%) e D (26,30%), seguidos de B<sub>3</sub> (16,00%) e B<sub>1</sub> (12,00%). Não foram observadas alterações marcantes na distribuição dos sorotipos de maior frequência, nos dois períodos de isolamento.

### Summary

*Serotypes of Shigella isolated from cases of gastroenteritis in Rio de Janeiro*

The biochemical and serological characteristics of 175 *Shigella* strains isolated in Rio de Janeiro were studied. The strains came from patients with acute or chronic enteric disorders. Results with a group of 89 strains isolated from 1960 to 1969 were compared with a group of 86 remaining strains which were isolated from 1970 to 1978. The results showed that 64.00% of the strains belonged to subgroup B, 26.30% to subgroup D, 5.70% to subgroup C and 4.00% to subgroup A. Serological typing revealed serotypes B<sub>2</sub> (26.80%), D (26.30%), B<sub>3</sub> (16.00%) and B<sub>1</sub> (12.00%) as being the commonest types among the total number of strains. No major differences were observed in the distribution of types in the two compared groups of strains.

## Introdução

A frequência de isolamentos de *Shigella*, a partir de quadros entéricos, varia de acordo com as áreas geográficas e condições sócio-econômicas (4, 9, 18). *S. flexneri* e *S. sonnei* são as espécies predominantes, salvo em zonas ou surtos limitados onde se sobressaem, ocasionalmente, outras espécies de frequência normalmente baixa (1, 11, 13, 17).

A shigelose tem distribuição mundial, prevalecendo em locais cujas condições sanitárias e o nível de higiene pessoal são desfavoráveis, sendo uma das principais causas de surtos de doença diarréica em comunidades (17, 23). A diversidade dos problemas relacionados à shigelose evidencia a importância da perfeita identificação e da renovação de informações sobre a frequência dos diferentes sorotipos, numa determinada área, para fins de diagnóstico e epidemiologia. O conhecimento da ausência ou raridade de certos subgrupos ou sorotipos é relevante para a detecção de surtos por eles produzidos.

Considerando a escassez de informações sobre o assunto no Rio de Janeiro, foi feita a análise do comportamento bioquímico e sorológico de amostras de *Shigella* isoladas nesta cidade, procurando evidenciar a ocorrência de possíveis alterações na frequência de sorotipos isolados em diferentes períodos.

## Material e Métodos

**Origem das amostras** - Foram estudadas 175 amostras de *Shigella* isoladas de coprocultura de pacientes com gastroenterite aguda de intensidade variável ou história de diarréia crônica, na cidade do Rio de Janeiro, no período de 1960 a 1978. Desse total, 123 estavam estocadas no Laboratório de Enterobactérias do Instituto de Microbiologia da UFRJ (IM-UFRJ). As demais foram isoladas em laboratórios clínicos da rede hospitalar ou particular e no próprio IM-UFRJ, durante o período de 1976 a 1978.

**Isolamento, triagem e identificação bioquímica** - Todas as amostras foram submetidas a comprovação de pureza, pela passagem em meio de agar EMB (Eosin Methylene Blue Agar) e incubação a temperatura de 37°C durante 24 horas e a partir daí, repicadas para os meios de triagem DAU (Duplo-Açúcar-Ureia) (20) e SIM. As isoladas no IM-UFRJ foram obtidas pela semeadura de fezes colhidas após emissão espontânea (em adultos) ou através de swab retal (em crianças até cerca de 12 anos). Foi empregado caldo selenito F (Difco), como meio de enriquecimento, e agar EMB, agar SS (*Shigella-Salmonella* Agar-Difco) e agar de Hektoen (Hektoen Enteric Agar-Difco), como meios seletivo-diferenciais. As colônias suspeitas foram, inicialmente,

**Tabela 1 - Comportamento bioquímico de 175 amostras de *Shigella* isoladas na cidade do Rio de Janeiro no período de 1960 a 1978.**

**Símbolos:** + = teste positivo em 1 ou 2 dias; (+) = teste positivo tardio (em 3 dias ou mais); - = teste negativo; 1 = à partir da fermentação da glicose; 2 = em meio sólido; 3 = em meio líquido; \* = amostra sorologicamente definida como *Shigella flexneri* tipo 6

| Teste ou substrato                    | Total de amostras |        |    |        |            |
|---------------------------------------|-------------------|--------|----|--------|------------|
|                                       | Nº                | +      | %  | Nº (+) | %          |
| Produção de H <sub>2</sub> S          | 0                 | -      | 0  | -      | 175 100,00 |
| Produção de indol                     | 55                | 31,43  | -  | -      | 120 68,57  |
| Mobilidade                            | 0                 | -      | 0  | -      | 175 100,00 |
| Hidrólise da uréia                    | 0                 | -      | 0  | -      | 175 100,00 |
| Fermentação da glicose                | 175               | 100,00 | 0  | -      | 0 -        |
| Produção de gás <sup>1</sup>          | 1*                | 0,57   | 0  | -      | 174 99,43  |
| Fermentação da lactose <sup>2</sup>   | 0                 | -      | 0  | -      | 175 100,00 |
| Fermentação da lactose <sup>3</sup>   | 0                 | -      | 46 | 26,29  | 129 73,71  |
| Fermentação do manitol                | 155               | 88,57  | 2  | 1,14   | 18 10,29   |
| Vermelho de metila                    | 175               | 100,00 | 0  | -      | 0 -        |
| Voges Proskauer                       | 0                 | -      | 0  | -      | 175 100,00 |
| Desaminação da fenilalanina           | 0                 | -      | 0  | -      | 175 100,00 |
| Utilização do ácido fenilpropionílico | 56                | 32,00  | 17 | 9,71   | 102 58,29  |
| Utilização do citrato de Simmons      | 0                 | -      | 0  | -      | 175 100,00 |
| Utilização do acetato de sódio        | 0                 | -      | 0  | -      | 175 100,00 |

inoculadas nos meios de triagem anteriormente citados. O estudo de outras características bioquímicas, citadas na Tabela 1, foi executado segundo recomendações habituais (5, 6).

**Identificação sorológica** - Foi utilizada a técnica de aglutinação em lâmina, empregando antisoros preparados de acordo com as recomendações de Edwards & Ewing (5), assim como antissoros de fonte comercial (Difco).

**Tabela 2 - Testes bioquímicos de maior valor diferencial entre os subgrupos de 175 amostras de *Shigella* isoladas na cidade do Rio de Janeiro no período de 1960 a 1978.**

**Símbolos:** \* = amostras sorologicamente definida como *Shigella flexneri* 6; \*\* = positividade tardia, variando entre 2 a 25 dias. Maioria das amostras positivas entre o 11º e o 15º dia de incubação

| Testes bioquímicos       | Subgrupos |        |   |     |       |   |    |        | Amostras + total |    |        |   |     |       |
|--------------------------|-----------|--------|---|-----|-------|---|----|--------|------------------|----|--------|---|-----|-------|
|                          | Nº        | A      | % | Nº  | B     | % | Nº | C      | %                | Nº | D      | % | Nº  | %     |
| Produção de indol        | 7         | 100,00 |   | 41  | 36,61 |   | 7  | 70,00  |                  | 0  | -      |   | 55  | 31,43 |
| Produção de gás          | 0         | -      |   | 1*  | 0,89  |   | 0  | -      |                  | 0  | -      |   | 1*  | 0,57  |
| Fermentação da lactose** | 0         | -      |   | 0   | -     |   | 0  | -      |                  | 46 | 100,00 |   | 46  | 26,29 |
| Fermentação do manitol   | 0         | -      |   | 101 | 90,18 |   | 10 | 100,00 |                  | 46 | 100,00 |   | 157 | 89,71 |
| Ácido fenil-propionílico | 0         | -      |   | 27  | 24,10 |   | 0  | -      |                  | 46 | 100,00 |   | 73  | 41,71 |

**Tabela 3 - Subgrupos e sorotipos de *Shigella* isoladas na cidade do Rio de Janeiro no período de 1960 a 1978**

### Resultados e Discussão

O comportamento bioquímico das 175 amostras de *Shigella*, está relacionado na Tabela 1. Os testes bioquímicos de valor para a diferenciação dos subgrupos estão apresentados na Tabela 2.

No Brasil, os microrganismos do gênero *Shigella* têm sido apontados entre os principais agentes enteropatogênicos (2, 3, 11, 12, 18), apesar de alguns achados discordantes (4, 7, 19). As divergências podem ser devidas aos critérios de seleção de pacientes, diferenças ecológicas e metodologia

de isolamento e identificação do agente causal (4, 7, 9). Adicionalmente, a antibioticoterapia e melhoria das condições sanitárias podem contribuir para a redução na frequência de shigelas, em alguns locais (15, 22). Os sorogrupo e sorotipos prevalentes podem também variar em função do local e do tempo da investigação. Na amostragem por nós utilizada, a distribuição das espécies de *Shigella*, nas duas épocas de isolamento, foi semelhante, com predominância de *S. flexneri* (subgrupo B), seguida de *S. sonnei* (subgrupo D) e rara ocorrência dos subgrupos A e C. Esses dados estão em concordância com observações feitas anteriormente no Rio de Janeiro (14), em outras cidades brasileiras (7, 11, 15, 18, 24) e em países de condições

| Subgrupos                      | Total por subgrupos |        | Sorotipos   | Nº amostras                       |                                    | Total                              | % Total   |
|--------------------------------|---------------------|--------|---|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|---|
|                                |                     |        |   | 1960<br>a<br>1969                 | 1970<br>a<br>1978                  |                                    |   |
| A<br>( <i>S. dysenteriae</i> ) | 7                   | 4,00   | A2<br>A não sorotipadas   | 2<br>3                            | 2<br>-                             | 4<br>3                             | 2,29<br>1,71  |
| B<br>( <i>S. flexneri</i> )    | 112                 | 64,00  | B <sub>1</sub><br>B <sub>2</sub><br>B <sub>3</sub><br>B <sub>4</sub><br>B <sub>5</sub><br>B <sub>6</sub><br>B <sub>x</sub><br>B não sorotipadas | 7<br>25<br>15<br>1<br>2<br>1<br>1 | 14<br>22<br>13<br>5<br>-<br>1<br>- | 21<br>47<br>28<br>6<br>2<br>2<br>1 | 12,00<br>26,86<br>16,00<br>3,42<br>1,14<br>1,14<br>0,57<br>2,86 |
| C<br>( <i>S. boydii</i> )      | 10                  | 5,71   | C <sub>5</sub><br>C não sorotipadas   | -<br>7                            | 2<br>1                             | 2<br>8                             | 1,14<br>4,57  |
| D<br>( <i>S. sonnei</i> )      | 46                  | 26,29  | D   | 22                                | 24                                 | 46                                 | 26,29   |
| Total                          | 75                  | 100,00 | Total   | 89                                | 86                                 | 175                                | 100,00  |

sanitárias e climáticas similares (10, 13, 16), contrastando com os de países com melhores condições, onde o subgrupo D prevalece sobre o B (1, 8, 17, 21, 23). A sorotipagem (Tabela 3) demonstrou o predomínio dos sorotipos B<sub>2</sub> (26,80%), D (26,30%), B<sub>3</sub> (16,00%) e B<sub>1</sub> (12,00%), não sendo reveladas alterações marcantes na ordem de prevalência dos sorotipos de maior frequência. Observe-se que os sorotipos B<sub>2</sub> e D, apresentam percentuais quase superponíveis de isolamento, sugerindo a tendência a que ocupem a mesma ordem de frequência.

### Agradecimentos

Este estudo foi realizado com apoio financeiro da CAPES, CNPq, FINEP e CEPG-UFRJ. Desejamos expressar nosso reconhecimento pelo valioso auxílio técnico de Selma da Silva Pinto e Maria Angélica Pereira da Silva.

### Referências Bibliográficas

1. Aoki, Y. - Serological groups of *Shigella* in Japan and neighboring countries: a review. *Trop. Med.*, 10:116-126, 1968.
2. Assis, A. de & Ribeiro, V.R.L. - Estudos sobre shigeloses na infância do Rio de Janeiro. *Hospital*, 32:149-162, 1947.
3. Costa, G.A.; Costa, A. & Brooking, C. - As shigeloses e as salmoneloses na etiologia das diarréias agudas da criança. *Bol. Inst. Puericult.* (Rio de Janeiro), 14:79-98, 1957.
4. Costa, G.A.; Suassuna, I. & Suassuna, I.R. - Tipos de *Salmonella* e *Shigella* ocorrentes no Rio de Janeiro. *An. Microbiol.* (Rio de Janeiro), 5:305-318, 1957.
5. Edwards, P.R. & Ewing, W.H. - Identification of *Enterobacteriaceae*. 3.ed. Minneapolis, Burgess Publishing, 1972.
6. Ewing, W.H. - Isolation and identification of *Salmonella* and *Shigella*. Atlanta, Georgia, Center fo Disease Control, 1972.
7. Falcão, D.P. - Estudo bacteriológico de infecções entéricas em crianças até 2 anos, no município de Araraquara, SP. *Rev. Microbiol.* (S. Paulo), 3:127-138, 1972.
8. Gillies, R.R. - Bacillary dysentery in Scotland: some epidemiologic studies. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, 16:410-420, 1968.
9. Goes, P. de; Suassuna, I. & Suassuna, I.R. - Considerações sobre a etiologia das infecções intestinais. *An. Microbiol.* (Rio de Janeiro), 5:221-137, 1957.
10. Le Noc, P.; Orio, J. & Bourgeade, A. - Les infections à *Shigella* en Côte d'Ivoire: e'tude microbiologique et épidémiologique. *Revue Epid. Méd. Soc. Santé Publ.*, 22:557-565, 1974.
11. Montelli, A.C. - Diarréia por enterobactérias: estudo bacteriológico, clínico e epidemiológico. São Paulo, Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, 1972. (Tese).
12. Montelli, A.C. & Trabulsi, L.R. - Diarréias causadas por *Shigella*, *Salmonella* e *E. coli* enteropatogênica no município de Botucatu, São Paulo. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, 16:23-26, 1970.
13. Olarte, J. - Las infecciones por *Shigella* en la ciudad de México. *Gac. Mod. México*, 90:235-241, 1960.
14. Palmeira, M.L.; Batalha, P.P. & Gomes, V.L.P. - Sobre o aparecimento de resistência múltipla aos antibióticos e quimioterápicos em amostras de *Shigella* isoladas no Rio de Janeiro. *Mem. Oswaldo Cruz*, 69:145-152, 1971.
15. Pessoa, G.V.A.; Calzada, C.T.; Paixoto, E.S.; Melles, C.E.A.; Kano, E.; Raskin, M.; Simonsen, V. & Irino, K. - Ocorrência de bactérias enteropatogênicas em São Paulo no septênio 1970-76. III - Sorotipos de *Shigella* e de *Escherichia coli* da gastroenterite infantil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 38:129-139, 1978.
16. Ricossé, J.H. - Contribution a l'étude des shigelloses au Sud Viêt Nam (e'tude bacteriologique, épidémiologique et thérapeutique). *Bull. Soc. Path. Exot.*, 61:699-721, 1968.

17. Rosenberg, M.L.; Weissman, J.B.; Gangarosa, E.J.; Reller, L.B. & Beasley, R.P. - Shigellosis in the United States: ten year review of nationwide surveillance, 1964-1973. Am. J. Epidemiol., 104:543-551, 1976.
18. Serrano, J.A. & Trabulsi, L.R. - Observações sobre a frequência de isolamento de *Shigella*, *Salmonella* e *E. coli* enteropatogênica das fezes de crianças com diarréia aguda, na cidade de São Paulo. Arq. Gastroenter., 3:221-225, 1966.
19. Solé-Vernin, C.; Baracchini, O.; Costa, A. & Ito, I.Y. - Nota sobre a família Enterobacteriaceae em Ribeirão Preto, S. Paulo, S.P. Hospital, 74:229-234, 1968.
20. Suassuna, I. & Suassuna, I.R. - Duplo Açúcar-Uréia-Agar (DAU), um meio de triagem para enterobactérias. Rev. Bras. Patol. Clin., 14:201-202, 1978.
21. Szturm-Rubinsten, S.; Piechaud, D. & D'Hauteville, H. - Antibioresistance des *Shigella* isolée en France en 1971: modifications et caractérs stables. Ann. Inst. Pasteur, 123:307-310, 1972.
22. Taunay, A.E.; Novaes, J.R.C. & Pessoa, G.V.A. - Infecções por enterobactérias no município de São Paulo: provável disseminação por via aérea. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 31:113-116, 1971.
23. Thomas, M.E.M. & Tillett, H.E. - Dysentery in general practice: a study of cases and their contacts in Enfield and an epidemiological comparison with salmonellosis. J. Hyg., 71:373-389, 1973.
24. Trabulsi, L.R.; Zuliani, M.E. & Toledo, M.R.F. - Resistance to nine drugs of *Shigella* strains isolated in São Paulo between 1963 and 1968. Rev. Microbiol. (São Paulo), 1:71-77, 1970.

## INFORME SOBRE A PESTE BUBÔNICA (INFECÇÃO POR YERSINIA PESTIS) NO ESTADO DE MINAS GERAIS, BRASIL

Alzira Maria Paiva de Almeida  
Darcy Pascoal Brasil

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães  
Fiocruz  
R. do Espinheiro, 106  
50000 Recife PE, Brasil

Niedja Tereza da Cunha e Silva

Laboratório Central de Peste SUCAM  
R. Pedro Rocha, s/n  
55300 Garanhuns PE, Brasil

& Célio Rodrigues de Almeida (Bolsista CNPq)

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães  
Fiocruz

### Resumo

*Yersinia pestis* foi isolada de roedores e detectados anticorpos antipestosos, em soros humanos e de roedor, do Estado de Minas Gerais, onde a infecção pestosa não era registrada, há cerca de 10 anos.

### Summary

*Note on bubonic plague (Yersinia pestis infection) in Minas Gerais State, Brazil*

*Yersinia pestis* was isolated from rodents, and plague antibody was found in human and rodent sera, from Minas Gerais State, Brazil, where plague activity had not been recorded for about 10 years.

A peste atingiu o Estado de Minas Gerais, em 1936, em consequência à sua expansão no Brasil, após introdução, em 1899. Eliminada da zona urbana, ficou arraigada entre os roedores na zona rural, constituindo os focos naturais que persistem até a época atual (Freitas, C.A. - Rev. Bras. Mal. D. Trop. XXI(4):673-688, 1969).

As informações sobre atividade pestosa, na maioria desses focos, baseiam-se principalmente, no registro de casos humanos e só na última década foi iniciada a pesquisa sistemática desta infecção, entre os roedores hospedeiros e pulgas vetores, nos focos mais ativos (Almeida, C.R. & col. Bull. Wld. Hlth. Org., 59(4):591-597, 1981).

Em 1983, foi iniciada a pesquisa de atividade pestosa nos focos do Vale do Rio Doce e do Jequitinhonha (MG) onde as últimas ocorrências datavam de 1974. A infecção foi pesquisada, por métodos bacteriológicos e sorológicos, nos roedores silvestres e comensais e em pacientes com sintomatologia compatível.

Os exames bacteriológicos, dos baços dos roedores conservados no meio de Cary-Blair, foram realizados no Laboratório Central de Peste da SUCAM/MS, em Garanhuns.

nhuns, Pernambuco, e os exames sorológicos no Laboratório de Peste do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz, Recife, Pernambuco.

A metodologia empregada na colheita, conservação e transporte das amostras e nos exames bacteriológicos e sorológicos, foi a recomendada por Cavanaugh, D.C. & Bahmanyar, M. (Wld. Hlth. Org. (Geneva), 1976) e Karimi, Y. (Bull. Soc. Path. Exot., 71(1):45-48, 1978).

Foi detectada atividade pestosa, em ambos os focos, nos seguintes materiais: soro de um roedor, *Nectomys squamipes olivaceus*, capturado em julho de 1983, na Fazenda Barra do Mutum, Itanhomi (Foco do Vale do Rio Doce) que apresentava título de anticorpos hemaglutinantes com a Fração Antigênica purificada 1A de *Yersinia pestis*,  $>1:128$ ; baços de dois roedores (1 *Zygodontomys lasiurus pixuna* morto na quarentena e um *Akodon arvicoloides arviculoides* encontrado morto no campo, em agosto de 1983), da Fazenda Barra do Bananal, Rubelita (Foco do Vale do Jequitinhonha), que se encontravam infectados por *Yersinia pestis*; soro de um paciente da Fazenda Bananal II, Rubelita, em janeiro de 1984, com título de anticorpos = 1:128.

As cepas de *Yersinia pestis*, isoladas dos dois roedores infectados, produzem reação característica, quando inoculadas no dorso depilado das cobaias e apresentam o perfil bioquímico mostrado na Tabela 1.

O reencontro da peste, nos focos do Estado de Minas Gerais, onde não era registrada há cerca de 10 anos, mostra que, ao invés de extintos, estes focos permanecem ativos, exigindo permanentes medidas de vigilância e controle da infecção.

Tabela 1 - Perfil bioquímico das cepas de *Yersinia pestis* isoladas de dois roedores do município de Rubelita, Minas Gerais, em agosto de 1983 (28°C)

| Provas                      | Resultados        |
|-----------------------------|-------------------|
| Glicose (ácido)             | +                 |
| Glicose (gás)               | -                 |
| Manitol                     | +                 |
| Lactose                     | -                 |
| Sacarose                    | -                 |
| Glicerina                   | -                 |
| Nitrato                     | +                 |
| Mobilidade                  | -                 |
| VM                          | +                 |
| VP                          | -                 |
| Indol                       | -                 |
| Uréia                       | -                 |
| Lisina descarboxilase       | -                 |
| H <sub>2</sub> S (Kliger)   | -                 |
| Coloração (Azul de metíleno | Bacilos bipolares |

# VACINA ANTIASFOSA POR DNA RECOMBINANTE (rDNA): ESTRATÉGIAS PARA CONSTRUÇÃO DE VETORES DE EXPRESSÃO PARA O GENE VP<sub>1</sub>\*

Erika Neitzert  
 & Roberto S. Waack

Embrabio - Empresa Brasileira de Biotecnologia  
 Rua Marquês de Itu, 58/59  
 01223 São Paulo SP, Brasil

## Resumo

Análise da Patente ZA 824174, da Genentech, Inc., intitulada "Production of foot and mouth disease vaccine from microbially expressed antigens thereof" e interpretação das estratégias adotadas para obtenção do cDNA e gene VP<sub>1</sub>, para produção de vacina antiafosa, envolvendo: construção de vetor de expressão original, para o gene VP<sub>1</sub> de A<sub>12</sub> e vetores de expressão derivados, para o gene VP<sub>1</sub> dos subtipos A<sub>24</sub> Cruzeiro Brasil/55, A<sub>27</sub> Cundinamarca Colombia/76, A Argentina/79, O<sub>1</sub> Campos Brasil/58 e C<sub>3</sub> Resende Brasil/55.

## Summary

*DNA recombinant foot and mouth disease vaccine: VP<sub>1</sub> expression vectors strategies construction*

Analysis of the ZAPat 824174 from Genentech, Inc. "Production of foot and mouth disease vaccine from microbially expressed antigens thereof" and interpretation of the strategy adopted for the obtention of cDNA and VP<sub>1</sub> gene for FMD vaccine production, involving: construction of an A<sub>12</sub> VP<sub>1</sub> original expression vector and its transformants for VP<sub>1</sub> expression of A<sub>24</sub> Cruzeiro Brasil/55, A<sub>27</sub> Cundinamarca Colombia/76, A Argentina/79, O<sub>1</sub> Campos Brasil/58 and C<sub>3</sub> Resende Brasil/55 subtypes.

## Introdução

A elucidação da estrutura de dupla hélice do DNA por Watson & Crick, em 1953, e de importantes processos celulares, como síntese protéica e regulação gênica (décadas de 50 e 60), permitiram o desenvolvimento, na década de 70, da tecnologia do DNA recombinante. A possibilidade de se construir vetores, capazes de expressar mensagens pré-programadas, com emprego das técnicas de rDNA causou profundo impacto na ciência. Não menos importante foi a aplicação desta tecnologia em diversos segmentos industriais (18).

Na produção de imunizantes, o uso da tecnologia de rDNA abriu novas perspectivas para superar inconvenientes observados nas vacinas tradicionais, decorrentes da técnica de produção. Esta situação é particularmente importante, no caso da vacina antiafosa (9).

A produção da vacina tradicional está baseada na inativação do vírus da febre aftosa (VFA). O vírus inativado, embora contendo determinantes抗原的, perde a capacidade de replicação.

A vacina, assim produzida, apresenta dois importantes inconvenientes. Se a inati-

vação é inadequada, a vacina poderá provocar a doença. Se as condições denaturantes são muito poderosas, a fim de garantir a obtenção de produto que não cause a doença, o antígeno poderá vir a ter sua capacidade imunogênica alterada.

A vacina produzida por inativação exige, para sua estabilidade, a manutenção de cadeia de frio, de 4 a 8°C da embalagem à inoculação no gado. O poder imunogênico é perdido, se o produto for congelado ou reaquecido. As condições climáticas, no Brasil, e a desatenção dos aplicadores, quanto às exigências térmicas, tornam o processo de manutenção vulnerável.

O escape do vírus, durante a industrialização da vacina, constitui outra inconveniência na tecnologia tradicional.

Tais inconvenientes são evitados com a tecnologia de rDNA para a produção de vacina antiaftosa (11, 13).

Pela tecnologia tradicional, a vacina é produzida a partir da inativação de vírus inteiros. No passado, não havia suficiente conhecimento das bases moleculares do agente causal da aftosa. Hoje, a vacina por rDNA requer profundos conhecimentos, a respeito da biologia do VFA e o domínio de técnicas especiais, para manipulação do genoma do agente (26, 28).

A partir dos trabalhos pioneiros de Bachrach, na década de 60 (1), sabia-se que a fração mais imunogênica do VFA localizava-se no polipeptídeo VP<sub>1</sub> (VP = do inglês "viral polypeptide") que faz parte do capsídeo do vírus. A partir daí, a tecnologia de rDNA pode ser usada para clonagem do gene VP<sub>1</sub>, em um vetor, capaz de levar à síntese de peptídeo VP<sub>1</sub>. A vacina, contendo apenas VP<sub>1</sub>, não apresenta os inconvenientes da tradicional e dispensa a cadeia de frio.

No moderno processo de produção da vacina antiaftosa, a estratégia adotada para construção de vetor de expressão constitui a base da tecnologia. As sequências genéticas de controle introduzidas e a integração do DNA heterólogo, capaz de levar à síntese de proteína híbrida, compatível com a célula (bactéria) hospedeira, constituem as características fundamentais do vetor de expressão (12, 14, 19). Através de manipulação dos componentes químicos, no meio de cultura, é possível otimizar o nível de expressão, no sistema vetor-hospedeiro. O vetor eficiente constitui, portanto, um dos fatores de sucesso, para a industrialização da vacina, em bases competitivas.

A técnica de rDNA não é a única tecnologia de ponta, como opção para produção de vacina para febre aftosa. Outra linha industrial deverá ser baseada no processo de síntese química de polipeptídeo, a partir do qual são obtidos imunizantes com vantagens semelhantes aqueles obtidos através da tecnologia de rDNA.

O uso de computadores permite estimar-se a localização de sítios antigênicos. Existem programas específicos para localização de regiões acessíveis de proteínas. A esta metodologia alia-se o conhecimento da sequência de aminoácidos e a caracterização destes em hidrofílicos e hidrofóbicos. Os primeiros geralmente estão expostos, enquanto os segundos estão escondidos, em dobras da proteína.

Bittle & col. (5, 6), sintetizaram peptídeos (por método de fase sólida), correspondentes a várias regiões do VP<sub>1</sub>. Verificaram que a sequência correspondente aos aminoácidos 140 a 160, quando acoplados a um carrier e combinados com adjuvantes produzem anticorpos neutralizantes e protegem contra desafio. Outro peptídeo, contendo os aminoácidos 201 ou 213 do VP<sub>1</sub>, também produz anticorpos neutralizantes, quando acoplados a um carrier e introduzido em animais.

Recentemente, pesquisadores da Scripps Clinic em conjunto com pesquisadores do Animal Virus Research Institute, Pirbright, England, demonstraram que peptídeos contendo aminoácidos 141 a 160, do VP<sub>1</sub> do vírus O. Kaufbeuren, anexados a várias proteínas transportadoras, em combinação a diferentes adjuvantes, produziram anticorpos neutralizantes em cobaias e coelhos. Peptídeos sintetizados da mesma região do vírus A e C foram comparados, em termos de atividade neutralizante.

O mesmo grupo, está realizando estudos comparativos, entre sequências de VP<sub>1</sub>, derivados de diferentes cepas virais, visando maior compreensão, em nível molecular, da variação antigênica característica do aftovírus. Esta análise faz uso de métodos para estudos de conformação estrutural; pretende definir mais claramente a região imunogênica e determinar as superfícies expostas do VP<sub>1</sub>.

Do ponto de vista do poder imunizante, os testes "in vivo", realizados com os produtos obtidos por rDNA e os polipeptídeos sintéticos são promissores. A passagem

da escala laboratorial para industrial é diretamente dependente de maior quantidade de ensaios em bovinos, com os diferentes subtipos virais.

A análise das estratégias, usadas em engenharia genética, para construção de vetores de expressão para o gene VP1, representa importante passo para prospecção de tecnologia competitiva. Permite conhecer as tendências entre competidores e inferir, com auxílio de outros parâmetros técnicos e econômicos, as possibilidades de maior sucesso.

A literatura científica sobre rDNA, em específico para produção de vacina, é vasta. Além dos citados, alguns textos merecem destaque (2, 3, 4, 7, 8, 10, 15, 16, 17, 20, 22, 23), mas não serão comentados, pelo fato desse trabalho não ter, por objetivo, a revisão bibliográfica sobre o assunto. O principal escopo do trabalho é a análise de patente, por conter informação que revela a tendência industrial na área.

Várias patentes já foram concedidas, incluindo processo construtivo de vetores de expressão. Foram examinadas duas, uma (Nº 824174), para a República da África do Sul, e outra, de concorrente (Nº 2084583), para o Reino Unido (25, 27).

A escolha, para análise mais detalhada, recaiu sobre a primeira patente, pelo fato do modelo ter incluído a transformação do vetor de expressão original em vetores de expressão, para diferentes subtipos do VFA. Este aspecto é de grande importância, dada a variabilidade imunológica do vírus, nos países afetados pela febre aftosa. Portanto, a indústria tornar-se-á mais competitiva, na medida que contar com recursos técnico-científicos e assistência especializada, para adaptação de tecnologia, frente às contínuas modificações epidemiológicas do agente causal da moléstia.

A seguir, são apresentadas as vias de obtenção do gene VP1 (cap. 2) e as estratégias para construção de vetores de expressão de VP1 (cap. 3), original e seus derivados. Os detalhes sobre a estrutura gênica dos cinco fragmentos, usados para a construção do vetor de expressão original e a lista de enzimas de restrição envolvidas nas vias de obtenção dos vetores (original e derivados), estão incluídos no apêndice.

### Vias de obtenção do gene VP1

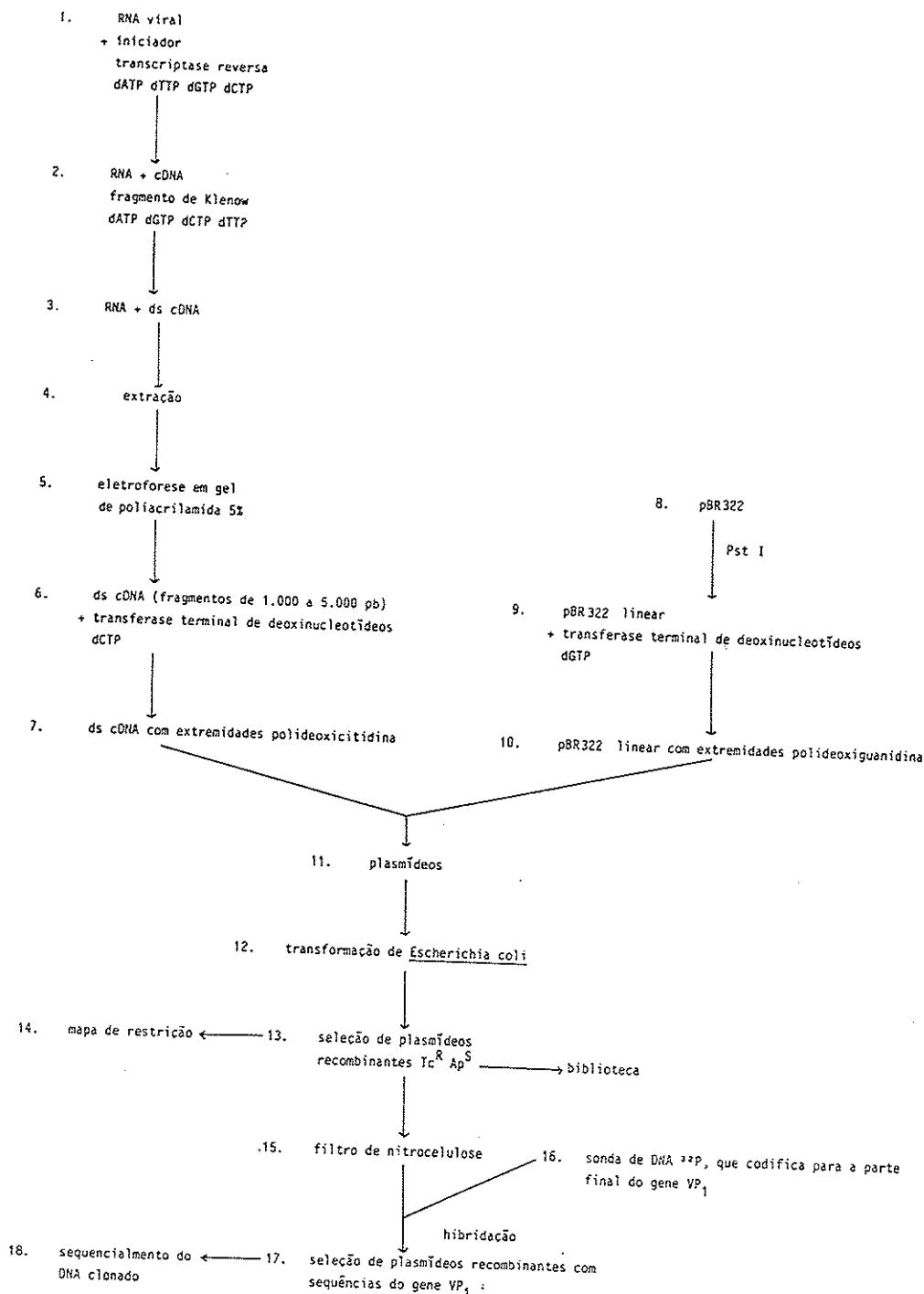
A obtenção do cDNA dupla hélice (ds) de VP1, envolve várias das novas técnicas de rDNA (21) e resulta em biblioteca de VFA, formada por coleção de plasmídeos recombinantes, na qual cada segmento do ds cDNA de VFA está presente no mínimo uma vez. Da biblioteca são, finalmente, selecionados os plasmídeos que contêm o gene VP1 (Fig. 1). A construção da biblioteca (Fig. 1, etapas 1-3) inclui: obtenção do ds cDNA de VFA, através de síntese enzimática e clonagem do ds cDNA, em plasmídeos.

O ds cDNA do aftovírus, obtido segundo métodos (24) já considerados convencionais (Fig. 1, etapas 1-7), é preparado para clonagem, visando-se a formação de extremidades polideoxicitidina.

Para obtenção da biblioteca, no caso da ZAPat 824174, foi escolhido o plasmídeo pBR322. Trata-se de molécula dupla de DNA circular, com 4363 pares de bases (pb), construída "in vitro", para *Escherichia coli*. O pBR322 contém: o determinante de resistência à tetraciclina (Tc) de pSC 101; a origem de replicação de DNA (Ori) de Col E1, derivada de pBM 1; e o determinante de resistência à ampicilina, do transposon Tn 3 (Apêndice, Fig. 17 - Mapa do pBR322).

A preparação do pBR322, para clonagem (Fig. 1, etapas 8-10), envolve linearização do plasmídeo e criação de extremidades polideoxiguanidina, complementares às do ds cDNA do VFA. A linearização do pBR322, através da enzima Pst I, cujo sítio de ação, no plasmídeo, localiza-se no gene Ap, faz com que a clonagem do DNA heterólogico ocorra no Ap, inativando-o. Isso permite, após a clonagem e transformação de *E. coli* (Fig. 1, etapas 11-12), selecionar os plasmídeos recombinantes com ampicilina e tetraciclina. As colônias, resistentes à tetraciclina e sensíveis à ampicilina, contendo plasmídeos recombinantes, podem ser separadas das colônias não transformadas, TcS e ApS (Fig. 1, etapa 13).

**Figura 1 – Obtenção do ds-cDNA do gene VP<sub>1</sub> de VFA**



**Figura 2 - Plasmídeos recombinantes, selecionados para seis subtipos de VFA, todos contendo o gene VP<sub>1</sub>, do respectivo subtipo**

| Subtipo de VFA                           | Plasmídeo selecionado |
|--|-----------------------|
| A <sub>12</sub>                          | T 465                 |
| A <sub>24</sub> Cruzeiro Brasil          | B 435                 |
| A <sub>27</sub> Cundinamarca Colombia/76 | C 312                 |
| A Argentina/79                           | E 64                  |
| C <sub>3</sub> Resende Brasil/55         | D 250                 |
| O <sub>1</sub> Campos Brasil/58          | G 85                  |

Obtida a biblioteca, a seleção dos plasmídeos, contendo o gene VP<sub>1</sub> (Fig. 1, etapas 15-17), é realizada em filtro de nitrocelulose, por hibridação do DNA dos plasmídeos com um DNA sonda (segmento sintético, contendo os últimos códons do VP<sub>1</sub>, marcado radioativamente). O filtro é depositado sobre a cultura de *E. coli*, nas placas, retirado e tratado, de modo a se promover a lise das bactérias, aderência e denaturação do DNA ao filtro. Solução, contendo a sonda, é adicionada, para hibridação. Por último, o filtro é lavado e submetido à radioautografia, para identificação das regiões, do filtro que correspondem às colônias de *E. coli* que contêm plasmídeos com o gene VP<sub>1</sub>. O filtro e o filme radioautográfico funcionam como mapa das culturas, nas placas.

O emprego das técnicas resultou na seleção de um plasmídeo, para cada um de seis subtipos de VFA (Fig. 2).

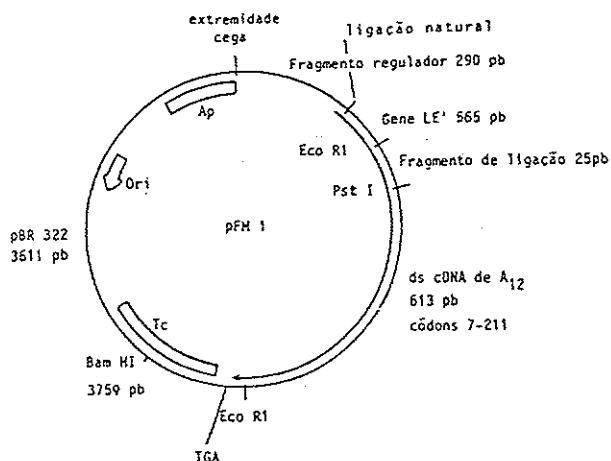
#### Estratégias para construção de vetores de expressão para VP<sub>1</sub>

*Vetor original* - A construção de cinco vetores de expressão, pFM1, pFM2, pFM3, pFM10 e pFM20, para o gene VP<sub>1</sub> de A<sub>12</sub>, visa testar diferentes segmentos e arranjos, a fim de determinar qual o vetor mais adequado. Os cinco vetores foram construídos através da ligação de cinco fragmentos, numerados de 1 a 5.

*Fragmento 1* - (Fig. 17), derivado do plasmídeo pBR322, compreende 3611pb e funciona como vetor do DNA clonado.

*Fragmento 2* - (Fig. 18), foi retirado do operon triptofano de *Escherichia coli*. Compreende o promotor, operador, local de iniciação do RNAm e a sequência codificadora do local de ligação ao ribossomo; tem 290pb e acaba um nucleotídeo, antes do códon de iniciação ATG do peptídeo IE do triptofano. Este fragmento é uma sequência de controle da expressão. Estando ligado, operativamente, com o gene VP<sub>1</sub>, controla e regula a expressão desse gene. Com isso, é possível aumentar o nível de expressão, colocando-se a cultura, de bactérias transformadas, para crescer em meio defini-

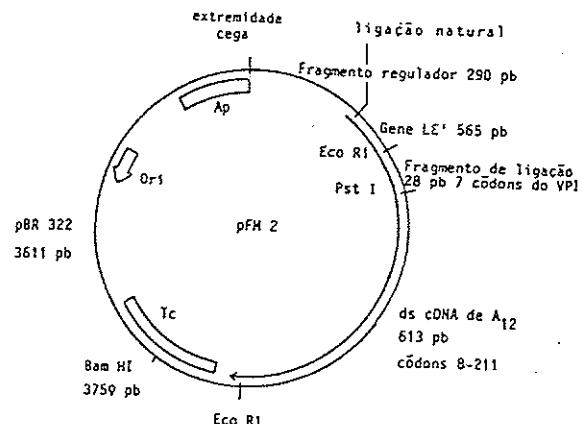
**Figura 3 - Composição do vetor de expressão pFM1. Proteína de fusão expressa pelo pFM1, constituída por 405 aminoácidos (190 aminoácidos gene LE = fragmento 3; 6 aas = fg. 4; 205 aas = VP<sub>1</sub> de A<sub>12</sub>, fg. 5; e 4 aas = pBR322, fg. 1), com peso molecular de 44,4kd. Porcentagem de cada fragmento no veículo de expressão: fg. 1 = 70,75%; fg. 2 = 5,68%; fg. 3 = 11,07%; fg. 4 = 0,49% e fg. 5 = 12,01%**



$3611 \text{ pb} + 290 \text{ pb} + 565 \text{ pb} + 25 \text{ pb} + 613 \text{ pb} = 5.104 \text{ pb}$   
O fragmento clonado no pBR322 (fgs. 2 + 3 + 4 + 5) equivale a 34,22% do seu tamanho.

ciente em triptofano. O Fragmento 2a difere do 2, por apresentar extremidades coesivas (Fig. 18).

**Figura 4** - Composição do vetor de expressão pFM2. Proteína de fusão expressa pelo pFM2, constituída por 406 aminoácidos (190 aas = gene LE, fig. 3; 8 aas = fg. 4a; 204 aas = VP<sub>1</sub> de A<sub>12</sub>, fig. 5; e 4 aas = pBR322, fig. 1), com peso molecular de 44,4kd. Porcentagem de cada fragmento no veículo de expressão: fg. 1 = 70,71%; fg. 2 = 5,68%; fg. 3 = 11,06%; fg. 4 = 0,65% e fg. 5 = 12,00%

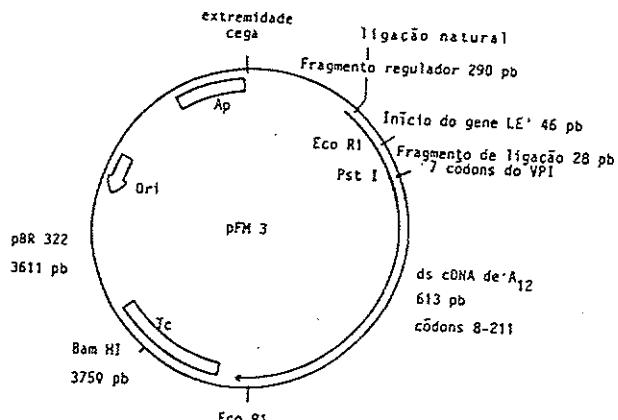


$$3611 \text{ pb} + 290 \text{ pb} + 565 \text{ pb} + 28 \text{ pb} + 613 \text{ pb} = 5107 \text{ pb}$$

Fragmento clonado no pBR322 (fgs. 2 + 3 + 4a + 5) equivale a 34,28% do seu tamanho.

**Fragmento 3** - (Fig. 19), com 565pb, contém o gene estrutural do peptídeo LE do triptofano. Também foi retirado do operon triptofano, onde se localiza, logo após o estabilidade do peptídeo VP<sub>1</sub>, pela produção de uma proteína de fusão, formada pelos peptídeos VP<sub>1</sub> e LE. O Fragmento 3a exibe as mesmas funções do 3. Difere pelo tamanho, por conter 46pb, que representam os 15 primeiros códons da proteína L (Fig. 19).

**Figura 5** - Composição do vetor de expressão pFM3. Proteína de fusão expressa pelo pFM3, constituída por 233 aminoácidos (17 aas = gene LE, fig. 3; 8 aas = fg. 4a; 204 aas = VP<sub>1</sub> de A<sub>12</sub>, fig. 5; e 4 aas = pBR322, fig. 1), com peso molecular de 25,5kd. Porcentagem de cada fragmento no veículo de expressão: fg. 1 = 78,71%; fg. 2 = 6,32%; fg. 3 = 1,00%; fg. 4a = 0,61% e fg. 5 = 13,36%



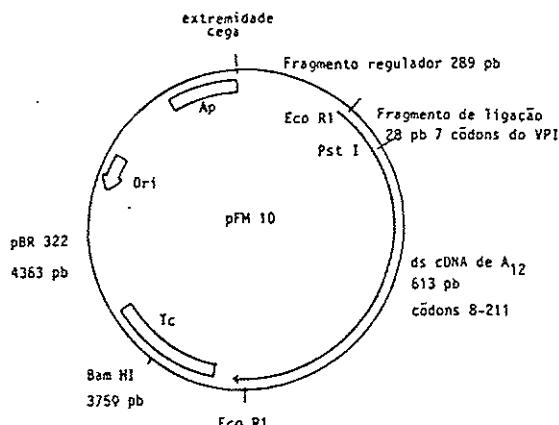
$$3611 \text{ pb} + 290 \text{ pb} + 46 \text{ pb} + 28 \text{ pb} + 613 \text{ pb} = 4588 \text{ pb}$$

O fragmento clonado do pBR322 (fgs. 2 + 3a + 4a + 5) equivale a 22,39% do seu tamanho.

*Fragments 4 e 4a* - Permitem por o ds cDNA do aftovírus em fase com a sequência de controle da regulação e com fragmento 3. O fragmento 4 (excisado de um plasmídeo, contendo o genoma da hepatite), compreende 25pb (Fig. 20). O Fragmento 4a (produzido pela ligação de cinco oligonucleotídeos sintéticos), compreende 28pb (Fig. 20). O primeiro códon do fragmento 4a codifica para uma metionina, que ficará localizada na proteína de fusão, entre os peptídeos LE e VP1. Como a metionina é cindível pelo CnBR, sua presença permite a clivagem da proteína de fusão. Além disso, o fragmento 4a fornece a sequência codificadora dos sete primeiros aminoácidos do VP1, com códons preferidos pelo hospedeiro *E. coli*.

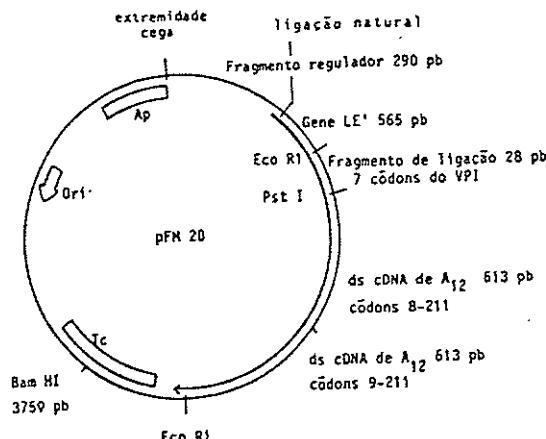
*Fragmento 5* - Sequência de ds cDNA de A<sub>12</sub>, que codifica para VP1. Compreende 613pb, que representam os códons 7-211 do VP1 (Fig. 21). Esse fragmento foi excisado do plasmídeo T465 (Fig. 2).

**Figura 6** - Composição do vetor de expressão pFM10. Proteína de fusão expressa pelo pFM10, constituída por 216 aminoácidos (8 aas = fg. 4a; 204 aas = VP1 de A<sub>12</sub>, fg. 5; e 4 aas = pBR322, fg. 1), com peso molecular de 23,6kd. Porcentagem de cada fragmento no veículo de expressão: fg. 1 = 82,43%; fg. 2 = 5,46%; fg. 4a = 0,53% e fg. 5 = 11,58%



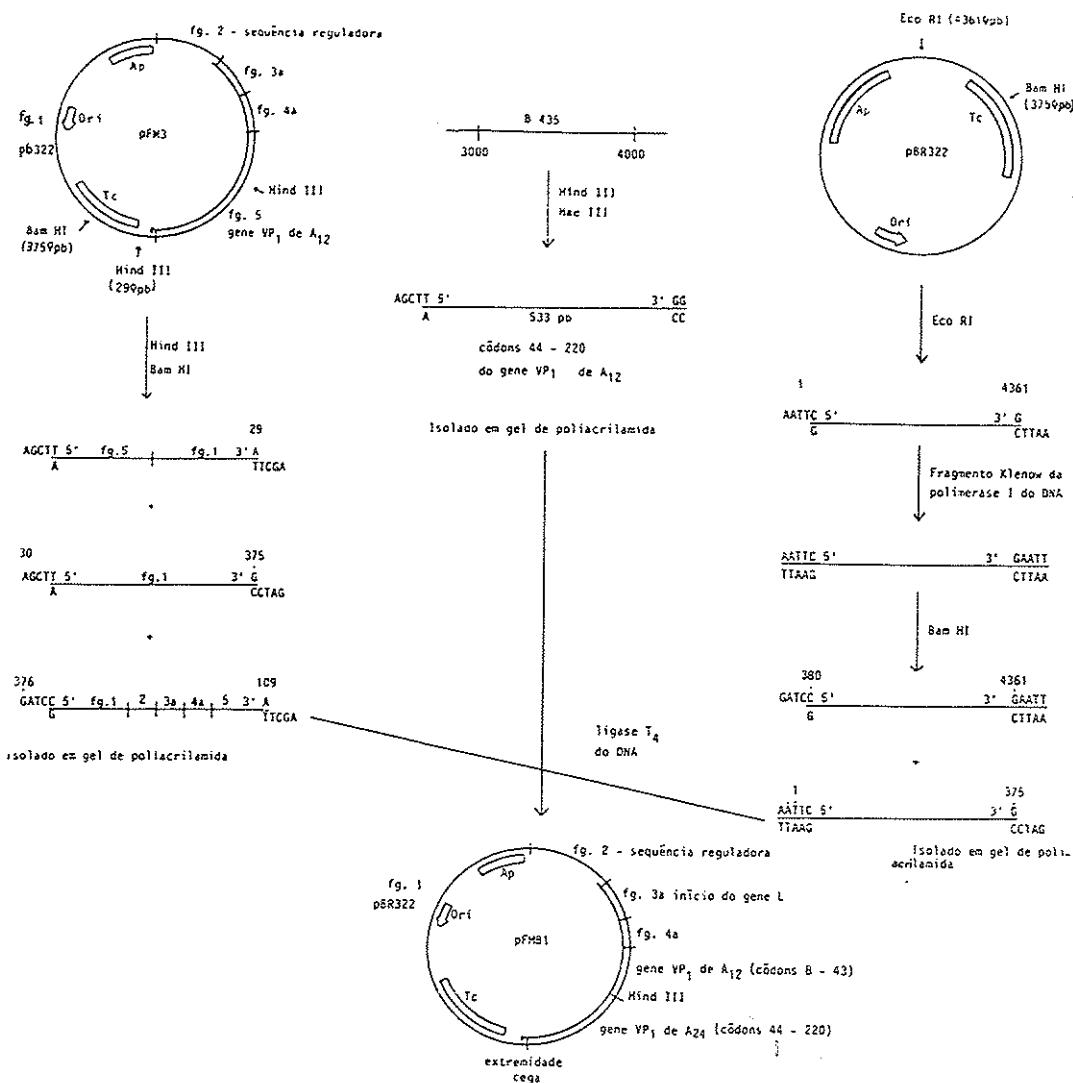
$4363 \text{ pb} + 289 \text{ pb} + 28 \text{ pb} + 613 \text{ pb} = 5293 \text{ pb}$   
O fragmento clonado no pBR322 (fgs. 2a + 4a + 5) equivale a 21,32% do seu tamanho.

**Figura 7** - Composição do vetor de expressão pFM20. Proteína de fusão expressa pelo pFM20, constituída por 609 aminoácidos (190 aas = gene LE, fg. 3; 8 aas = fg. 4a; 204 aas = VP1 de A<sub>12</sub>, fg. 5; 204 aas = VP1 de A<sub>12</sub>, fg. 5; e 4 aas = pBR322, fg. 1), com peso molecular de 66,8kd. Porcentagem de cada fragmento no veículo de expressão: fg. 1 = 63,12%; fg. 2 = 5,07%; fg. 3 = 9,88%; fg. 4a = 0,49%; fg. 5 = 10,72%; e fg. 5 = 10,72%



$3611 \text{ pb} + 290 \text{ pb} + 565 \text{ pb} + 28 \text{ pb} + 613 \text{ pb} + 613 \text{ pb} = 5720 \text{ pb}$   
O fragmento clonado no pBR322 (fgs. 2 + 3 + 4a + 5 + 5) equivale a 48,33% do seu tamanho.

**Figura 8 - Esquema de obtenção de pFMB1, vetor de expressão para o gene VP<sub>1</sub> de A<sub>24</sub> Cruzeiro Brasil/55.** Proteína de fusão, expressa pelo pFMB1, constituída por 248 aminoácidos (17 aas = fig. 3a; 8 aas = fig. 4a; 36 aas = códons 8-43 do gene VP<sub>1</sub> de A<sub>12</sub>; 177aas = códons 44-220 do gene VP<sub>1</sub> de A<sub>24</sub>; 10 aas = pBR322, fig. 1), com peso molecular de 27,3kd



A partir dos cinco fragmentos, anteriormente descritos, foram construídos cinco vetores de expressão para o gene VP<sub>1</sub> de A<sub>12</sub>. Os vetores construídos diferem pelos fragmentos 3 e 4 e as diferenças se refletem sobre o tipo de proteína expressa por cada vetor. O pFMI (Fig. 3), constituído pelos fragmentos 1, 2, 3, 4 e 5, expressa uma proteína de fusão que, além do VP<sub>1</sub>, contém a proteína LE. O pFMB2 (Fig. 4), formado pelos fragmentos 1, 2, 3, 4a e 5, expressa uma proteína praticamente idêntica à do pFMI. Porém, a substituição do fragmento 4 pelo 4a, permite introduzir, na proteína de fusão, uma metionina, entre os peptídeos LE e VP<sub>1</sub>, o que possibilita,

posteriormente, a separação do VP<sub>1</sub> da proteína de fusão. O pFM3 (Fig. 5), formado pelos fragmentos 1, 2, 3a, 4a e 5, expressa uma proteína de fusão menor que as anteriores, pois o peptídeo LE foi reduzido aos 17 aminoácidos iniciais, através da substituição do fragmento 3 pelo 3a. A proteína de fusão também pode ser clivada por CnBR, pela presença do fragmento 4a. O pFM10 (Fig. 6), formado pelos fragmentos 1a, 2a, 4a e 5, expressa apenas o VP<sub>1</sub>. Isto foi conseguido, ligando-se o fragmento 2a ao 4a. O pFM20 (Fig. 7), constituído pelos fragmentos 1, 2, 3, 4a e 5 expressa uma proteína de fusão, constituída por LE e dois VP<sub>1</sub>.

Entre os cinco vetores de expressão obtidos, o pFM3 revelou-se mais adequado, tanto no que se refere aos níveis de expressão, como às propriedades da proteína de fusão obtida.

**Vetores derivados** - A concentração de vetores de expressão para o VP<sub>1</sub>, de subtipos diferentes de A<sub>12</sub>, é realizada retirando-se, do pFM3, a sequência de ds cDNA de A<sub>12</sub> e colocando-se o ds cDNA, de outro subtipo, em seu lugar. É importante destacar que esse procedimento é mais vantajoso do que a construção de um novo vetor de expressão, obtido a partir de diferentes fragmentos, segundo modelo de pFM3. Requer-se menor número de manipulações, já que o sistema, formado pelos fragmentos 1 a 4, é mantido intacto e pode ser amplificado, como um todo.

Duas estratégias foram usadas na construção de novos plasmídeos: (a) retirada do ds cDNA de A<sub>12</sub>, criando-se extremidades coesivas, no pFM3, às quais se liga o novo ds cDNA, previamente tratado, de modo a apresentar extremidades complementares às do pFM3; e (b) retirada do ds cDNA de A<sub>12</sub>, criando-se, no pFM3, uma extremidade 3' cega, à qual se liga o novo ds cDNA, previamente tratado, de modo a apresentar uma extremidade 5' cega.

**pFMB1 - Vetor de expressão para o gene VP<sub>1</sub> de A<sub>24</sub> Cruzeiro Brasil/55** - O pFMB1, construído segundo estratégia de extremidades coesivas, é obtido através da ligação de três fragmentos (Fig. 8).

O primeiro fragmento (Fig. 8, coluna 1) é matriz derivada do pFM3. Contém um trecho do pBR322 (375° a 390°pb), a sequência reguladora da expressão (Fragmento 2, Fig. 18), o início do gene LE (Fragmento 3, Fig. 19), o fragmento 4a (Fig. 20) e o início do gene VP<sub>1</sub> de A<sub>12</sub> (códons 8-43).

O fragmento matriz é um dos produtos da clivagem do pFM3 com Bam HI e Hind III, separado dos outros dois fragmentos, resultantes da clivagem, em gel de poliacrilamida. Recebe a denominação de matriz, pelo fato de que, para transformá-lo em vetor de expressão, basta clonar, adequadamente, o DNA heterólogico e regenerar a parte do pBR322 removida.

O segundo fragmento (Fig. 8, coluna 2) é retirado do plasmídeo B435 (Fig. 2) e contém os códons 44-220 do gene VP<sub>1</sub> de A<sub>24</sub>. A excisão deste fragmento é realizada com as enzimas Hind III e Hae III, que clivam, respectivamente, no códon 43 e no final do gene VP<sub>1</sub> de A<sub>24</sub>.

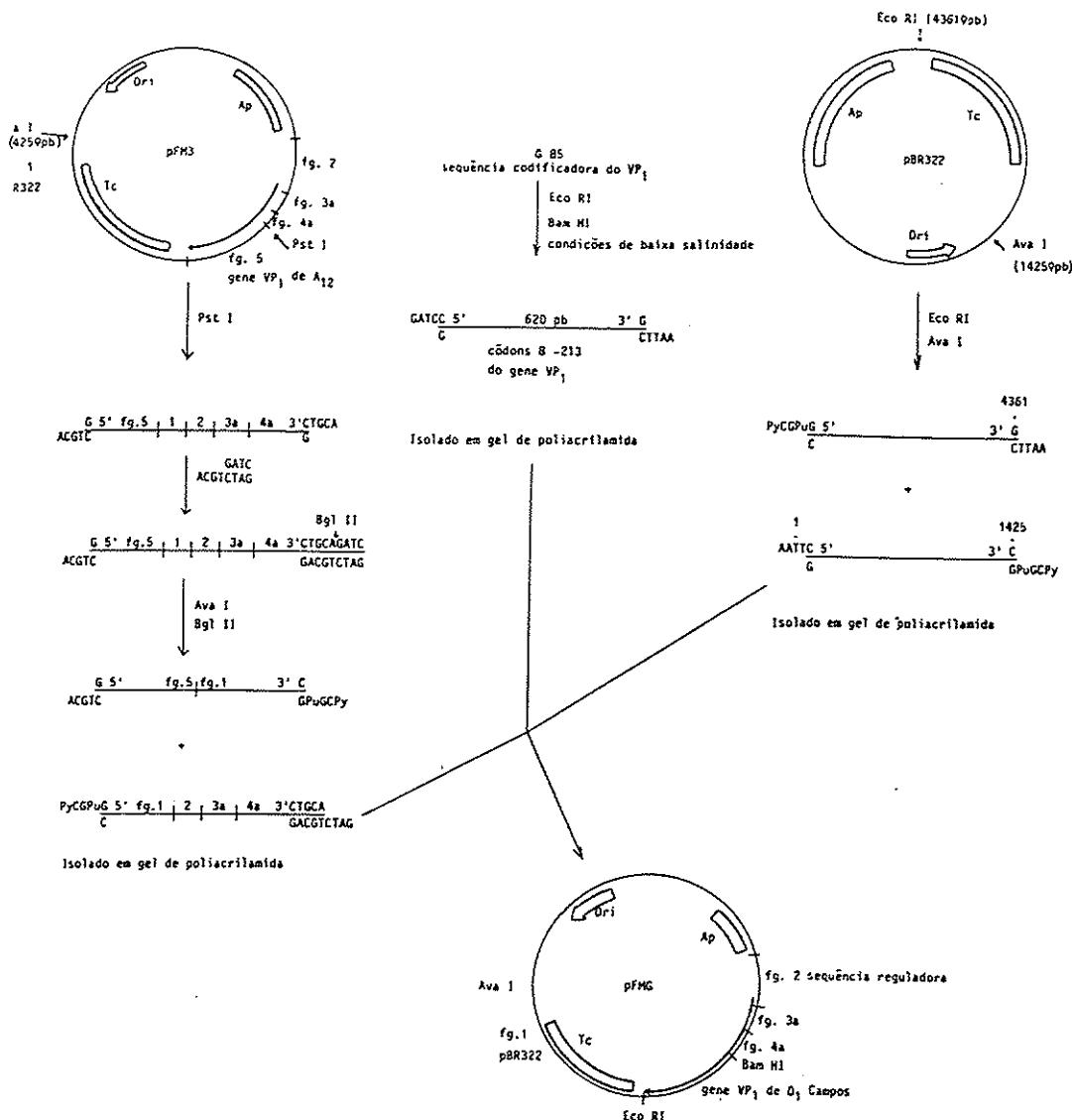
O terceiro fragmento (Fig. 8, coluna 3) é derivado do pBR322. O plasmídeo é clivado com Eco RI, a seguir é tratado com o fragmento Klenow para tornar cegas as extremidades e, por último, clivado com Bam HI. O tratamento com Bam HI da origem a dois fragmentos: um, contém a maior parte do pBR322 (376° - 4361°pb) e outro, o início do pBR322 (1° - 375°pb). Este último fragmento é isolado em gel de poliacrilamida e sua inclusão, no pFMB1, visa regenerar o determinante de resistência à tetraciclina do pBR322, uma vez que a parte inicial, do determinante, havia sido removida, com o final do gene VP<sub>1</sub> de A<sub>12</sub>.

A ligação dos três fragmentos, na presença da ligase T<sub>4</sub>, resulta no pFMB1, que expressa uma proteína de fusão, formada pelo início do peptídeo LE, início do peptídeo VP<sub>1</sub> de A<sub>12</sub> (códons 1-43) e pelo final do peptídeo VP<sub>1</sub> de A<sub>24</sub> (códons 44-220).

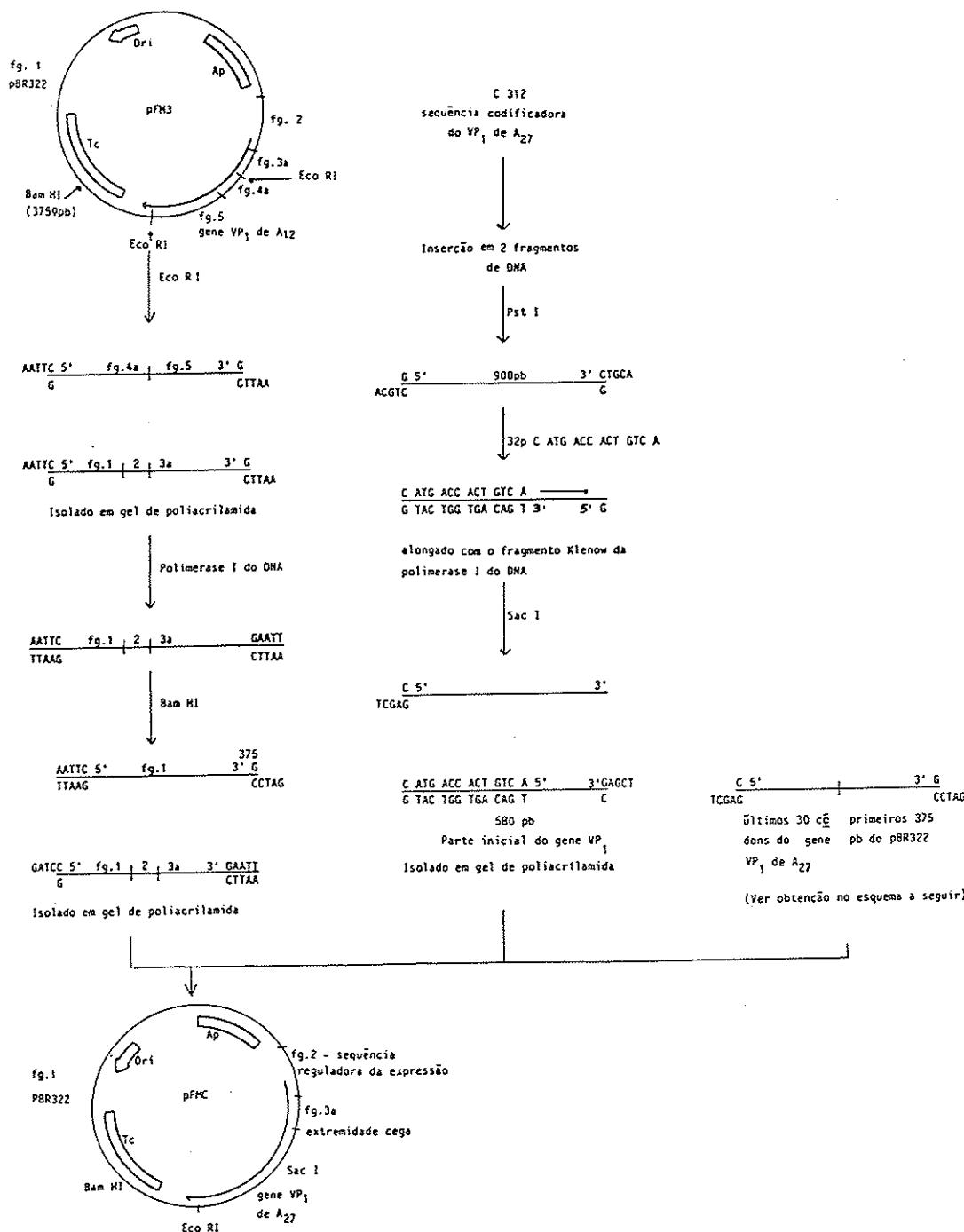
Figura 9 - Detalhe da sequência de bases do VP<sub>1</sub> de A<sub>12</sub> e A<sub>24</sub> (códons 6 a 9)

|                 | glu   | ser   | ala   | asp   |
|-----------------|-------|-------|-------|-------|
| A <sub>12</sub> | G A C | T G T | G C A | G A C |
| A <sub>24</sub> | G A A | T C A | G C A | G A C |
|                 | glu   | ser   | ala   | asp   |

**Figura 10** - Esquema de obtenção de pFMG, vetor de expressão para o gene VP<sub>1</sub> de O<sub>1</sub> Campos Brasil/58. Proteína de fusão, expressa pelo pFMG, constituída por 235 aminoácidos (17 aas = fg. 3a; 10 aas = fg. 4a; 204 aas = códons 8-213 do gene VP<sub>1</sub> de O<sub>1</sub> Campos; 4 aas = pBR322, fg. 1), com peso molecular de 23,7kd



**Figura 11 – Esquema de fusão de pFMC, vetor de expressão para o gene VP<sub>1</sub> de A<sub>27</sub> Cundinamarca Columbia/76. Proteína de fusão expressa pelo pFMC, constituída por 234 aminoácidos (17 aas = fg. 3a; 1 aa = metionina do iniciador, 212 aas = VP<sub>1</sub> de A<sub>27</sub>; e 4 aas = pBR322, fg. 1), com peso molecular de 23,6kd**



A manutenção da parte inicial do gene VP1 de A12 não implica na expressão de uma proteína, imunogenicamente, menos eficaz, dado que o determinante antigenico do VP1 de A24 não se localiza na parte inicial do peptídeo VP1. Além disso, a parte inicial dos peptídeos VP1 de A12 e A24 é muito semelhante, só diferindo em quatro aminoácidos (respectivamente 25, 32, 33 e 43). O gene VP1 de A12 poderia ter sido completamente removido do pFM3, usando-se a enzima PstI. Entretanto, o uso de tal enzima teria aumentado o número de manipulações, necessárias para clonagem do gene VP1 de A24, já que este gene não apresenta sítio de ação para enzima PstI. O sítio de ação desta enzima, no gene VP1 de A12, localiza-se nos códons 6 a 9 e não ocorre diferença nos aminoácidos, codificados por esses códons de A12 e os de mesmo número de A24. Entretanto, a diferença da terceira base do sexto códon (timidina, do gene VP1 de A12 e adenina, no gene VP1 de A24), entre os dois subtipos, faz com que, no VP1 de A24, não exista sítio Pst I (Fig. 9).

*pFMG - Plasmídeo de expressão para o gene VP1 de O<sub>1</sub> Campos Brasil/58* - A construção do vetor de expressão pFMG é muito semelhante à do pFMB1, diferindo apenas pelas enzimas empregadas.

Para obtenção do fragmento matriz, derivado do pFM3, foram usadas as enzimas Pst I, Bg II e Ava I e um "linker" (oligonucleotídeo) sintético (Fig. 10, coluna 1). Neste caso, o gene VP1 de A12 foi totalmente removido.

Para a excisão do gene VP1 do plasmídeo G85 (Fig. 2), foram usadas as enzimas Eco RI e Bam HI (Fig. 10, coluna 2).

Na obtenção do trecho inicial de pBR322, foram empregadas as enzimas Eco RI e Ava I (Fig. 10, coluna 3).

O produto de expressão do pFMG é uma proteína de fusão, formada pela parte inicial do peptídeo LE, pelo VP1 de O<sub>1</sub> Campos e por quatro aminoácidos do pBR322.

*pFMC - Vetor de expressão para o gene VP1 de A<sub>27</sub> Cundinamarca Colombia/76* - A construção do pFMC assemelha-se à dos dois últimos plasmídeos descritos, uma vez que, para o pFMC também é usado um fragmento matriz, derivado do pFM3, no qual é克lonado o gene VP1 de A<sub>27</sub> e o trecho removido do pBR322. Mas, difere das construções anteriores, pelo fato de que, na extremidade 3', do fragmento matriz, não ser criada extremidade coesiva, mas cega. Esta diferença está relacionada com o modo de obtenção do gene VP1.

A matriz, derivada do pFM3 (Fig. 11, coluna 1), é obtida por clivagem do pFM3 com Eco RI, o que dá origem a dois fragmentos. O maior deles é isolado em gel de poliacrilamida, tratado com fragmento de Klenow e clivado com Bam HI.

O maior dos dois fragmentos resultantes é a matriz derivada do pFM3. Esta é formada por um trecho do pBr322 (3750 - 3609 pb), a sequência reguladora da expressão e o início do gene LE.

O gene VP1 de A<sub>27</sub> é excisado do plasmídeo C312 (Fig. 2) e denaturado (Fig. 11, coluna 2). A seguir, é promovida síntese enzimática, usando-se, como iniciador, o seguinte fragmento sintético: C ATG ACC ACT GTC A. As bases sublinhadas indicam os primeiros códons do gene VP1 e permitem o emparelhamento do iniciador com o molde. A citidina inicial completa o último códon do fragmento 3' (início do gene LE) e faz com que o gene VP1, após a clonagem, fique em fase de leitura correta. O códon ATG codifica para uma metionina, que ficará localizada na proteína de fusão, entre os peptídeos codificados pelo início do gene LE e pelo VP1. Sendo a metionina cindível pelo CnBR, é possível clivar a proteína de fusão e isolar o VP1.

Após emparelhamento do iniciador com o molde, a extremidade 5' é tornada cega, através da atividade de exonuclease de 3' para 5' e de reparação, pela polimerase I. Os produtos da síntese enzimática são tratados com Sac I e isolados em gel de poliacrilamida. Deste modo, é obtido um fragmento de dupla hélice, contendo CAIG, seguida dos primeiros 182 códons do gene VP1 de A<sub>27</sub>.

Por outro lado, o C312 (Fig. 2) é tratado com Eco RI e Pst I e o fragmento obtido ligado a um fragmento Eco RI/Pst I, derivado do pBR322. O plasmídeo é amplificado e, dele, retirado, através de clivagem com Sac I e Bam HI, um fragmento, formado pelos últimos 30 códons de VP1 de A<sub>27</sub> e pelos primeiros 375pb do pBR322.

Este fragmento é ligado à matriz, derivada do pFM3 e ao início do gene VP1, na presença da ligase T<sub>4</sub>. O plasmídeo obtido, pFMV, expressa uma proteína de fusão, formada pelo início do peptídeo LE, pelo VP1 de A<sub>27</sub> e por quatro aminoácidos do pBR322.

**Figura 12 – Esquema de obtenção de pFMC, vetor de expressão para o gene VP<sub>1</sub> de A27 Cundinamarca Colombia/76**

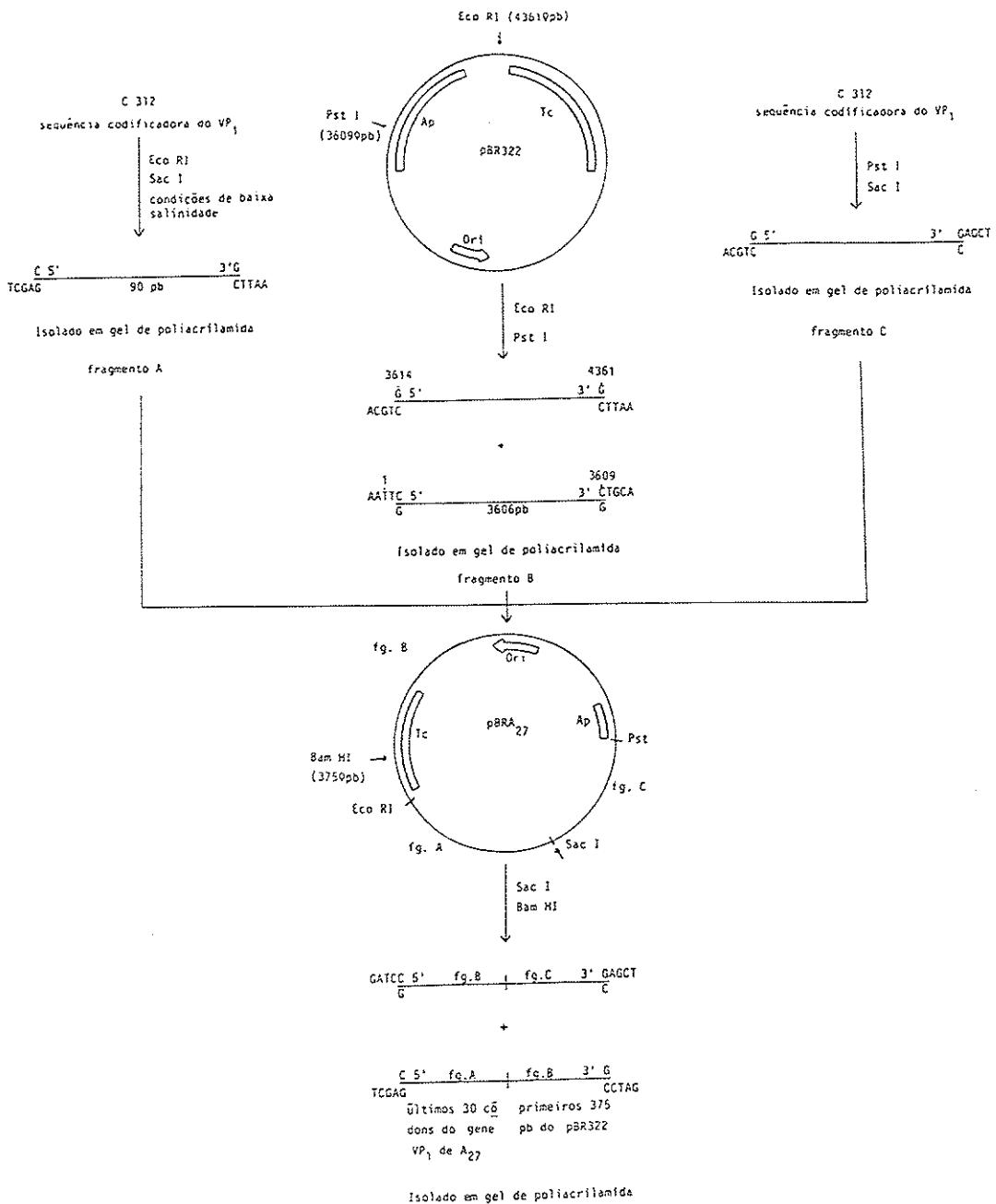


Figura 13 – Esquema de obtenção de vetor de expressão para o gene VP<sub>1</sub> de A Argentina/79

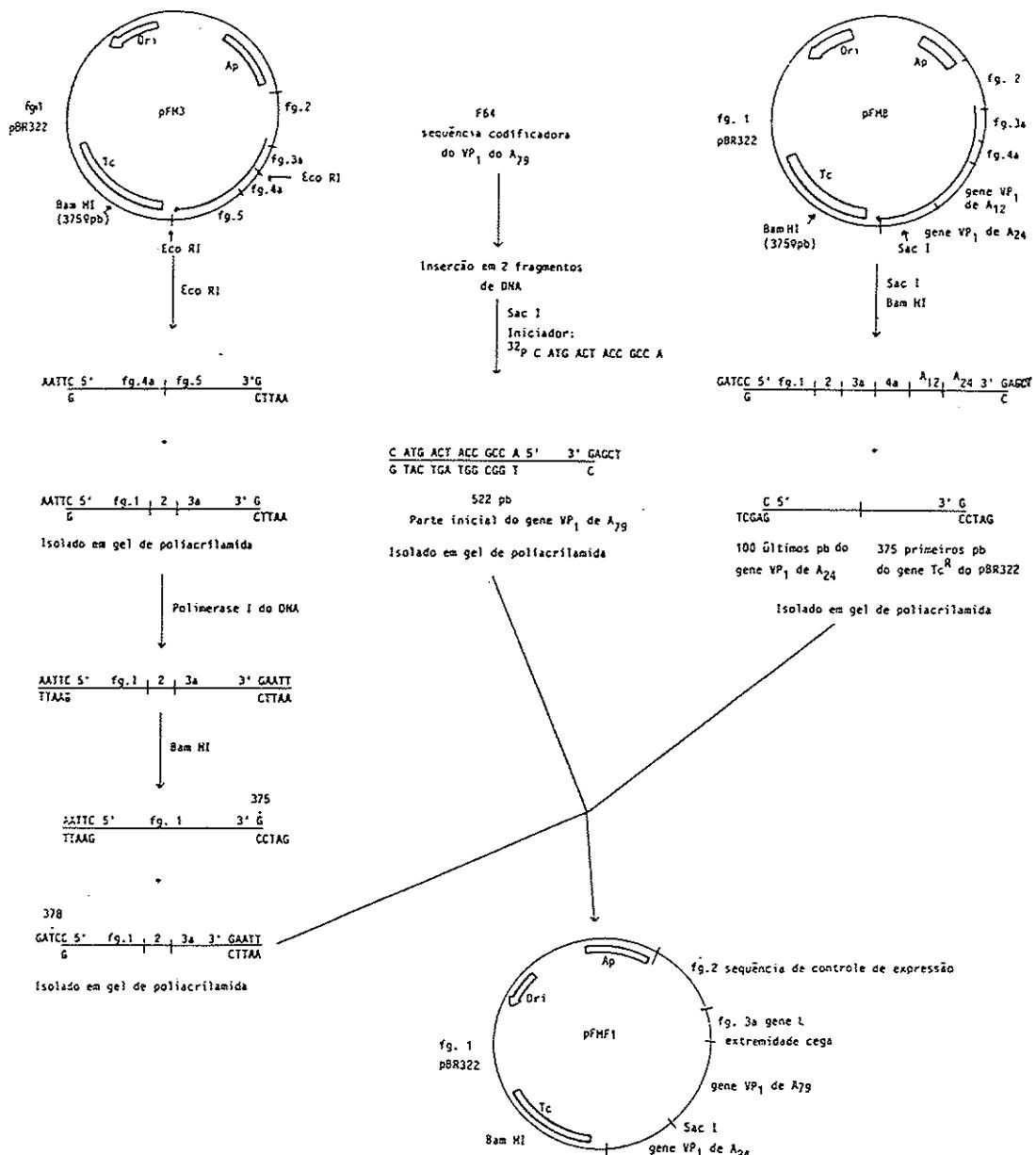
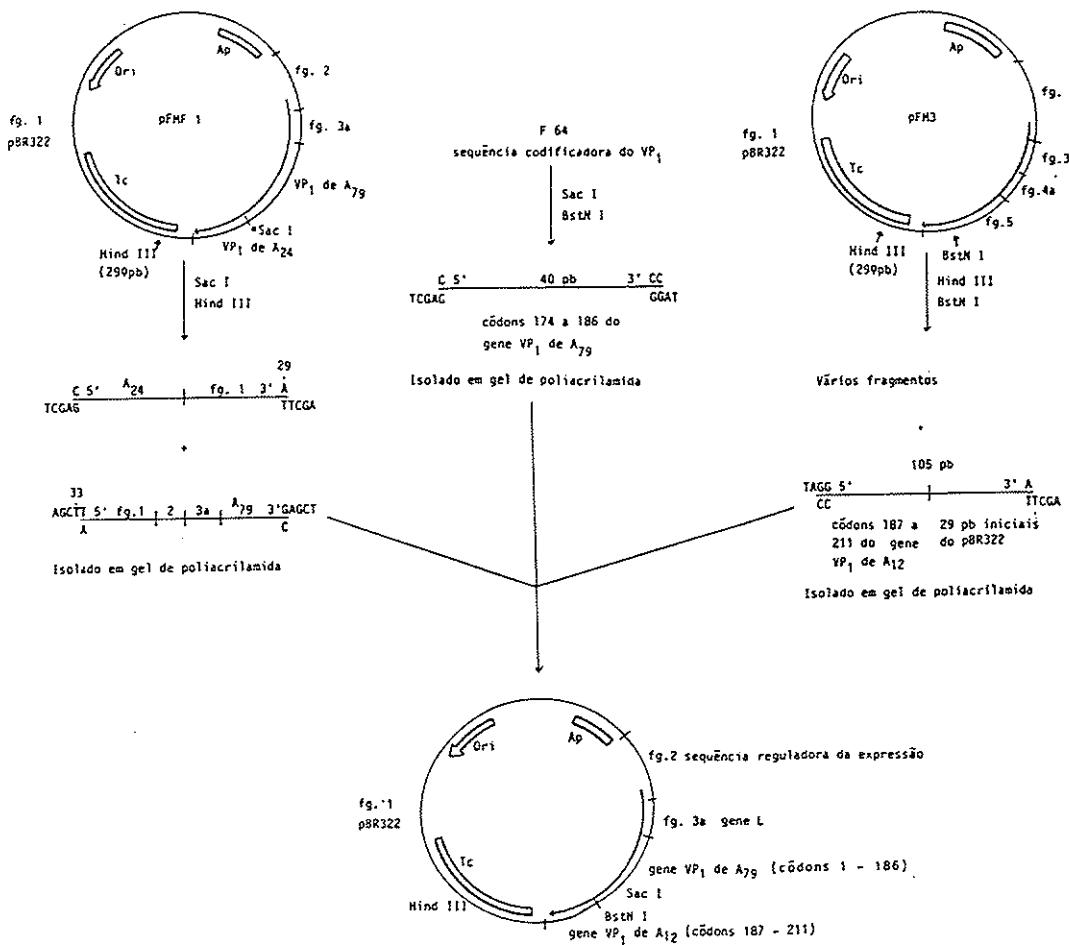


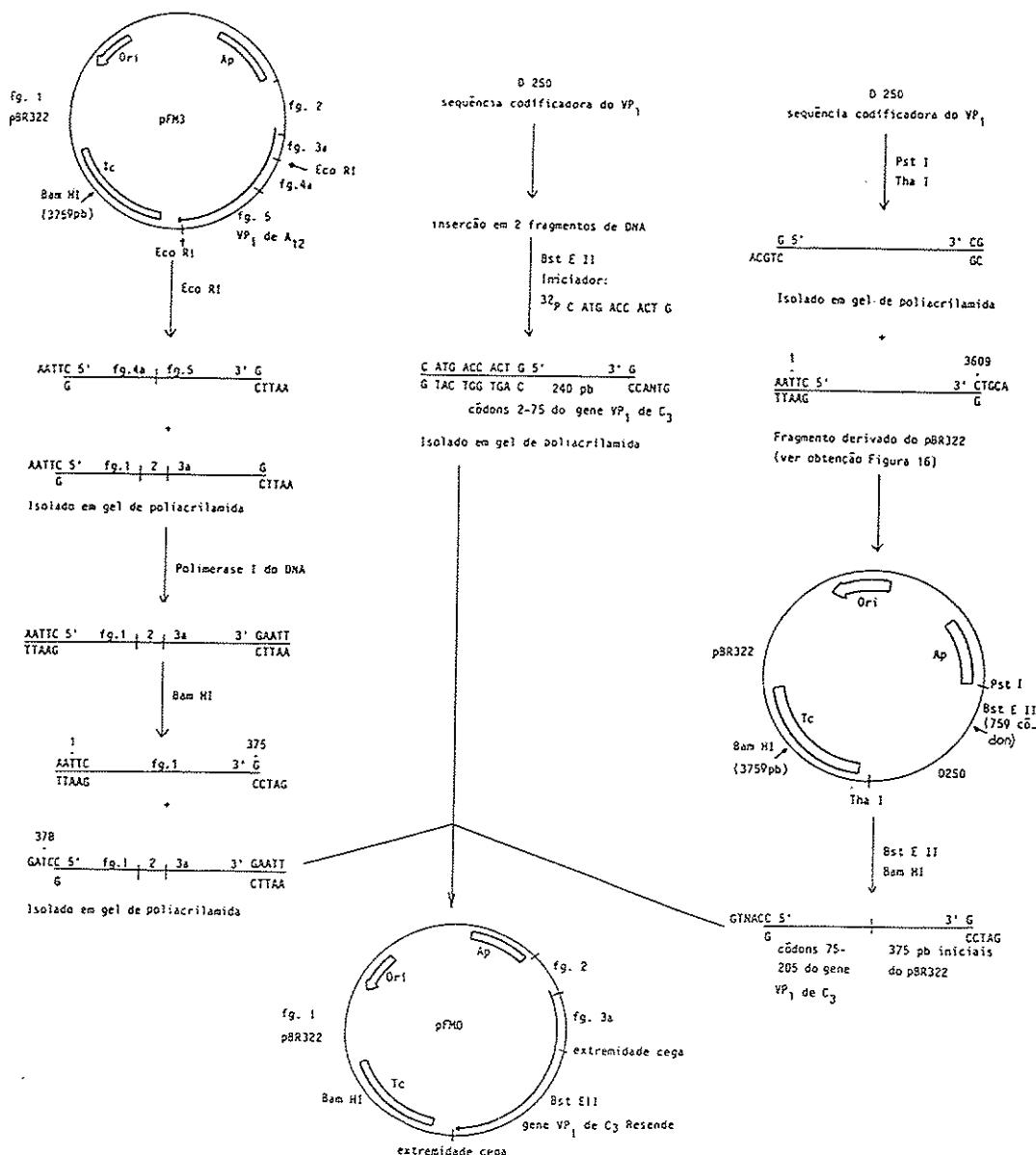
Figura 14 - Esquema de obtenção de vetor de expressão para o gene VP<sub>1</sub> de Argentina/79. Proteína de fusão, expressa pelo vetor, constituída por 232 aminoácidos (17 aas = fg. 3a; 1 aa = metionina do iniciador; 186 aas = gene VP<sub>1</sub> de A<sub>79</sub>; 24 aas = gene VP<sub>1</sub> de A<sub>12</sub>; e 4 aas = pBR322, fg. 1), com peso molecular de 23,4 kd.



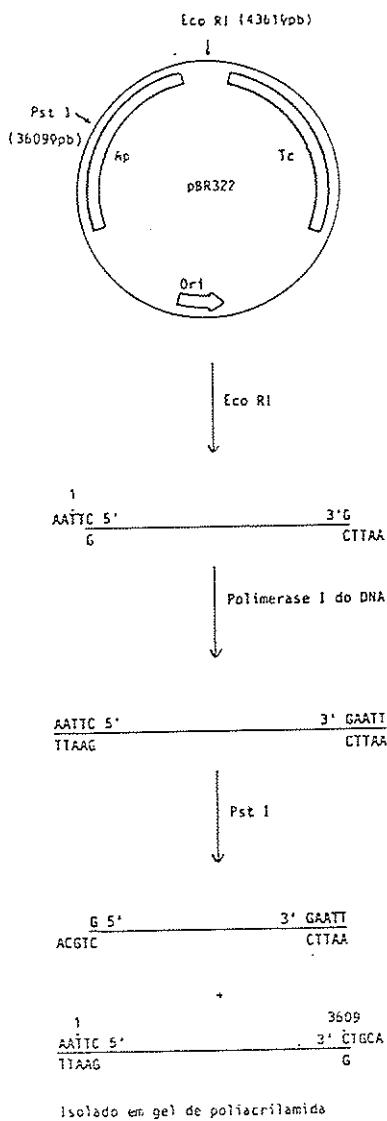
Vetor de expressão para o gene VP<sub>1</sub> de Argentina/79 - A construção deste vetor é muito semelhante à do anterior. Difere, apenas, pelo fato de se construir um plasmídeo intermediário, formado pela matriz, derivado do pFM3 (Fig. 15, coluna 1), pelo produto da síntese enzimática do gene VP<sub>1</sub> de A<sub>79</sub> (Fig. 15 - coluna 2) e por um trecho, derivado do pFMB (Fig. 15, coluna 3), formado pelo final do gene VP<sub>1</sub> de A<sub>24</sub> e pelos 375pb iniciais do pBR322.

O plasmídeo intermediário é amplificado e dele retirada a matriz, derivada do pFM3, ligada ao início do gene VP<sub>1</sub> de A<sub>79</sub> (Fig. 6, coluna 1). A este fragmento é ligada a parte final do gene VP<sub>1</sub> de A<sub>79</sub>, derivada do F64 (Fig. 16, coluna 2), um trecho derivado do pFM3, formado pelos últimos códons do VP<sub>1</sub> de A<sub>12</sub> e os 29pb iniciais do pBR322 (Fig. 16, coluna 3). O vetor, construído, expressa uma proteína híbrida, formada pelo peptídeo L, pelo VP<sub>1</sub> de A<sub>79</sub> e pelo final do VP<sub>1</sub> de A<sub>12</sub>.

**Figura 15** – Esquema de obtenção de pFMD, vetor de expressão para o gene VP<sub>1</sub> de C<sub>3</sub> Resende Brasil/55. Proteína de fusão, expressa pelo pFMD, constituída por 226 aminoácidos (17 aas = fg. 3a; 1 aa = metionina do iniciador; 204 aas = códons 2-205 do gene VP<sub>1</sub> de C<sub>3</sub> Resende; e 4 aas = pBR322, fg. 1), com peso molecular de 22,8kd



**Figura 16 – Esquema de obtenção de pFMD, vetor de expressão para o gene VP<sub>1</sub> de C<sub>3</sub> Resende Brasil/55**

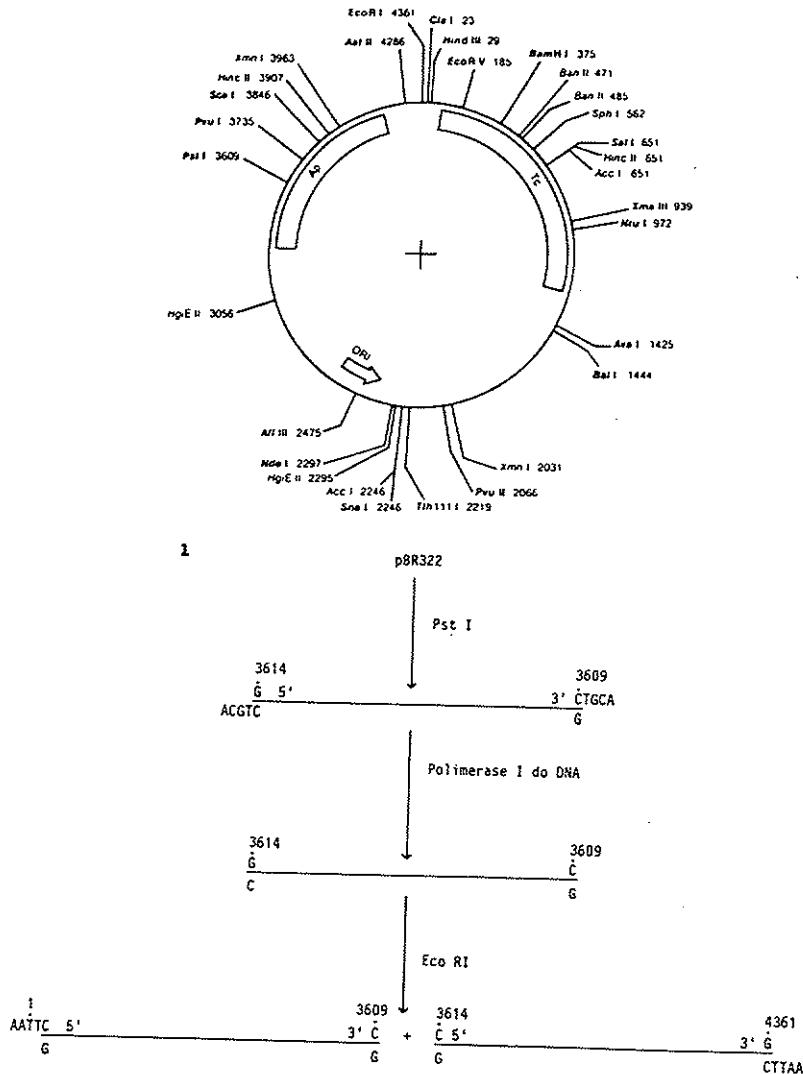


**pFMD - Vetor de expressão para o gene VP<sub>1</sub> de C<sub>3</sub> Resende Brasil/55** - A construção do pFMD é semelhante à dos dois últimos plasmídeos. A matriz, derivada do pFM3 (Fig. 15, coluna 1), é obtida do mesmo modo que no caso de pFM.

O início do gene VP<sub>1</sub> de C<sub>3</sub> (Fig. 15, coluna 2) é obtido através de síntese enzimática, usando-se um iniciador, semelhante ao descrito para os plasmídeos pFMC e o descrito para o gene VP<sub>1</sub> de Argentina/79. Os produtos da síntese são clivados com *Bst* EII.

A parte final do VP<sub>1</sub> de C<sub>3</sub> (Fig. 15, coluna 3) é excisada de um plasmídeo, juntamente com os 375pb iniciais do pBR322. Este plasmídeo é o produto da clonagem do fragmento *Pst* I/*Tha* I, derivado do gene VP<sub>1</sub> de C<sub>3</sub> no pBR322, previamente tratado para a clonagem (Fig. 16).

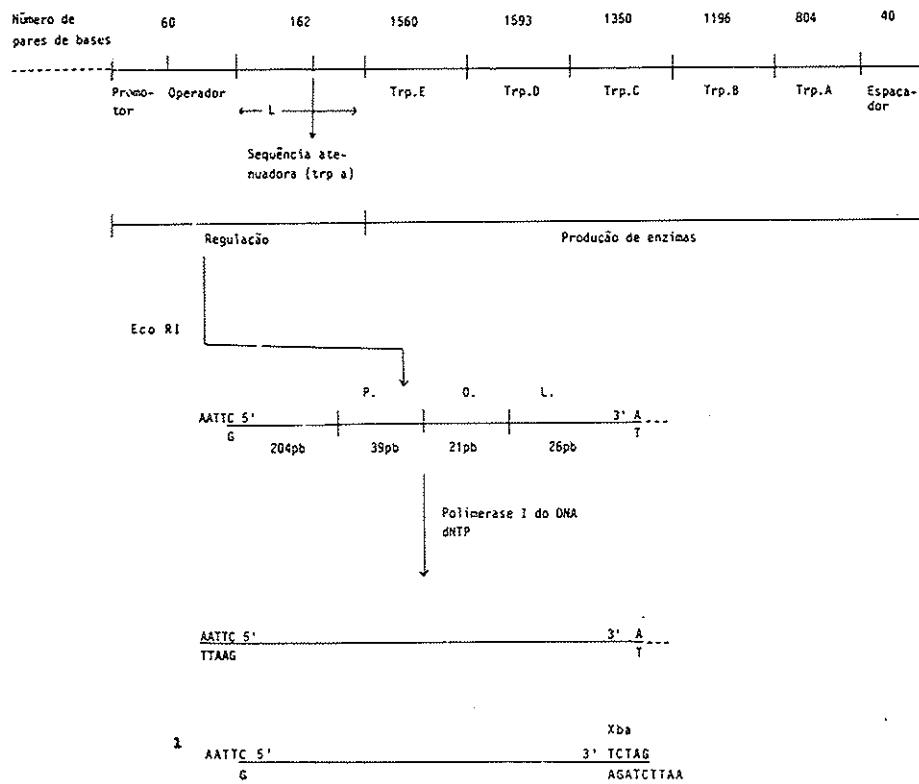
**Figura 17** - Mapa de restrição do DNA de pBR322 (escala: 180 bases/cm). Palavras escurcidas: enzimas que clivam o DNA uma única vez. Para efeitos de numeração dos nucleotídeos, convencionou-se considerar a primeira timidina do único sítio Eco RI como sendo o primeiro nucleotídeo  
**Símbolos:** <sup>1</sup> = Obtenção do fragmento 1 a partir do pBR322



Isolado em gel de poliacrilamida

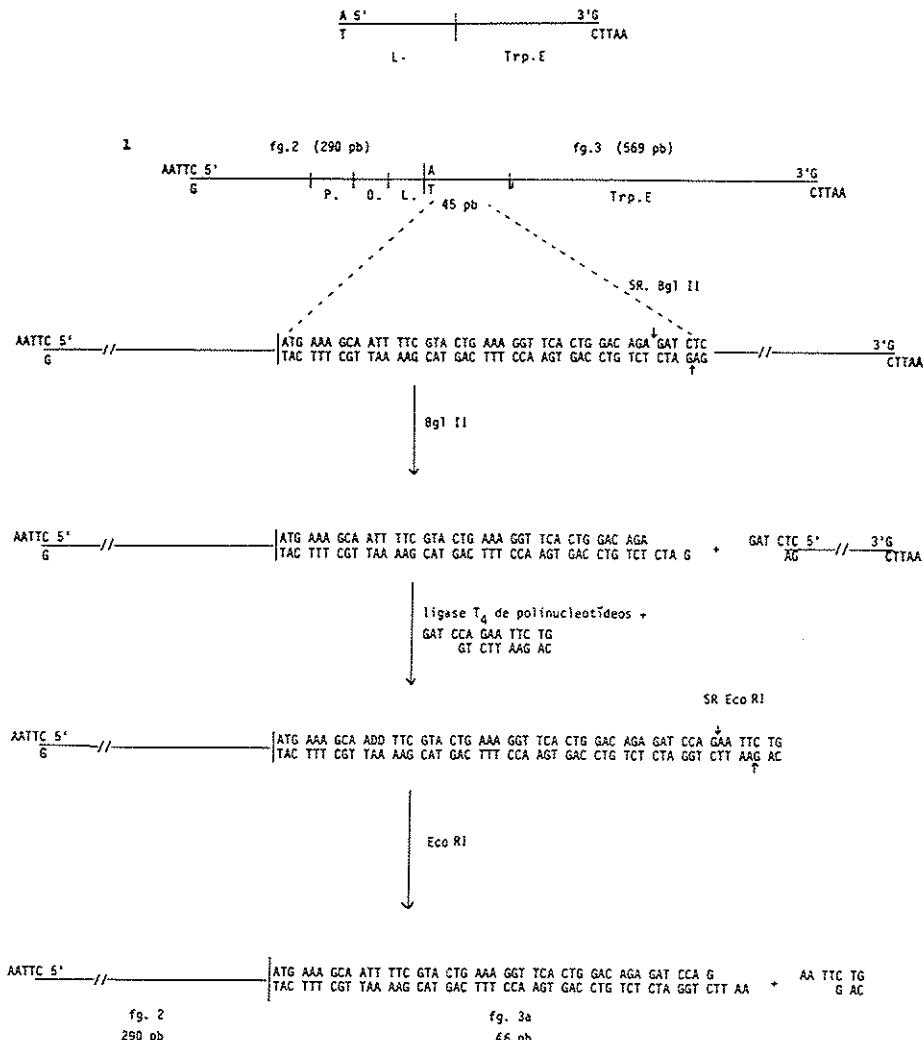
**Figura 18 - Estrutura gênica do fragmento 2.** Este fragmento contém o promotor, operador, local de iniciação do RNAm e sequência codificadora do local de ligação ao ribossomo do operon triptofano de *Escherichia coli*. Termina um nucleotídeo antes do códon de iniciação ATG do peptídeo L do trp. e compreende 290pb

**Símbolos:** <sup>1</sup> = Fragmento 2a difere do fragmento anterior pelo fato de apresentar um local Xba, antes do códon de iniciação ATG, e pelo fato de apresentar extremidades coesivas



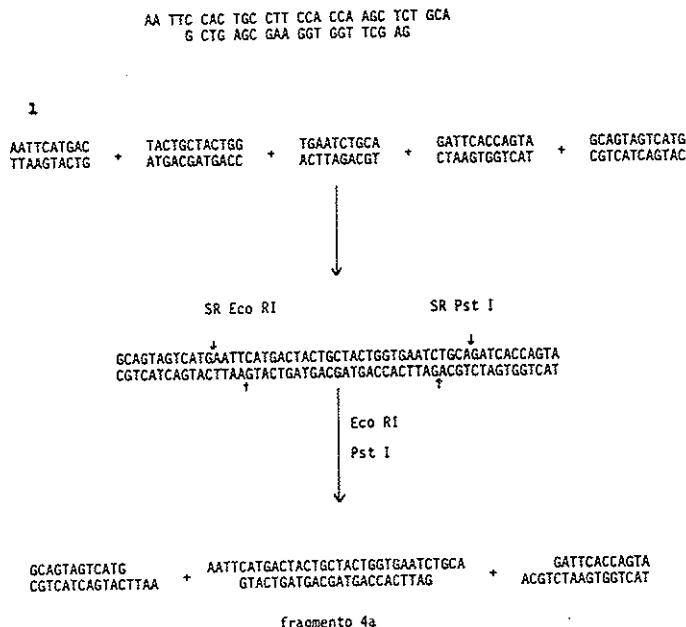
**Figura 19** – Estrutura gênica do fragmento 3. Este fragmento contém o gene estrutural da proteína LE do triptofano e está naturalmente ligado ao fragmento 2. O códon de terminação do gene E do trp. foi substituído por um local Eco RI. Compreende 565pb.

**Símbolos:** 1 = Fragmento 3a. Esta molécula de DNA contém os 15 primeiros códons da proteína L e está naturalmente ligado ao fragmento 2. Compreende 46pb

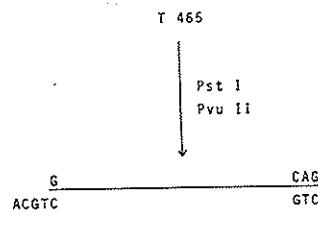


**Figura 20 - Estrutura gênica do fragmento 4.** Este fragmento contém 7 códons e apresenta extremidade 5' Eco RI e 3' Pst I. Foi excisado de um plasmídeo que tinha clonado o genoma de hepatite. Compreende 265pb.

**Símbolos:** <sup>1</sup> = Fragmento 4a. Contém 8 códons e é delimitado por um local Eco RI e um local Pst I. Esta molécula de DNA sintético foi produzido pela ligação de 5 oligonucleotídeos sintéticos, sintetizados pelos métodos de Crea & col. O fragmento 4a comprehende 28pb



**Figura 21 - Estrutura gênica do fragmento 5.** Este fragmento comprehende o gene VP<sub>1</sub> de A<sub>12</sub> (códons 7-211)



**Figura 22 - Endonucleases de restrição**

| ENZIMA   | SEQUÊNCIA                                     | Nº DE SITIOS DE RESTRIÇÃO NO pBR322 <sup>+</sup> | MICROORGANISMO                        |
|----------|---|--|---------------------------------------|
| Ava I    | 5' .. CPyCGPuG .. 3'<br>3' .. GPyUGCPyC .. 5' | 1  | <u>Anabaena variabilis</u>            |
| Bam HI   | 5' .. GGATCC .. 3'<br>3' .. CCTAGG ..         | 1  | <u>Bacillus amyloliquefaciens</u> H   |
| Bst EII  | 5' .. GGTNACC .. 3'<br>3' .. CCANTGG .. 3'    | 0  | <u>Bacillus stearothermophilus</u> ET |
| Bst XI   | 5' .. CCG .. 3'                               | 6  | <u>Bacillus stearothermophilus</u> N  |
| Bgl II   | 5' .. AGATCT .. 3'<br>3' .. TCTAGA .. 5'      | 0  | <u>Bacillus globigii</u>              |
| Eco RI   | 5' .. GAATT .. 3'<br>3' .. CTTAAG .. 5'       | 1  | <u>Escherichia coli</u><br>R413       |
| Hae III  | 5' .. GGCC .. 3'<br>3' .. CCCG .. 5'          | 22   | <u>Haemophilus aegyptius</u>          |
| Hind III | 5' .. AAGCTT .. 3'<br>3' .. TTGCA .. 5'       | 1  | <u>Haemophilus influenzae</u><br>Rd   |
| Pst I    | 5' .. CTGCAG .. 3'<br>3' .. GACGTC ..         | 1  | <u>Providencia Stuardii</u><br>164    |
| Pvu II   | 5' .. CAGCTG .. 3'<br>3' .. GTGCAC .. 5'      | 1  | <u>Proteus vulgaris</u>               |
| Sac I    | 5' .. GAGCTC .. 3'<br>3' .. CTGAG .. 5'       | 0  | <u>Streptomyces achromogenes</u>      |
| Tha I    | 5' .. CGCG .. 3'<br>3' .. GCGC .. 5'          | 23   | <u>Thermoplasma acidophilus</u>       |

## Referências Bibliográficas

1. Bachrach, H.L. - Foot-and-mouth disease. Annual Review of Microbiology, 22:201-244, 1968.
2. Bachrach, H.L.; Swaney, J.B. & Woude, G.F.V. - Isolation of the structural polypeptides of foot-and-mouth disease virus and analysis of their c-terminal sequences. Virology, 52:520-528, 1973.
3. Bachrach, J.L.; Moore, D.M.; McKercher, P.D. & Polatnick, J. - Immune and antibody responses to an isolated capsid protein of foot-and-mouth disease virus. The Journal of Immunology, 115:1636-1641, 1975.
4. Bachrach, H.L.; Morgan, D.O.; McKercher, P.D.; Moore, D.M. & Robertson, B.H. - Foot-and-mouth disease virus: immunogenicity and structure of fragments derived from capsid protein VP3 and virus containing cleaved VP3. Veterinary Microbiology, 7:85-96, 1982.
5. Bittle, J.L. - Immunization with chemically synthesized peptide derived from FMDV polypeptide VP1. In: - Modern approaches to vaccines. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 31 Ago - 4 Set. 1983: abstracts. New York, Cold Spring Harbor, p.19, 1983.
6. Bittle, J.L.; Houghten, R.A.; Alexander, H.; Shinnick, J.G.S. & Lerner, R.A. - Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesizes peptide predicted from the viral nucleotide sequence. Nature, 298:30-33, 1982.
7. Boothroyd, J.C.; Highfield, P.E.; Cross, G.A.M.; Rowlands, D.J.; Lowet, P.A.; Brown, F. & Harris, T.J.R. - Molecular cloning of foot and mouth disease virus genome and nucleotide sequences in the structural protein genes. Nature, 290:800-802, 1981.
8. Callis, J.J. - Vacuna contra la fiebre aftosa basada en ingenieria genética. In: - Reunión Interamericana de Directores de Salud Animal, 3, Buenos Aires, 14p., 1981.
9. Henderson, W. - The potential of genetic manipulation for the improvement of vaccines against animal diseases in developing countries. Viena, UNIDO, 19p., 1981.
10. Henderson, W.M. - Prospects for the use of vaccines prepared by genetic engineering techniques. In: - Conference of Foot and Mouth Disease Commission, 16, Paris, OIE, 14-17 Set. 1982: proceedings. Paris, OIE, 2v., p.399-408, 1982.
11. Kleid, D.G.; Yansura, D.; Small, B. & Dowbenko, D. - Cloned viral protein vaccine for foot-and-mouth disease: responses in cattle and swine. Science, 214:1125-1129, 1981.
12. Kleid, D.G. - Control of foot-and-mouth disease future utilization of genetic engineering technology. s.n.t. 12p.
13. Kleid, D.G. - Using genetically engineering bacteria for vaccine production. In: - Engineering Foundation Conferences on Biochemical Engineering, 3, Santa Barbara, 16p., 1982.
14. Kupper, H.; Keller, W.; Kurz, C.; Forss, S. & Schaller, H. - Cloning of cDNA of major antigen of foot and mouth disease virus and expression in *E. coli*. Nature, 289:555-559, 1981.
15. La Torre, J.L.; Grubman, B.B.; Baxt, B. & Bachrach, H.L. - The structural polypeptide of aphthovirus are phosphoproteins. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 77:7444-7447, 1980.
16. McKercher, P.D.; Moore, D.M.; Morgan, D.O.; Robertson, B.H.; Callist, J.J.; Kleid, D.G.; Shire, S.; Yansura, D. & Small, B. - Genetically-engineered polypeptide antigen for foot-and-mouth disease: a dose response in cattle. Genentech, 4p.
17. Moore, D.; Morgan, D.; Robertson, B.; McKercher, P.; Patzer, E.; Shire, S. & Kleid, D. - A highly antigenic portion of FMDV O1 VP1 elicits bovine antibodies that protect mice but not cattle from FMDV infection. In: - Modern approaches to vaccines. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 31 Ago. - 4 Set. 1983: abstracts. New York, Cold Spring Harbor, p.26, 1983.
18. Office of Technology Assessment/OTA - Genetic technology: a new frontier. London, 331p., 1982.

19. Production of novel vaccine against foot-and-mouth disease. Biotechnology General, 20p., 1982.
20. Robertson, B.H.; Moore, D.M.; Grubman, M.J.; Kleid, D.G. - Identification of an exposed region of the immunogenic capsid polypeptide VP<sub>1</sub> on foot-and-mouth disease virus. Journal of Virology, 46:311-316, 1983.
21. Rodrigues, R.L. & Tait, R.C. - Recombinant DNA techniques. London, Addison-Wesley, 240p., 1983.
22. Rowlands, D.J. - Comparative structural studies of the antigenic sites of foot-and-mouth disease virus. In: - Modern approaches to vaccines. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 31 Ago. - 4 Set. 1983: abstracts. New York, Cold Spring Harbor, p.29, 1983.
24. Sangar, D.V.; Black, D.N.; Rowlands, D.J. & Brown, F. - Biochemical mapping of the foot-and-mouth disease virus genome. Journal of General Virology, 35:281-297, 1977.

#### Patentes

25. GB 2 084 583 A. - Synthetic DNA and processes thereto. The Wellcome Foundation Ltd. Inventor: Charles John Boothroyd.
26. GB 2 103 622 A. - Production of foot-and-mouth disease vaccine from microbially expressed antigens. Genentech Inc. Inventors: Daniel G. Yansura & Dennis G. Kleid.
27. GB 2 112 395 A. - Recombinant cloning vector. The Wellcome Foundation Ltd. Inventor: Andrew Easton.
28. WO 82/03632. - cDNA representing RNA viral sequences. MIT (Massachusetts Institute of Technology). Inventor: David Baltimore.
29. ZA 82/4174. - Production of foot-and-mouth disease vaccine from microbially expressed antigens thereof. Genentech Inc. Inventors: Dennis Kleid & Daniel G. Yansura.

MICRORGANISMOS ENTEROPATOGÊNICOS EM MOSCAS AFRICANAS  
PERTENCENTES AO GÊNERO *CHRYSMYIA* (DIPTERA, CALLIPHORIDAE)  
NO BRASIL

Sirdeia Maura Perrone Furlanetto  
Maria Lúcia Cerqueira Campos  
Charlotte Marianna Hársi

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

Geraldo M. Buralli  
& George K. Ishihata

Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN  
Rua Tamandaré, 693/59  
01525 São Paulo SP, Brasil

**Resumo**

Pesquisa de microrganismos enteropatogênicos, em moscas pertencentes ao gênero *Chrysomyia*, recentemente introduzidas no Brasil. Os dipteros foram capturados em 16 bancas de pescado, em feiras livres, na cidade de São Paulo. Posteriormente, foram classificados quanto à espécie. O exame bacteriológico objetivou a pesquisa de *Salmonella* sp., *Shigella* sp., e *Escherichia coli* enteropatogênica e o exame virológico restringiu-se a enterovírus. Em 16 bancas de pescado foram capturados califorídeos de *C. megacephala*, enquanto que *C. chloropyga* foi coletada em apenas 9 (56,25%) bancas. De uma amostra (11,11%) correspondente à espécie *C. chloropyga* foi isolada *Salmonella agona*. Do total de amostras analisadas 13 (81,25%) revelaram a presença de *E. coli* não enteropatogênica. De duas amostras (12,50%), da espécie *C. megacephala*, foram isolados poliovírus tipo III.

**Summary**

*Enteropathogenic microorganisms in flies belonging to the genus Chrysomyia (Diptera, Calliphoridae) in Brazil*

To analyse the presence of some enteropathogenic microorganisms in flies belonging to the genus *Chrysomyia* newly introduced in Brazil diptera, were collected from 16 free market fisheries of the city of São Paulo and afterwards classified in species. The bacteriological examination was carried for identification of *Salmonella* sp., *Shigella* sp., and enteropathogenic *Escherichia coli*, while the virologic examination was restricted to enterovirus. *C. megacephala* was found in 16 samples. Whereas *C. chloropyga* was collected only in 9 (56,25%). From one sample (11,11%) of *C. chloropyga*, *Salmonella agona* was isolated. 13 (81,25%) showed non enteropathogenic *E. coli*. From two samples (12,50%) of *C. megacephala*, poliovirus type III was isolated.

## Introdução

Recentemente, foram introduzidas, no Brasil, três espécies de moscas varejeiras, do gênero *Chrysomyia*, denominadas *C. megacephala* Fabricius, *C. chloropyga* Wiedemann e *C. albiceps* Wiedemann. São insetos califorídeos, amplamente distribuídos nas Regiões Oriental, Etiópica e Australiana. No Brasil, a primeira constatação foi feita a partir de exemplares coletados nas cidades de São Paulo, Santos e Curitiba (7, 10). Provavelmente, a introdução deve ter ocorrido durante o período em que houve incremento de relações comerciais entre o Brasil e países europeus, e devido ao afluxo de barcos, transportando pessoas refugiadas, oriundas de Angola, para as regiões costeiras brasileiras, nos anos de 1975 e 1976, portando animais domésticos e, em suas bagagens, diferentes tipos de mantimentos.

Guimarães & col. (8) resumiram os fatores que estariam relacionados à distribuição geográfica das espécies e sua introdução; as moscas varejeiras chegaram ao sul deste do país e avançaram, posteriormente, em todas as direções. *C. chloropyga* possui maior capacidade de dispersão e sua ocorrência foi registrada em quase a totalidade dos municípios paulistas, assim como em pontos extremos do território brasileiro, como Belém do Pará, Ponta Porã, em Mato Grosso e Porto Alegre, no Rio Grande do Sul. *C. megacephala*, embora com poder de dispersão menor que a espécie anteriormente citada, foi registrada nos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro, atingindo sua densidade máxima em zonas urbanas. *C. albiceps*, também com baixo poder de dispersão, vem ocorrendo, preferencialmente, em zonas urbanas, apresentando, entretanto, baixa densidade em relação às outras duas espécies.

A introdução, no Brasil, de espécies oriundas das Regiões Oriental e Etiópica foi facilitada pelas similaridades climáticas, além do fato de que *C. chloropyga* apresenta nicho ecológico semelhante a *Cochliomyia macellaria* Fabricius, califorídeo comumente encontrado no Brasil e que parece estar, atualmente, em intensa competição interespecífica com a primeira. A este respeito, cumpre salientar que a *C. chloropyga* chegou a representar 87,48% do total de califorídeos coletados em Campinas, no Estado de São Paulo (11).

Do ponto de vista epidemiológico, as espécies de *Chrysomyia* causam preocupação a sanitaristas, dada sua capacidade de dispersão, densidade populacional e diversificação no hábito alimentar, que pode variar desde fezes, lixo e carnes em decomposição até alimentos frescos e, principalmente (5), pelo fato de poderem transportar agentes patogênicos.

Com base no exposto e dada a ausência de estudos, no Brasil, relativos à presença de microrganismos patogênicos nas espécies de moscas do gênero *Chrysomyia*, foram coletados exemplares destes insetos em bancas de pescado de feiras livres, na cidade de São Paulo, classificados a nível de espécie, e verificada a presença de *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Escherichia coli* enteropatogênica, assim como de enterovírus.

## Material e Métodos

*Obtenção e preparo das amostras* - Foram capturadas oito amostras de moscas do gênero *Chrysomyia*, entre março e setembro de 1979, em bancas de pescado de oito feiras da cidade de São Paulo, Brasil.

Um ano após a primeira coleta, foram feitas novas capturas, nas mesmas feiras, perfazendo um total de 16 amostras analisadas, sendo duas para cada feira. A captura foi feita com rede entomológica; os dipteros colocados, vivos, em gaiolas de filó e transportados ao laboratório, onde eram mortos em clorofórmio, identificados a nível de espécie e separados em duas sub-amostras: uma correspondia a *C. megacephala* e a outra *C. chloropyga*. As sub-amostras foram submetidas ao mesmo processo de exame.

De cada inseto, foram cortadas e desprezadas a cabeça, asas e patas, sendo o tórax e abdome macerados em gral estéril, ao qual foi adicionada água destilada estéril, na proporção de 5ml para cada 20 moscas (tórax e abdome). A suspensão, assim obtida, foi dividida em suas porções iguais, sendo uma para a análise bacteriológica, visando a pesquisa de *Salmonella* sp., *Shigella* sp. e *E. coli* enteropatogênica; outra foi destinada ao exame de enterovírus.

*Análise bacteriológica - a) Semeaduras iniciais* - A análise bacteriológica foi realizada através de dois processos: o primeiro, por semeadura direta, utilizando-se alça de níquel-cromo, em placas de ágar *Salmonella-Shigella* (ágar SS) e ágar verde brilhante (ágar VB), para a pesquisa de *Salmonella* e *Shigella*; e em placas de ágar eosina-azul de metíleno (EAM) de Levine, para o isolamento de *E. coli* enteropatogênica. O segundo processo consistia, após a realização da semeadura direta, em dividir o produto da maceração, reservado ao exame bacteriológico, em duas porções iguais, as quais eram vertidas em dois tubos: um continha 10ml de caldo tetratironato-verde-brilhante e o outro 10ml de caldo selenito-cistina, meios de enriquecimento seletivo, utilizados habitualmente no isolamento de bactérias do gênero *Salmonella*; b) *Isolamento e identificação de bactérias - E. coli enteropatogênica* - Após a semeadura direta do material, na superfície de ágar EAM, em placas, estas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Após incubação, 10 colônias, com características das de coliformes, foram semeadas em tubos de ágar tríplice açúcar e ferro (ágar TSI), procedendo-se a seguir, a incubação por 24 horas a 37°C. Após esse período, as culturas, revelando reações típicas das verificadas para a *E. coli*, foram submetidas às provas de IMViC, ou seja, produção de indol, do vermelho de metila, de Voges Proskauer e da utilização do citrato. As cepas, caracterizadas como *E. coli*, foram submetidas às provas de identificação sorológico, com semeadura em ágar simples inclinado e incubação a 37°C, por 24 horas. A seguir e a partir de cada tubo, preparava-se uma suspensão espessa, em salina a 0,85%, a qual era submetida à prova de soro-aglutinação, em lâminas para抗ígenos do grupo "OB", utilizando-se antíseros polivalentes 1, 2 e 3 anti *E. coli*, para identificação presuntiva. Se a prova de soro-aglutinação se revelasse positiva, a cepa era submetida às provas sorológicas, frente a antíseros específicos "O", para identificação final. As provas sorológicas, de aglutinação, frente a antíseros específicos "O", foram realizadas no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.

*Salmonella e Shigella* - As placas de ágar SS e ágar VB, semeadas diretamente com a suspensão de insetos, foram incubadas por 24 horas a 37°C. Após a incubação, a partir de cada uma das placas, eram isoladas até cinco colônias de bactérias não fermentadoras de lactose, as quais eram semeadas em tubos de ágar TSI e incubadas a 37°C durante 24 horas. Em seguida, as culturas, suspeitas como salmonelas ou shigelas, foram submetidas a testes bioquímicos e sorológicos confirmatórios, recomendados por Edwards & Ewing (4). Para salmonelas, eram realizadas as provas bioquímicas de produção de desaminase da fenilalanina, descarboxilase da lisina, urease, fermentação de dulcitol, utilização do malonato, produção de indol, de Voges Proskauer, do vermelho de metila, da utilização do citrato e da prova de motilidade.

As cepas com características bioquímicas de *Salmonella* foram submetidas a provas de soro-aglutinação, em lâminas, para抗ígenos somáticos "O" e flagelares "H". Foram usadas suspensões em solução salina a 0,85%, de culturas de 24 horas a 37°C, em ágar simples inclinado e soros polivalentes, sendo estes últimos preparados no Instituto Adolfo Lutz. As cepas, com provas de aglutinação positivas, eram consideradas como *Salmonella* sp., sendo a identificação final de espécie ou sorotipo realizada no Instituto Adolfo Lutz.

Para cepas suspeitas como *Shigella*, foram realizadas provas bioquímicas de fermentação da glicose, produção de urease e indol, utilização do citrato e motilidade. As cepas, com comportamento bioquímico de *Shigella* foram submetidas à prova de soro-aglutinação em lâmina, para抗ígenos somáticos, utilizando-se antíseros específicos polivalentes, preparados no Instituto Adolfo Lutz.

Para salmonelas, os tubos, contendo caldos de enriquecimento, inoculados, eram incubados a 37°C por 24 horas. Após a incubação, de cada tubo e utilizando-se alça de níquel-cromo, realizava-se a semeadura na superfície de placas de ágar VB e 55, as quais eram, a seguir, incubadas a 37°C por 24 horas. Em seguida, procedia-se ao isolamento e identificação das cepas, conforme a metodologia já mencionada para semeadura direta.

*Análise virológica - a) Preparo da amostra* - Ao material destinado à pesquisa de enterovírus, foram adicionadas penicilina (1.000U/ml), estreptomicina (1.000mg/ml) e fungizona (2mg/ml). Deixava-se a temperatura ambiente, por uma hora. Após incuba-

ção, o sobrenadante, obtido por decantação, era clarificado, através de duas ou três centrifugações a 10.000rpm, por 20 minutos; b) Isolamento de enterovírus - As suspensões, obtidas por centrifugação, foram inoculadas, em quadruplicata, em culturas de célula de linhagem GMK 9 (Green Monkey Kidney), em volmes de 0,1ml por tubo. Após 15 dias de acompanhamento das culturas, repetia-se a inoculação, através de três passagens sucessivas. Os enterovírus isolados foram identificados mediante provas de neutralização, utilizando-se misturas de soros hiperimunes (9).

## Resultados e Discussão

Foram visitadas 16 bancas de pescado, de feiras livres da cidade de São Paulo, tendo sido capturados exemplares de califorídeos pertencentes à espécie *C. megacephala*. Dipteros da espécie *C. chloropyga* foram obtidas apenas em 9 (56,25%) do total de bancas de pescado.

De uma amostra (11,11%), composta pelo tórax e abdome de moscas, pertencentes à sub-amostra correspondente à espécie *C. chloropyga*, foi isolada uma cepa de *Salmonella agona*.

Em 1962, Brygoo & col. (2) isolaram sorotipos de *Salmonella typhimurium*, *S. choleraesuis*, *S. typhi* e *S. give*, a partir de moscas pertencentes à espécie *C. chloropyga*, capturadas em diversos locais onde se manipulavam alimentos, na cidade de Tananarive, em Madagascar. Shimizu & col. (13), verificaram que, entre os califorídeos capturados em ilhas japonesas, *C. chloropyga* era a espécie que se apresentava como o hospedeiro mais frequente de microrganismos. Os mesmos autores isolaram várias espécies de bactérias, de *Salmonella* e *Shigella*, concluindo que a endemia de disenteria bacilar observada era mais consequência da transmissão, através de moscas, do que ocasionada pela manipulação de alimentos por indivíduos portadores de germes enteropatogênicos.

Apesar de não terem sido obtidos resultados bacteriológicos positivos, para sub-amostras compostas por moscas da espécie *C. megacephala*, estes dipteros também podem ser veiculadores de germes patogênicos. Segundo Sukhova (14), 8,0% dos califorídeos, pertencentes a esta espécie e estudados por How, na Mandchuria, foram considerados potencialmente capazes de veicular microrganismos, responsáveis por gastroenterites.

No presente estudo, a pesquisa de *E. coli* foi positiva para 13 (81,25%), das 16 amostras analisadas, porém nenhuma cepa mostrou-se, sorologicamente, pertencente ao grupo de *E. coli* enteropatogênica. Entretanto, Brygoo & col. (2) isolaram e identificaram 10 sorotipos diferentes de *E. coli* enteropatogênica, em moscas da espécie *C. chloropyga*.

No exame virológico de duas (12,50%) amostras, compostas pelo tórax e abdome de moscas pertencentes a sub-amostras da espécie *C. megacephala*, foram isolados enterovírus, sendo, em ambos os casos, poliovírus tipo III.

Vários autores têm descrito o isolamento de vírus, a partir de carcaças ou fezes de moscas. Em 1952, Ward (15) isolou vírus Polio e Coxsackie de moscas capturadas em mercados, em áreas epidêmicas. No Egito, constatou-se a ocorrência de relação entre as epidemias e a obtenção de vírus de moscas nessas áreas. No mesmo ano, Melnick & Penner (12) observaram que moscas, experimentalmente contaminadas com vírus Polio e Coxsackie eliminavam estes agentes através das fezes, por vários dias, não sendo constatada, no entanto, multiplicação dos vírus. A eliminação de vírus, através das fezes, assim como sua permanência, por vários dias, mesmo em fezes secas, constituem risco de disseminação de vírus patogênicos em grandes áreas, considerando-se a capacidade de dispersão dos dipteros.

Gudnadottir (6), estudando a contaminação de moscas, por poliovírus tipo I, observou a presença de vírus nas fezes e carcaças, pelo período de sete dias. Segundo o autor, os poliovírus podem sobreviver, em moscas, por até três meses, durante o período de hibernação.

O isolamento de vírus entéricos foi feito em dipteros do gênero *Chrysomyia*. Brygoo (2), em 1962, isolou poliovírus tipo I e III e vírus Coxsackie, a partir de exemplares da espécie *C. chloropyga*. Em 1963, Asahina & col. (1) isolaram poliovírus tipo II de *C. megacephala*. Recentemente Burdahandy & Simons (3) desenvolvendo

estudos bacteriológicos e virológicos em moscas da espécie *C. chloropyga*, capturadas em época de chuva em Tananarive (Madagascar), isolaram 22 cepas virais sendo 3 de poliovírus tipo III, 1 de adenovírus e 18 de enterovírus não identificados.

Na presente investigação, os resultados, com relação ao isolamento de vírus e bactérias, comprovam a assertiva de Guimarães & col. (7, 8), ou seja, a de que a introdução de moscas, pertencentes às espécies *C. megacephala* e *C. chloropyga*, demanda a realização de pesquisas em nosso país, com o objetivo de se verificar o significado epidemiológico dessas espécies de dipteros e sua implicação com problemas sanitários que poderão ser eventualmente criados, tanto ao homem como aos animais.

#### Agradecimentos

Ao Prof. Dr. José Henrique Guimarães, pela colaboração na identificação das moscas; ao Sr. João Teixeira da Cunha, pela participação na coleta das amostras; à técnica de laboratório Rosa Alexandrina de Oliveira, pela colaboração, durante a execução da parte experimental de bacteriologia.

#### Referências Bibliográficas

1. Asahina, S.; Osata, K.; Noguchi, Y.; Uchida, S. & Murata, M. - Detection of polioviruses from flies and cockroaches captured during 1961 epidemics in Kumamoto prefecture. Jan. Jour. Sanit. Zool., 14:28-31, 1963.
2. Brygoo, E.R.; Sureau, P. & LeNoc, P. - Virus et germes fécaux des mouches de l'agglomération urbaine de Tananarive. Bull. Soc. Path. Exot., 55:866-881, 1962.
3. Burdahandy, R. & Simond, J.P. - Virus et germes fécaux des mouches de Tananarive pendant la saison des pluies en 1972. Arch. Inst. Pasteur Madagascar, 41:73-86, 1972.
4. Edwards, P.R. & Ewing, W.H. - Identification of Enterobacteriaceae. 2.ed. Minneapolis, Burgess Publishing, p.72-187, 1962.
5. Greenberg, B. - Flies and disease. I - Ecology classification and biotic associations. New Jersey, Princeton University Press, 856p., 1971.
6. Guðnadóttir, M.G. - Studies of the fate of type 1 polioviruses in flies. J. Exptl. Med., 113:159-176, 1961.
7. Guimarães, J.H.; Prado, A.P. & Linhares, A.X. - Three newly introduced blowfly species in southern Brazil (Diptera, Calliphoridae). Rev. Bras. Ent., 22:53-60, 1978.
8. Guimarães, J.H.; Prado, A.P. & Buralli, G.M. - Dispersal and distribution of three newly introduced species of *Chrysomyia* Robineau-Desvoidy Brazil (Diptera, Calliphoridae). Rev. Bras. Ent., 23:245-255, 1979.
9. Hambling, M.H.; Davis, P.M. & Macrae, A.D. - The typing of enteroviruses in tissue culture by neutralization with composite antisorum pools. H. Hyg. (Camb.), 61:479-484, 1973.
10. Imbiriba, A.S.; Izutani, D.T.; Milhoretto, I.T. & Luz, E. - Introdução de *Chrysomyia chloropyga* (Wied 1818) na Região Neotropical. Arq. Biol. Technol., 20:35-39, 1977.
11. Linhares, A.X. - Sinantropia de dipteros muscoides de Campinas. Campinas, Instituto de Biologia Unicamp, 1979. (Tese de Mestrado).
12. Melnick, J. & Penner, L.R. - The survival of poliomyelitis and Coxsackie viruses following their ingestion by flies. J. Exptl. Med., 96:255-271, 1952.
13. Shimizu, F.; Hashimoto, M.; Taniguchi, H.; Cota, W.; Kakizawa, H.; Takada, R.; Kano, R.; Tange, H.; Kaneko, K.; Shinonaga, S. & Miyamoto, K. - Epidemiological studies on flyborne epidemics. I - Significant role of flies in relation to intestinal disorders: report. Jap. Jour. Sanit. Zool., 16:201-211, 1965.
14. Sukhova, M.N. - New data on the ecology and epidemiological significance of the blue meat flies *Calliphora uralensis* vill. and *Calliphora erythrocephala*. Meig. Entom. Obozrenie, 31:90-94, 1950.
15. Ward, R. - Poliomyelitis and Coxsackie viruses from Egyptian flies. Federation Proc., 11:486, 1952.

## THE EFFECTIVENESS OF VISUAL AIDS IN TEACHING A MICROBIOLOGY COURSE

Margarida de Mendonça Bellei

Deptº de Biologia Geral  
Universidade Federal de Viçosa  
36570 Viçosa MG, Brasil

Edna E.C.A. Gareau

Unidade de Apoio Educacional  
Universidade Federal de Viçosa

José Mário da Silveira Mezêncio

Deptº de Biologia Geral  
Universidade Federal de Viçosa

& Heloísa L. Bastos Chagas

Unidade de Apoio Educacional  
Universidade Federal de Viçosa

### Summary

In an attempt to improve achievement and reduce failures in a basic microbiology course at UFV, Viçosa, two teaching techniques, one purely conventional technique, the second supplemented with visual aids, were compared. Their effectiveness was investigated with 282 students enrolled in the course during the second semester 1980. Two instructors were involved in the experiment. Three experimental and two control classes attended the same one hour lecture for 15 weeks. During lecture presentation, slides and transparencies were shown to the experimental group to illustrate some aspects of the course programme. Three times during the course both groups were posttested for achievement. The G-36 intelligence test was applied to check for homogeneity in the beginning of the experiment. No significant differences ( $0.05$ ) were detected, on student scores on each posttest and posttest sum, between experimental and control groups for both instructors. Some factors are discussed as probably affecting the results.

### Resumo

#### *A eficiência de audiovisuais no ensino de microbiologia*

Uma das técnicas de ensino, puramente convencional e outra, suplementada com audiovisuais, foram comparadas, visando melhorar a aprendizagem e reduzir as repetências em um curso básico de microbiologia na UFV, Viçosa. O estudo foi efetuado no II semestre de 1980, envolvendo 282 estudantes, matrículados. Dois professores participaram no experimento. Três classes experimentais e duas de controle assistiram a aula teórica de uma hora, durante 15 semanas. Durante a apresentação

tação teórica, slides e transparências ilustraram alguns aspectos do programa, no caso do grupo experimental. Três pós-testes foram usados para avaliar os grupos. No início do experimento foi efetuado o teste de inteligência G-36, para avaliar a homogeneidade do grupo. Não foram observadas diferenças significativas (0,05), entre as médias das notas, obtidas pelos estudantes, em cada pós-teste e a soma das notas dos pós-testes, entre os grupos experimental e de controle, para ambos professores. Alguns fatores são discutidos como responsáveis pelos resultados obtidos.

## Introdução

General Microbiology - BIO 160, a basic course for several areas of instruction at the University of Viçosa, has shown a high percentage of failures each semester. These include a significant number of students failing the course at least twice.

These failures increase the class size to such a point that it is difficult to accommodate new students. Consequently the number of new students denied admission has increased each semester.

In an attempt to solve this problem, methods designed to increase the efficiency of teaching have been proposed. The intensive use of visual aids should have some practical advantages when compared to the traditional method which uses largely oral explanations. The traditional method is essentially abstract and must be considered impractical for presenting much of the course since a significant amount of illustration is necessary. Thus, using the traditional methods of illustration on blackboard during the lectures, a large amount of time may be consumed perhaps unnecessarily. Besides, the lack of recently translated bibliography containing appropriate illustrations makes it difficult for brazilian students, non-readers of foreign languages, to follow the course programme. It was thought that the introduction of visual aids to the classroom should help the students considerably.

This study has the objective of determining, through student achievement, the effectiveness of visual aids for teaching basic microbiology compared to that of the traditional method.

## Material and Methods

This experiment was conducted during the second semester 1980.

*Population* - The population for this study consisted of 282 students enrolled in the General Microbiology Course - BIO 160 at University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

These students were specialising in different fields at the University, specifically: Agronomy (107 students), Forestry (56), Animal Sciences (20), Home Economics (29), Veterinary (27), Food Technology (20), Dairy Sciences (14), Biology (4), Nutrition (3), Cooperativism (1) and Civil Engineering (1). They were distributed over five different classes by a computerized system which considered only the availability of classroom hours in terms of the students global course schedule.

Each class included students from most areas. The majority of the students (80%) had already failed the course.

The students came from a rural economic background.

*Sample* - This study included all the population.

*Instructional procedures* - Two instructional techniques were tested: a conventional and a visual aid based technique (or a conventional complemented with visual materials). The conventional technique used basically oral expositions often complemented by blackboard explanations and schemes. The visual aid based technique

used transparencies and slides as an additional help to the conventional technique. Two instructors participated in the experiment following the class division: instructor A with classes 1 and 3 and instructor B with classes 2, 4 and 5.

Control classes were randomly selected as classes 2 and 3 and experimental classes as class 1, class 4 and class 5.

Each class of a given instructor met together for 2 hours of lecture per week during 15 weeks. The lectures included presentation of slides and transparencies to illustrate the explanation for the experimental group only.

The course included three sections involving the knowledge of facts, concepts and principles of the content referred on Table 1.

The course content was the same for both groups. Obviously, considering the diversity of subjects presented, some sections fitted better with visual materials than others. As for the distribution of the visual aids throughout the semester, Table 1 presents the number of slides and transparencies shown after the presentation of each section of the course, and material evaluated in the three posttests (Table 1).

**Table 1** - Number of transparencies and slides used throughout the semester and related to each section of the course.

**Symbols:** a = Section 1 included the following content: introduction of the microbiology; bacterial morphology and ultrastructure; b = Section 2 included the following content: bacterial reproduction and growth; bacterial physiology, genetics and taxonomy; basic mycology; c = Section 3 included the following content: basic virology; control of microorganisms; physical and chemical factors affecting growth and survival

| Type of visual aids | Sections of course programme |    |    |
|---------------------|------------------------------|----|----|
|                     | 1a                           | 2b | 3c |
| Slides              | 11                           | 34 | 16 |
| Transparencies      | 7                            | 26 | 0  |

*The visual aid materials* - A set of 51,35mm - 2,5 x 3,5cm slides were photographed from textbooks and journals with a Leica M3 camera in black and white kodak film high contrast 5069.

In addition, 10 slides of the same type were prepared from specimens used in our experiments of soil microbiology.

Thirty-three transparencies presenting tables, graphs, charts and taxonomic keys were made by specialized draughtsmen at the UAE at UFV.

These materials were not evaluated prior to the experiment.

*The instruments of evaluation* - The whole population was tested for homogeneity by an intelligence test (G-36) at the beginning of the experiment. G-36 is a nonverbal intelligence test constructed by E.R. Boccalandro when he was a psychologist responsible for the selection of personnel for admittance to a Metallurgic Company in Brazil. This test involves 41 graphic problems and multiple choice questions. The construction of the test is discussed in the Manual de Aplicação by Boccalandro (4). During the semester, control and experimental groups were posttested by a set of three tests, identical for both groups, at the end of each course section. Posttests, constructed by instructors A and B, were criterion-reference tests and included self-explanatory questions. They contained a variable number of questions: 20, 20 and 13 respectively for the 1st, 2nd and 3rd posttests. The tests examined material related to the visual aids used for the experimental group according to the following proportions: 7/20, 12/20 and 3/13 for the 1st, 2nd and 3rd posttests.

Questions were multiple-choice and dissertative and directed to measure knowledge, comprehension, application and analysis. The content validity of the posttests was determined by a panel of three other professors in Microbiology section, each of whom had taught the course for at least 10 years. Internal validation of the posttests did not precede their application.

Posttests were applied simultaneously for all groups and were limited to 90 minutes. Instructors A, B and other professors from the department participated in

the application of all tests. They were applied outwith schedule hours of the course and at the end of the presentation of each section of the programme.

*Statistical treatment of the data -* The design selected for this investigation was the posttest-only design with nonequivalent groups (8). The treatments were for instructor B: a) Experimental-class 4 (visual aided); b) Experimental-class 5 (visual aided); c) Control-class 2 (conventional teaching technique). For instructor A: a) Experimental-class 1 (visual aided); b) Control-class 3 (conventional teaching technique).

Treatment of the data for each posttest, posttest sum and G-36 followed a t-test procedure.

Also, an analysis of covariance was applied to the data considering G-36 as covariate.

The  $\alpha$ -value was defined as 0.05 prior to the treatment.

Table 2 - Mean, standard deviation and t-test for instructors A and B.

**Symbols:** Maximum points of 1st posttest = 15.0, 2nd posttest = 20.0, 3rd posttest = 15.0; 1st posttest = axb  $t=0.23$ , cxd  $t=1.15$ , cxc  $t=1.23$ ; 2nd posttest = axb  $t=0.23$ , cxd  $t=1.45$ , cxc  $t=0.82$ ; 3rd posttest = axb  $t=0.72$ , cxd  $t=0.58$ , cxc  $t=0.66$ ; SUM posttest = axb  $t=0.11$ , cxd  $t=0.62$ , cxc  $t=0.07$

| In-<br>struc-<br>tor | Class   | Posttests |      |      |     |       |      |     |       |      |     |       |      |
|----------------------|---------|-----------|------|------|-----|-------|------|-----|-------|------|-----|-------|------|
|                      |         | 1st       |      |      | 2nd |       |      | 3rd |       |      | Sum |       |      |
|                      |         | N         | Mean | SD   | N   | Mean  | SD   | N   | Mean  | SD   | N   | Mean  | SD   |
| A                    | C-3 (a) | 55        | 9.86 | 1.77 | 55  | 10.82 | 2.72 | 51  | 10.20 | 1.71 | 51  | 31.25 | 4.68 |
|                      | E-1 (b) | 53        | 9.95 | 2.04 | 53  | 10.68 | 2.96 | 48  | 9.89  | 2.54 | 48  | 21.12 | 6.19 |
| B                    | C-2 (c) | 56        | 9.23 | 2.00 | 56  | 11.04 | 2.96 | 52  | 10.22 | 1.86 | 52  | 30.76 | 5.12 |
|                      | E-4 (d) | 55        | 9.63 | 1.63 | 55  | 10.23 | 2.95 | 52  | 10.01 | 1.80 | 52  | 30.15 | 4.86 |
|                      | E-5 (e) | 52        | 9.70 | 1.97 | 52  | 10.56 | 3.07 | 48  | 10.48 | 2.13 | 48  | 33.21 | 1.95 |

## Results

The experimental and control classes will be designated as follows: Experimental class 4 = E-4; Experimental class 5 = E-5; Experimental class 1 = E-1; Control class 2 = C-2; Control class 3 = C-3.

The mean scores, standard deviation and t-test of differences for the posttests and posttests sum are presented in Table 2. There were no significant differences in posttests scores and posttests sum between the two treatments given by both instructors.

Also, there were no significant differences on G-36 scores between groups for both instructors (Table 3).

The application of covariance analysis using G-36 scores as the covariate revealed no significant differences between the two methods as far as student achievement was concerned (Table 4).

Apart from statistical considerations, instructor A had the highest score sum in control class 3 and instructor B had the highest score sum in the experimental class 5. Considering the 2nd posttest only, the most important evaluation for the visual aids, both control classes for instructor A and B obtained the highest scores. These control classes also had the highest values in the intelligence test (G-36).

## Discussion

Our results do not reveal any statistically significant differences between the conventional and the experimental teaching techniques. Consequently there are no clear-cut results supporting the use of slides and transparencies in the General Microbiology Course - BIO 160 at UFV, Viçosa, Brazil with the purpose of increasing student achievement. However, a nonsignificant slight advantage was noticed in favour of the conventional technique when considering exclusively the 2nd posttest, the most representative test for testing the visual material because of the number of slides and transparencies used.

Bibliography on research media is bulky but mostly dedicated to the mechanics and application of several types of educational media. It is a general assumption that the use of visual aids stimulates and enhances both teaching and learning although some researchers have questioned this proposal (3, 9, 17). Relatively few publications, however, report experimental comparisons between teaching techniques when visual aids are involved. Summaries of these, show a very high number of results revealing statistically nonsignificant differences.

According to the excellent review paper by Townsend (21) on the audiovisual revolution and its impact on the nursing profession in the United Kingdom "no significant difference" (NSD) findings are commonplace throughout seventy years of media research and have been responsible for the lack of expansion on the use of educational media. Also, he stresses that researchers inability to overcome this obstacle have extremely restricted the progress on media research.

Table 4 - Analysis of covariance for instructors A and B

| Source                             | Instructor B  |          |       |               |          |        | Instructor A  |          |       |
|------------------------------------|---------------|----------|-------|---------------|----------|--------|---------------|----------|-------|
|                                    | Classes 2 x 4 |          |       | Classes 3 x 5 |          |        | Classes 3 x 1 |          |       |
|                                    | df            | MS       | F     | df            | MS       | F      | df            | MS       | F     |
| Covariate intelligence test (G-36) | 1             | 2446.316 | 0.982 | 1             | 34.920   | 0.018  | 1             | 4.907    | 0.002 |
| Instruction                        | 1             | 1369.871 | 0.550 | 1             | 26.888   | 0.0009 | 1             | 40.825   | 0.014 |
| Error                              | 101           | 2491.964 | -     | 97            | 3035.100 | -      | 96            | 3022.054 | -     |

Rodwell (18) emphasizes the implications of NSD results and refers to the confusing consequences resulting from the nonconsistent pattern of the results obtained. Considering ten relevant studies, in the area of natural sciences, which compare teaching techniques involving visual aids, seven of them found no significant differences: (1) Brechbill (5) and Strathers (20) compared the microprojector with the microscope; (2) Novak (16) studied the use of labelled photomicrographs when supplementing outline drawings vs. outline drawings only in teaching college general botany; (3) Wessel & col. (22) compared a self-learning program with audio-video and conventional classroom instruction; (4) Wittich & col. (23) used the Harvey white physics film series in comparison with conventional techniques; (5) Earl (10) studied the effectiveness of programmed visual materials (microscope slides and 35mm color photomicrographs) and non-programmed visual materials in the laboratory sections of a college biology course; (6) Anderson & col. (2) employed a series of films in teaching physics in experimental classes in comparison with control classes; (7) McCowen (12) studied the use of films and slides in teaching general science. Three studies, using films, favored conventional techniques (3, 14, 19). Specifically in the area of microbiology Noble

Table 3 - Mean, standard deviation and t-test of G-36 for both instructors

| Instructor | Class | N  | Mean  | SD    | t-test |
|------------|-------|----|-------|-------|--------|
| A          | C-3   | 55 | 37.05 | 26.17 | 1.14   |
|            | E-1   | 53 | 31.96 | 19.74 |        |
| B          | C-2   | 56 | 40.80 | 29.39 | 1.66   |
|            | E-4   | 55 | 32.67 | 21.63 |        |
|            | E-5   | 52 | 33.21 | 19.56 | 1.57   |

& col. (15) made a comparison of the efficacy of slide/tape and cine loop preservations in teaching a manipulative activity to a group of undergraduate students in the U.K. and found no significant differences between the two teaching techniques. On the other hand, Brown & col. (7), conducted an experiment in an introductory course in microbiology using 35mm slides as a supplementary aid. Their results demonstrated that the use of this aid gave significantly superior (0.01) results, as far as informational gains, when compared with the method using no supplementary visual aids. Obviously, it seems difficult to establish any generalizations for the teaching of microbiology since these experiments differ as to the methodological approach and student population.

Suggestions that NSD phenomenon are the result of an artefact of the design used are presented in the literature (6, 11). With reference to our experiment some aspects arising from these suggestions may have been responsible for the results obtained and should demand some modifications in future work. Our experimental set-up followed a posttest only design with nonequivalent groups as commonly used by other researchers. However as noted by Cook & Campbell (8), two experts in the subject, a pretest-posttest design would be preferable, in this particular situation, since our school groups are nonrandomic. Consequently, an initial pretest would allow for checking for similarities among groups as far as the instrument used. Instead, an intelligence test (G-36) was applied initially to the groups and since it uses different measures than those of the posttest possible differences among groups were not detected. Here we differed from Brown & col. (7), since they employed three different instruments for the testing of achievement in basic microbiology, understanding of laboratory technique and understanding science and scientists. These three instruments were used as pre - and posttests at the beginning and final meetings, respectively.

We must also mention the fact that the sensibility of the instruments used may have been extremely low. Considering the posttests globally only 42% of the questions evaluated the utilization of visual aids. However, if we refer separately to the 2nd posttest which 60% of the questions related to presentations with visual aids still no significant differences were noticed. It may be proposed that if the achievement of the students exclusively on those questions involved with visual aid was considered, the highest differences would be observed. In these circumstances, however, we would be testing the effectiveness of visual aids on the achievement in specific subjects, those which fitted better with visual aids, and not on global achievement in the course and its consequences on the reduction of failures.

As for the construction of our instruments we must improve their validation in future studies, since the internal reliability of the posttests was not determined.

Another interesting and unexpected finding at the end of our experiment may also have affected our results. We suggest further studies to elucidate the origin of the negative predisposition of our students towards the visual aid materials. As McKeachie (13) says "presenting pictures is more effective than presenting words as stimuli in rote association tasks such as learning a foreign language". If the study of basic biology is frequently compared to the study of a foreign language, because of unfamiliar terminology (10), then a positive tendency from the students towards a more effective teaching technique should be noticed. In the specific case of the use of educational television summaries of experiments show that students accept this media favourably especially after they have experienced it. However, some researchers also stress that resource based learning is more suitable for some individual students than others and a high number (20-30%) within a population positively favour either visual or verbal presentations (15). Although our opinion survey could not determine the tendency of the total population (a sample was used for the survey) and the reasons involved some students referred to their previous experiences with visual aids as tedious and negative. The survey was superficial, however, and could not detect whether the students found their experience in the study of microbiology negative. If the reasons for their negative predisposition towards visual aids rely on negative preuniversity experiences there is a need to educate instructors to employ adequate visual aids in grade school.

Since no data on media research are available with the student population at UFV, Viçosa, it seems important, before the implementation of visual aids, to do further

studies for detecting the real reasons for the negative attitude towards visual materials.

The possibility of a nonadequate presentation of visual aids in our experiment, was eliminated since two different instructor with different approaches and attitudes were involved in the experiment.

Considering the number of visual aids used we must recognize a great difference as far as the experiment of Brown & col. (7) in a similar course during a comparable teaching period. Their experiment included during 2-quarters, 500 color slides, 200 illustrations obtained from scientific journals and textbooks and a nonspecified number of photomicrographs taken with light and electronic microscopes. The reduced number of visual aids (94) presented during our experiment may have had an insignificant impact as an alternative technique in the course. The reasons for presenting such a number, however, is based upon the conclusions of some experiments favoring conventional methods in which students commented on the excessive number of visual aids used (7).

The construction of the visual aids seemed adequate since most slides and transparencies followed the models of photomicrographs and schemes presented in basic textbooks in Microbiology. To confirm this we should perhaps have a panel of professors and students judging the material as in Brown & col. approach.

"The expectation of solving our educational problems with media is illusive before the effective techniques and criteria for its use are defined" (21). Presently, it is important to create an awarness of the consequences of the substitution of a traditionally orientated teaching attitude by a less personally orientated method such as the visual aided one. The decision to use an audiovisual medium has very wide implications and as Townsend (21) says "the strategy based on the misconception to use what one has (however badly) than to leave it gathering dust on the shelf must be abandoned".

It seems dangerous to establish a generalized commitment to visual aids in our school before determining the real usefulness of this type of technology with our students. If several researchers have questioned the assumption of improving learning with visual aids, and if NSD findings were once more obtained with our UFV students, we should pursue our research not taking the use of this media for granted.

Although our experiment followed a methodological approach which is easily criticized, since we tried to establish our hypothesis in the absence of philosophical or theoretical framework, some advantages arose even from this preliminary experience. Some characteristics of our student population were detected, group planning and working on educational problems was stimulated and future experiments for the clarification of some problems on the teaching-learning activities were planned.

#### References

1. Anderson, K.E. & Montgomery, F.S. - An evaluation of the introductory physics course on film. *Sci. Educ.*, 43:386-394, 1959.
2. Anderson, K.E.; Montgomery, F.S. & Moore, S.F. - An evaluation of the introductory chemistry course on film. *Sci. Educ.*, 45:254-269, 1961.
3. Anderson, J.A. - Equivalence of statements presented in various media. *Audio-Vis. Commun. Rev.*, 16:25-32, 1968.
4. Boccalandro, E.R. - Teste não verbal de inteligência: manual de aplicação. São Paulo, Ed. Psicopedagógica Votor, 12p., 1966.
5. Brechbill, E. - A study of a microprojector as a teaching aid. *Sci. Educ.*, 24:215-218, 1940.
6. Briggs, L.J.; Campeau, P.L.; Gagné, R.M. & May, M.A. - Instructional media: a procedure for the design of multi-media instruction: a critical review of research and suggestions for future research. Pittsburgh, American Institute for Research, 176p., 1967.
7. Brown, D.R.; Michaels, G.E. & Bledsoe, J.C: - An experiment in the use of film slides in an introductory course in microbiology. *J. Res. Sci. Teach.*, 3:333-344, 1965.

8. Cook, T.D. & Campbell, D.T. - Quasi-experimentation design & analysis issues for field settings. Chicago, Rand McNally College Publishing Company, 405p., 1979.
9. Dieuzide, H. - Educational technology and the development of education. *Brit. J. of Educ. Technol.*, 2:168-188, 1971.
10. Eark, P.F. - A study of the relative effectiveness of programmed visual materials and non-programmed visual materials in the laboratory sections of a college general biology course. New York University, 219p., 1972. (Thesis).
11. Jamison, D.; Suppes, P. & Wells, S. - Effectiveness of alternative instructional media: a survey. *Rev. Educ. Res.*, 44:1-69, 1974.
12. McCowen, M.C. - A controlled experiment in visual education in general science. *Educ. Scr.*, 19:143-146, 1940.
13. McKeachie, W.J. - Research on teaching at the college and University level. In: - Gage, N.L., eds. - *Handbook of research on teaching*. Chicago, Rand McNally, p.1118-1172, 1963.
14. Noall, M.F. & Winget, L. - Staff utilization studies help with education. B - The physics film project. *Bulletin of the National Association of Secondary Schools Principals*, 43:183-195, 1959.
15. Noble, W.C.; Holt, G. & Stacey, L.M. - Comparison of the efficacy of slide/tape and cineloop as teaching aids for a microbiological technique. *J. Biol. Educ.*, 13:204-206, 1979.
16. Novak, J.D. - Use of labelled photomicrographs in teaching college general botany. *Sci. Educ.*, 45:119-122, 1961.
17. Olson, D.R. - Introduction to media and symbols: the forms of expression, communication and education. *Yearbook of the National Society*, 90p., 1974.
18. Rodwell, S. - Comparative media research. *Vis. Educ.*, 4:19-21, 1976.
19. Sadnavitch, J.M.; Popham, W.J. & Black, W.A. - Retention value of filmed science courses. *Sci. Educ.*, 46:22-27, 1962.
20. Strathers, A. - The microprojector compared with the individual microscope in teaching high school biology. *Sci. Educ.*, 17:59-63, 1933.
21. Townsend, I. - The audio-visual revolution: do we really need it? *J. Adv. Nurs.*, 41:181-192, 1979.
22. Wessel, K.; Larson, D.; Evans, A. & Powers, E. - The impact of an audio-visual, self-learning program on beginning students in agricultural economics. *Nacta J.*, 22:22-26, 1978.
23. Wittich, W.A.; Pella, M. & Wedemeyer, C.A. - The Wisconsin evaluation project. *Audio-Vis. Commun. Rev.*, 8:156, 1960.

## INFORMAÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA SBM

Gerhardt, P. - The International Union of Microbiological Societies (IUMS): What is it? What does it do? Michigan State University, East Lansing, USA, May 19, 1984.

Microbiological scientists around the world often have only a vague notion about the nature of the international organization with which their national microbiological societies are affiliated. This article provides answers to questions that are usually raised about IUMS.

**What is IUMS?** - IUMS, the International Union of Microbiological Societies, is a worldwide federation of 80 national societies or other types of organizations in 57 countries, together with a number of international societies, all having a common interest in microbiological sciences and representing about 75,000 individual scientists. IUMS is non-governmental, non-political, non-discriminatory, and not-for-profit.

Within IUMS there are three Divisions representing the disciplines of bacteriology, mycology, and virology. Seven Committees, eight Commissions and two Federations (COMCOFs) represent special fields within or between the Divisions.

Among the COMCOFs are a number of international societies such as the World Federation of Culture Collections and the International Society for Human and Animal Mycology.

In 1982 IUMS became one of 20 scientific unions affiliated with the International Council of Scientific Unions (ICSU). ICSU membership is vitally important to microbiological sciences internationally because it recognizes the status of microbiology equally with other major disciplines, brings microbiology into the primary scientific council of the world, and enables microbiology to play a more active role in the national academies which make up the national membership of ICSU.

IUMS also cooperates with the United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization (UNESCO) and its Microbiological Resource Centers in assisting the teaching, research and application of microbiology in developing nations.

Programs that involve medical microbiology are operated jointly with the World Health Organization (WHO). IUMS is affiliated also with the Council of International Organizations for Medical Sciences (CIOMS).

IUMS in 1980 modified its name from the International Association of Microbiological Societies (IAMS) and withdrew as a Division within the International Union of Biological Sciences, with which it had been affiliated since 1967. The origins of IAMS trace back to the International Society of Microbiology which was founded in 1927.

Thus, IUMS has become a large, widely affiliated and actively functioning international scientific organization. Its goal is to represent microbiological sciences internationally with the broadest possible membership and to advance microbiological sciences globally with the best possible services for the benefit of mankind.

**What is ICSU? What does it do?** - ICSU is a worldwide scientific organization composed of 20 international scientific union members, 65 national academy members, and 21 scientific and national associates. Established in 1931, ICSU facilitates scientists throughout the world joining in activities of common interest without regard to race, religion, political philosophy, ethnic origin, citizenship, sex or language.

The principal goal of ICSU is to encourage global scientific activity for the benefit of mankind. ICSU initiates, designs and coordinates worldwide scientific research, and the development of methodology and nomenclature standards. Members of the ICSU family annually organize hundreds of scientific congresses, conferences, symposia, and meetings in many parts of the world. General Assemblies and other administrative meetings are convened to decide ICSU policies and programs.

ICSU produces a wide range of publications including scientific journals, handbooks, proceedings of meetings, and newsletters. ICSU now has its own publishing house, the ICSU Press.

Committees of Commissions of ICSU organize programs in transdisciplinary fields that transcend the aegis of a single Union. Problems of the Environment, Genetic Experimentation, and Teaching of Science exemplify such programs.

ICSU maintains close relations and works in cooperation with a number of other international organizations, UNESCO in particular.

To facilitate union activities, IUMS has a permanent secretariat which is located at 51 Bd. Montmorency, Paris 75016, France (Telephone 33-1-525 0329; Telex ICSU 630553F).

**What does IUMS do?** - International Congresses of Microbiology have been organized regularly by IUMS since the first one in Paris, France, in 1930. The fourteenth will be held in Manchester, U.K., in September of 1986.

Each Division also regularly organizes Congresses, those of Bacteriology and Mycology usually in conjunction with the general ones. The Virology Division convenes a separate International Congress of Virology, the sixth to be held at Sendai, Japan, in September of 1984.

Several other IUMS groups also regularly convene major meetings. For example, the Fifth International Congress of Culture Collections will be held at Bangkok, Thailand, in 1984. The Ninth Congress of the International Society for Human and Animal Mycology will be held at Atlanta, USA, in 1985. The Fourth International Microbial Ecology Symposium will be held at Ljubljana, Yugoslavia, in 1986. Many other international meetings are nominally sponsored by IUMS.

IUMS has two established journals. The International Journal of Systematic Bacteriology is the official organ of the International Committee on Systematic Bacteriology. Intervirology is the official organ of the Division of Virology.

Two new journals are starting in 1984. Microbiological Sciences succeeds a Newsletter published regularly since 1976. A new International Journal of Food Microbiology is the official organ of the International Committee for Food Microbiology and Hygiene.

A major activity is conducted by IUMS committees in the classification and nomenclature of bacteria, fungi and viruses. A main undertaking of the International Committee for Systematic Bacteriology is the International Code of Bacterial Nomenclature and the Approved Lists of Bacterial Names. A parallel task is undertaken by the International Committee on the Taxonomy of Viruses in the preparation of regular Reports on the Classification and Nomenclature of Viruses. Similar efforts in systematics have been undertaken within the Mycology Division.

IUMS collaborates with other ICSU Unions, UNESCO, WHO and CIOMS in global programs such as oceanic and space research, science and technology in developing countries, genetic experimentation, and application of science to agriculture and human health.

**How is IUMS governed?** - The Statutes of IUMS consist of a Constitution containing the principles of governance and Bylaws containing the guidelines for governance.

A General Assembly responsible for overseeing the governance of IUMS meets quadrennially, and consists of representatives from the Member Societies, Divisions and COMCOFs together with members of an Executive Board.

The Executive Board directs affairs of the Union in compliance with the Statutes and decisions of the General Assembly. The Executive Board meets annually and consists of six officers, three Divisional chairmen, and three members-at-large.

A Steering Committee consists of the President, Secretary General and Treasurer. It conducts affairs of the Union between meetings of the Executive Board and initiates recommendations concerning Union activities.

The major governing bodies are constituted primarily on the basis of merit but also reasonably representative with regard to scientific discipline, geographical distribution, and other considerations of the Union constituency.

The governance of IUMS is currently under study. The intent is to modify the organizational structure so that IUMS becomes better recognized as a federation of international member societies as well as of national ones, with each society

independent in its internal affairs yet united for the common good in external affairs. A further intent is to provide a level of associate as well as full IUMS membership, the two levels distinguished by governance authority coupled with financial responsibility.

How is IUMS financed? - Annual dues from the Member Societies are based on the number of resident microbiologist in their country. The total dues are not less than US\$ 100 and not greater than 25% of the sum of the dues payable by all. The annual dues payable each year are based on the adjusted value for the US dollar according to the World Bank, with a base of US\$ 0.75 per resident microbiologist in 1983.

Congress registration fees represent another source of income. At each international congress, the sum of US\$ 10 (based on the adjusted value of the US dollar) is included in the registration fee for all participants.

Two types of grants are awarded to IUMS by ICSU: a basic allocation equal to the sum of IUMS dues to ICSU plus a fixed amount, and special grants based on the merit of specific project proposals.

Grants from UNESCO are awarded in response to specific project proposals, especially those which relate to their major microbiology programs for developing nations.

Other sources represent growing opportunities of financial support for IUMS. Supporting memberships by commercial and philanthropic organizations are being actively sought, and new publications should provide additional income.

A major source of support for IUMS activities also comes indirectly from the volunteer service of individuals and the subsidies of their institutions.

Income collectively is used to fund various Union activities. Substantial IUMS subventions and grants are provided for activities of the Divisions and COMCOFs. Loans are available for advance costs of congresses, and small grants may be awarded to assist other meetings. Funding is necessary of operating the office of the Secretary General. Other operational costs include informational publications and meetings of governing bodies.

Greater amounts will be used to support scientific activities as the relatively fixed costs of administration are exceeded more and more by growing income.

Where is Further information? - The IUMS Secretariat is the best source for more information: Stuart W. Glover (Secretary General); Department of Genetics, Ridley Building; The University, Claremont Place; Newcastle Upon Tyne, NE1 7RU, United Kingdom; Telephone: 44-632-328511 ext 3897; Telex: UNIENG 53654.

Members of the IUMS Executive Board also are good sources for more information: Philip Gerhardt (USA) President; H.P.R. Seelinger (FDR) Past-President; Kei Arima (Japan) Vice-President; W. Kurylowicz (Poland) Vice-President; Stuart W. Glover (UK) Secretary General; Miriam C. Horzinek (Netherlands) Treasurer; Rita R. Colwell (USA) Bacteriology Division Chairman; Norman L. Goodman (USA) Mycology Division Chairman; Frederick A. Murphy (USA) Virology Division Chairman; Frederick Brown (UK) Member-at-large; P.R. Mahadevan (India) Member-at-large; R.G.E. Murray (Canada) Member-at-large.

Copies of a pamphlet containing most of the above information, the Statutes, and a Directory can be obtained from the Secretary General or President.

Continuing news about microbiological sciences worldwide as well as IUMS can be obtained by subscribing to the new IUMS journal, Microbiological Sciences.

### **Informações adicionais**

A representação do Brasil, na IUMS, é feita pela Sociedade Brasileira de Microbiologia. De acordo com os estatutos da União, cada país deve ter seu Comitê Nacional, ao qual são submetidos os diferentes assuntos, relacionados à participação da entidade naquela organização internacional.

Idealmente, a Sociedade Brasileira de Microbiologia deveria indicar representantes brasileiros para a composição dos Comitês (Microbiologia Econômica e Aplicada; Proteínas Unicelulares; Microbiologia de Alimentos e Higiene; Documentação Microbiológica e Imunológica; Ecologia Microbiana; Sistemática Bacteriana, este último

com 24 subcomitês; Taxonomia de Vírus, com seis subcomitês; e Comitê Interdisciplinar de Microbiologia Médica); Comissões (Associação Internacional de Padronização Biológica; Sociedade Internacional para Micologia Humana e Animal; Comissão International para Genética Microbiana; Comissão International sobre Especificação Microbiológica para alimentos; Comissão International sobre Genética de Fungos; Comissão International sobre Micotoxicologia; Comissão International sobre leveduras e Microrganismos Leveduriformes).

A ativa participação de brasileiros, nas distintas unidades da IUMS é desejável. O principal fator limitante, contudo, prende-se à dificuldade financeira em garantir a presença de brasileiros nos Congressos e outros eventos patrocinados pela IUMS e suas subunidades.

João Salvador Furtado

Sociedade Brasileira de Microbiologia  
Caixa Postal 4005  
01000 São Paulo SP

**Arcos, J.C.; Argus, M.F. & Woo, Y.I., eds. - Environmental carcinogenesis reviews. J. Environ. Sci. Health, C1 (1) iii. New York, Marcell Dekker, 135p., 1983. U\$ 219.50 (assinatura anual).**

Uma nova publicação de Marcell Dekker Inc., visando a rápida disseminação de informações sobre um assunto de extrema importância, a nível multidisciplinar, que é a carcinogênese relacionada à contaminação ambiental.

Esta publicação é a parte C do Journal of Environmental Science and Health, onde estão englobados: Parte A: Environmental science and engineering (já no vol. 18(6 n°s); Parte B: Pesticides, food contamination and agricultural wastes (também vol. 18(6 n°s) e a Parte C: Environmental carcinogenesis reviews vol. 1 (em 2 números).

A finalidade do novo jornal é a publicação de revisões críticas, integradas e multidisciplinares sobre compostos químicos relacionados à carcinogênese, relação entre estrutura e atividade carcinogênica, sinergismo e antagonismo, metabolismo, mecanismo de ação, levantamento dos riscos ambientais e ocupacionais, estudos epidemiológicos, correlação entre mutagênese e carcinogênese, etc.

Os artigos serão encorajados a especialista, porém os editores encorajam sugestões sobre temário e autores.

Contribuições por livre iniciativa serão aceitas desde que o tema e resumo sejam submetidos à aprovação prévia dos editores.

O volume C nº 1 contém os seguintes artigos:

- Hecht, S.S. & col. - Tobacco specific nitrosamines: carcinogenicity, metabolism and possible role in human cancer
- Hemmin, K. & col. - An estimation of the exposure of the population in Finland to suspected chemical carcinogens
- Woo, Y.T. - Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity of carbamates, thiocarbamates and related compounds: an overview of structure - activity, relationships and environmental concerns.

As referências bibliográficas, embora em grande número e diversidade, concentram-se principalmente em 7 publicações: Cancer Res., J. Natl. Cancer Inst., Carcinogenesis, Cancer Lett., Mutat. Res. Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. e na coletânea do IARC (International Agency for Research on Cancer. Lyon, France): IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans (série de volumes publicados pela OMS - Suíça).

A apresentação é modesta obedecendo a situação atual de contenção de despesas e a impressão é direta, visando acelerar a disseminação da informação. Dos três artigos, um é de interesse específico: levantamento de uma situação na Finlândia, apresenta muitas generalidades e poucas conclusões e os outros dois assuntos têm sido intensamente abordados por outros autores, sendo que não acrescentam muitas novidades. É apenas mais um dos tantos periódicos publicados atualmente.

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

Cérès: Revue de la FAO sur l'agriculture et le développement, 85(1):1-50, 1982.  
US\$ 15.00.

O número de Cérès, corresponde ao primeiro bimestre de 1982 contém 80% de artigos dedicados a aspectos econômicos de agricultura. No restante, há dois artigos em biotecnologia: Fixação de Azoto e Conversão de Biomassa.

Os países em desenvolvimento tem se interessado pelas possibilidades que oferecem pequenas quantidades de adubos químicos. Uma alternativa promissora é a fixação biológica do azoto (FBA), que consiste na inoculação em leguminosas de cepas específicas de microrganismos simbiontes, visando a otimização da fixação natural do azoto presente no solo. A técnica mostra-se interessante devido a sua simplicidade e baixo custo em investimentos e transportes. A FAO realiza projeto para determinação das melhores condições de aplicação dos microrganismos, alertando sobre a necessidade de melhores conhecimentos das cepas apropriadas, sob o ponto de vista prático.

Por conversão de biomassa em escala industrial, as Filipinas pretendem economizar cerca de 500 milhões de dólares anuais, utilizando dejetos agrícolas, como casca de coco, palha de milho, casca de arroz e outras matérias celulósicas. Em 1987, 47 destilarias deverão substituir 30% dos barris de petróleo importados, proporcionando a criação de 340.000 empregos. O texto discute dois métodos alternativos, um desenvolvimento pelo próprio país, com auxílio da UNIDO; e outro pelo Conselho Nacional de Pesquisas do Canadá.

Em artigo sobre a transferência de tecnologia na região do Caribe, Frank Long, conselheiro do governo da Guiana, para política tecnológica, caracteriza a economia da região e apresenta medidas para o controle desta transferência e promoção da capacidade tecnológica indígena: a) estimular P&D em nível regional com racionalização, evitando duplicações; b) intensificar os contatos entre os usuários de tecnologia visando o conhecimento das técnicas existentes ou em vias de elaboração; c) promoção de projetos regionais que empreguem elementos técnicos da região; d) criação de um programa de estímulo visando favorecer a introdução da tecnologia regional no desenvolvimento industrial e agrícola.

Os demais artigos versam sobre inflação, crescimento e balança de pagamentos exteriores nos países em desenvolvimento nos anos 70, causas de perdas de alimento ocorridas entre a colheita e comercialização, reservas alimentares e comércio ilegal de espécies selvagens.

Roberto Silva Waack  
Embrabio - Empresa Brasileira de Biotecnologia  
R. Marquês de Itu, 58/69  
01223 São Paulo SP

#### IV Encontro de Microbiologistas UNESP - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal. Campus de Jaboticabal, UNESP, 17 de maio de 1984.

Realizado pelo Departamento de Microbiologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, em colaboração com a Sociedade Brasileira de Microbiologia - SBM, teve como objetivo principal, integrar os docentes pesquisadores da UNESP, envolvidos nas diferentes áreas da microbiologia, através da divulgação das linhas de pesquisa, recursos e metas que prevalecem e propiciando assim, uma análise das dificuldades e possibilidades de cooperação mútua.

Teve como enfoque principal, conferência do Dr. Wilson Chagas de Araújo - FINEP, sobre as possibilidades de financiamento de pesquisa, nas diferentes áreas da microbiologia. Baseado nos esclarecimentos desta conferência, os grupos de pesquisa "afins" reuniram-se e determinaram diretrizes a serem seguidas, daqui para frente.

Contou ainda com a participação do Dr. João Salvador Furtado - Presidente da SBM e Dr. Carlos Solé Vernin, professor homenageado.

Deste Encontro, ficaram fortalecidas algumas sugestões e decisões, visando a continuidade dos trabalhos iniciados nos primeiros Encontros, a saber:

- Reunião de grupos de pesquisa - união de grupos de trabalho que darão continuidade às atividades, através de reuniões, comunicações particulares, elaboração de trabalhos e outros
- Sugestões para apresentação de palestras sobre diferentes temas de interesse na microbiologia por especialistas de diferentes entidades de pesquisa, durante a realização dos futuros Encontros
- Determinação do V Encontro de Microbiologistas UNESP, a ser realizado no mês de novembro de 1984, no "Campus" de São José dos Campos, sob a coordenação da Prof. Vera Fantinato Dametto, com sugestão de subvenção do evento, através do CNPq e FAPESP
- Necessidade de relatos de pesquisa em andamento dentro da UNESP, visando maior disseminação da informação produzida pelos diversos departamentos, com vistas à maior integração entre os microbiologistas.
- Cooperação institucional em fagotipagem.

Leila Vasconcellos  
 SBM  
 Caixa Postal 4005  
 01000 São Paulo SP

Fundação Faculdade de Agronomia "Luiz Meneghel". Poliagro, 15(1):1-90, 1983.

A Fundação Faculdade de Agronomia "Luiz Meneghel" de Bandeirantes, Paraná, edita desde 1977 a Revista Poliagro, estando a mesma no seu 7º ano de edição e 5º de volume. Após dois anos de interrupção, de 1978 a 1979, a mesma vem saindo regularmente, com dois números por ano. Apresenta formato 16, de fácil manuseio e acomodação. O número de indexação impresso na capa mostra que a mesma tem penetração no exterior.

Como o próprio nome diz, a Revista Poliagro trata de assuntos científicos agronômicos. Interessa, em particular, aos pesquisadores e estudantes relacionados às ciências agrárias e, de modo geral, aos agricultores que tenham necessidade de conhecimentos mais profundos, porém, de natureza mais aplicada, como mostra o fascículo nº 1 editado neste ano. Este apresenta assuntos que foram reunidos em dois tópicos: artigos científicos e informação técnica. No primeiro tópico, citamos: "Vulnerância do *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. para duas castas de *Atta sexdens ribropilosa* (Forel., 1908)", "Estimativa do uso consuntivo de água e da irrigação suplementar, para algumas culturas no vale do Rio São Francisco", "Efeito de diferentes dosagens de inseticidas no controle da lagarta *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797), na cultura do trigo", "Estudo comparativo entre a longevidade, número de posturas, de óvulos e ovos de fêmeas virgens e fecundadas do percevejo "manchador do algodoeiro", *Dysdercus maurus* Distant, 1901 (Hemiptera: Pyrrhocoridae)", "Inseticidas em pulverização no controle da broca da raiz *Eutinobothrus brasiliensis* (Hambleton, 1937) na cultura do algodoeiro", "Uso de vermiculita e casca de arroz em diferentes profundidades na semeadura direta de sementes de café em viveiro". No segundo tem-se: "Formação de nuvem devido a queima de canavial".

Ely Nahas  
 Deptº de Microbiologia  
 Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal UNESP  
 Campus de Jaboticabal  
 14870 Jaboticabal SP

Gluzman, Y., ed. - Eukaryotic viral vectors. New York, Cold Spring Harbor Laboratories, 221p., 1982.

"Eukaryotic Viral Vectors" apresenta o sumário dos trabalhos relatados em conferência realizada no Centro Banbury do Cold Spring Harbor Laboratory, em dezembro de 1981. Recentemente, se tem observado uma verdadeira revolução do conhecimento a cerca do mecanismo genético das células eucarióticas. Este sucesso advém da habili-

dade técnico-científica de clonar e propagar sequências de DNA eucariótico em vetores procarióticos, propiciando, diretamente, a determinação de uma gama imensa de sequências nucleotídicas, corroborando também, para a aquisição de conhecimento, não só da organização geral do cromossomo eucariótico, como do estudo específico dos genes em si. Tendo por base estas primícias, os conferencistas apresentam diversas pesquisas e resultados de modernos trabalhos em Engenharia Genética, bem como propõem novas metodologias neste campo. Quanto ao uso de vetores procarióticos na propagação de sequências de DNA de eucariontes, os estudos mais desenvolvidos ainda são com o vírus SV 40 e poliomídia, como enfatizam Treisman & col., que a partir de plasmídios construídos com DNA SV 40 e fazendo uso da técnica de recombinação in vivo, esclarecem particularidades em Talassemia através da análise molecular da estrutura e expressão de genes mutantes de beta-globina; quanto ao vírus do poliomídia, conhecimentos do seu mecanismo de regulação génica, favorecem a sua utilização como vetor para clonagem e caracterização de genes promotores de células de mamíferos, em particular de roedores, segundo os informes de Hassel & col. Por outro lado, fica notório ao leitor que a técnica de construção e clonagem de vetores de DNA recombinante, em bactérias, antes da "transfecção" em células animais vem sendo adotada, por exemplo, por Gheysen & col., quando do estudo da expressão do gene de interferon de fibroblasto humano em células de macaco. Outra abordagem interessante se volta para os vírus animais que têm sido adaptados para serem utilizados como vetores, tal como o SV 40 e que tange propriamente a determinadas limitações de uso, por exemplo, o peso molecular do DNA a ser introduzido. Nesta linha, Tabin & col. descreveram uma série de experimentos tomado como alternativa técnica os retrovírus, citando neste caso, a inserção do gene timidinaquinase do herpes (tk) em MLV (Maloney lukemia virus) como modelo de pesquisa. A publicação presente totaliza cerca de 30 títulos de trabalhos apresentados no evento científico. Pela aluzão racional, concisa e, particularmente, atualizada da informação, é de real interesse aos que se dedicam à Genética Molecular.

Akira Hamma  
 Instituto de Tecnologia em Produtos Biológicos  
 Bio-Manguinhos da Fundação Oswaldo Cruz  
 Caixa Postal 926  
 20000 Rio de Janeiro RJ

Ana Carolina Paulo V. Madureira  
 & José Cavalcante de A. Ribeiro Dias  
 Laboratório de Genética Bacteriana  
 Deptº de Bacteriologia FIOCRUZ  
 Caixa Postal 926  
 20000 Rio de Janeiro RJ

Linn, S.M. & Roberts, R.J. - Nucleases, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982.

Trata-se de mais um livro de uma série de excelentes monografias publicadas pelo Cold Spring Harbor Laboratory. James Watson, ganhador do Prêmio Nobel em 1962 e atual diretor do Cold Spring Harbor Laboratory, foi o autor da idéia deste livro, assim como da conferência realizada em agosto de 1981 sobre as nucleases e que reuniu vários pesquisadores que estudam estas enzimas.

Historicamente, as nucleases não têm sido estudadas como tal, mas sobretudo pelo seu papel em vários fenômenos biológicos, tais como os quatro Rs: replicação, recombinação, reparo e restrição. Sob essa denominação incluem-se enzimas como especificidade variável, indo desde exonucleases ou nucleases específicas para ácidos nucleicos de fita simples, até as endonucleases de restrição altamente específicas.

O livro está dividido em 12 capítulos escritos por diferentes autores. Muitos dos capítulos procuram dar ênfase no papel das nucleases em diferentes processos. Assim, dignos de nota são os seguintes capítulos: Papel das nucleases na recombinação

genética (P.S. Sadowski), abordando os mecanismos da recombinação geral e da recombinação "site-specific"; Nucleases envolvidas no reparo do DNA (S. Linn), que discute as várias endo e exonucleases que participam nos diferentes tipos de reparo; Atividades de nucleases envolvidas na replicação do DNA (D.R. Brown & col.), com ênfase na replicação do bacteriófago  $\phi$ X 174 e também abordando as diferentes atividades de nuclease (3' 5' exonucleases, 5' 3' exonucleases) associadas com as diferentes DNA polimerases; Nucleases que processam RNA (S. Altman & col.), explicando como as várias classes de RNA funcionais, como mRNA, tRNA ou rRNA sofrem a ação de processos, onde estão envolvidas nucleases, que levam à alterações no tamanho do transcrito original de RNA. Outros capítulos, como o das DNA topoisomerase (J. C. Wang), que fazem o relaxamento do DNA superior enrolado, o das nucleases específicas de cadeia simples (K. Shishido & T. Ando) e o das ribonucleases H (R.J. Crouch & M.L. Dirksen) são extremamente interessantes. Há dois capítulos sobre as endonucleases de restrição: as endonucleases de restrição dependentes de ATP (T.A. Bickle) e as enzimas de modificação e de restrição do tipo II (P. Modrich & R.J. Roberts). As endonucleases de restrição tiveram um efeito profundo na biologia molecular quando elas foram descobertas no início da década de 1970 E passaram a ser usadas para dissecar o DNA. Cada endonuclease de restrição corta DNA ou RNA em uma sequência específica de 4-6 nucleotídeos; em um genoma particular, os sítios de restrição, isto é, os pontos onde a enzima corta o DNA, são fixos e, portanto, as endonucleases de restrição têm sido empregadas para cortar uma molécula de DNA em fragmentos reproduzíveis, daí a sua utilização na tecnologia do DNA recombinante.

Este livro é valioso tanto para os que trabalham em biologia molecular ou que se utilizam das técnicas de engenharia genética, como para aqueles que, fora deste campo, desejam se inteirar do papel das nucleases nos diferentes fenômenos biológicos: replicação, recombinação, reparo, restrição e maturação de RNAs. Como apêndice, para os que pretendem utilizar estas enzimas, há uma lista das diferentes nucleases já isoladas, com as respectivas características.

Maria Helena Juliani  
Instituto de Química USP  
Caixa Postal 20780  
01000 São Paulo SP

MGG - Molecular & General Genetics: an International Journal, 185(3):373-522, 1982.

Trata-se de uma publicação periódica, na verdade, a primeira revista internacional sobre genética, fundada em 1908, sob nome de *Zeitschrift für induktive Abstammungs und Vererbungslehre*. De 1958 a 1966, passou a ser chamada de *Zeitschrift für Vererbungslehre*. Do volume 98 em diante, foi intitulada de *Molecular and General Genetics*. O seu corpo editorial compreende especialistas de renome internacional no campo da Biologia Molecular, e está indexada no Current Contents/Life Sciences.

Esta revista procura refletir o papel da genética molecular dando ênfase aos aspectos biológicos e biofísicos do estudo da genética moderna. São ainda publicadas contribuições originais tratando de aspectos moleculares da genética de organismos superiores.

Assim, no número da revista que nos foi entregue para análise, encontramos 8 artigos descrevendo experiências de Engenharia Genética envolvendo as bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus sanguis*, os bacteriófagos T3, T7,  $\phi$ X174, além de genes clonados de milho e da descoberta da possibilidade de transformação genética de embriões de peixe. Na área de radiobiologia, há 6 artigos, referentes à sensibilidade aos raios gama de novos mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, ao reparo de tipo SOS em *E. coli*, à mutagênese UV-induzida no bacteriófago M13 e à reparação de lesões UV-induzidas em fibroblastos em cultura de pessoas portadoras de anemia de Fanconi. Outros artigos, de enfoque mais bioquímico, incluem estudos sobre a biossíntese da RNA polimerase em *E. coli*, a síntese do fator de elongação Tu em *E. coli*, o papel de RNA poliadenilado na esporulação em *Bacillus subtilis*, a regulação da transcrição em fago lambda, a compo-

sição da proteína ribossomal da arqueobactéria *Sulfolobus*, a descrição de uma mutação de gene de proteína ribossomal de *E. coli* e um estudo de hibridização de tRNA de *Drosophila melanogaster*.

Consideramos portanto, este periódico como indispensável em bibliotecas freqüentadas por pesquisadores das áreas de biologia molecular, genética microbiana e bioquímica.

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

**Robertson, H.D.; Howell, S.H.; Zaitlin, M. & Malmberg, R.L.** - Plant infectious agents: current communications in molecular biology. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 230p., 1983. US\$ 27.60.

A publicação contém 32 trabalhos apresentados na reunião sobre Vírus de Plantas, que se realizou de 27 de fevereiro a 2 de março de 1983, no Balbury Center de Cold Spring Harbor, USA.

S. Howell, M. Zaitlin e H. Robertson selecionaram os conferencistas da reunião, os quais apresentaram trabalhos recentes, em virologia vegetal, sobre vírus de DNA e RNA, viróides, virusóides e satélites, assim como técnicas desenvolvidas, nos últimos anos, para o seu estudo.

Entre os assuntos apresentados, foram incluídos o vírus do mosaico da couve-flor, único fitovírus conhecido até o momento que possui, no genoma, cadeia dupla de DNA e os geminivirus, descobertos em 1976, caracterizados como sendo partículas geminadas ou bipartidas, constituídos de uma cadeia simples, circular de DNA. Também foram abordados os vírus de ddNA e sRNA, sua replicação, estrutura, organização genética, RNAs dos "strains" e RNAs subgenômicos. Além disso, foram apresentados trabalhos sobre os patógenos subvirais que incluem: a) os viróides, pequenas moléculas circulares de sRNA sem proteína, que codificam sua própria replicação; b) os sRNAs satélites, que necessitam de um vírus auxiliar para sua replicação, modificam os sintomas induzidos por esse vírus embora não sejam necessários para a codificação da proteína do vírus e c) os chamados virusóides, descobertos em 1980, cuja denominação foi sugerida em 1982, pequenos RNAs circulares, necessários à infectividade de alguns vírus e que apresentam algumas semelhanças com os viróides e os satélites.

O volume inclui uma excelente introdução feita por A.D. Robertson sobre os patógenos virais e subvirais, em plantas, e a metodologia que tem sido usada nesse tipo de pesquisa, além de um resumo escrito por B. Burr e T. Shenk sobre os vírus de DNA e RNA, viróides, virusóides e satélites.

No final do livro está incluída uma lista da sequência de nucleotídeos de diversos vírus de DNA e RNA, extraída dos artigos originais.

Esse documento é de grande interesse para os virologistas, pois contém informações recentes sobre fitovírus, apresentadas numa reunião de alto nível, cujos resumos os organizadores conseguiram publicar no mesmo ano de sua realização.

Marly Vicente  
Seção de Virologia Fitopatológica  
Instituto Biológico  
Caixa Postal 7119  
01000 São Paulo SP

**Schlesinger, M.J.; Ashburner, M. & Tissieres, A.** - Heat shock from bacteria to man. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 439p., 1982.

A publicação resultou do primeiro congresso, organizado para discutir problemas relacionados com a indução e repressão de proteínas nos seres vivos, ocasionadas

por choques térmicos. A reunião foi realizada de 5 a 9 de maio de 1982, no Cold Spring Harbor Laboratory, a ela comparecendo cerca de 130 especialistas, apresentando 90 comunicações, das quais 53 estão publicadas no presente livro, contendo informações que vão desde a análise das proteínas, envolvidas no fenômeno do choque térmico, até a clonagem de genes *hap*, que codificam essas proteínas. Neste capítulo introdutório, é relatado o histórico do fenômeno "choque térmico", que foi descrito pela primeira vez em 1962, quando, em *Drosophila*, foi verificado que alterações na temperatura induziam a formação de alguns pufes específicos, nos cromossomos; em 1974 o choque térmico revelou ser indutor da síntese de alguns polipeptídeos e repressor a formação de outros; em 1978 o processo, até então restrito a *Drosophila*, foi estendido a outros seres vivos, incluindo bactérias, protozoários, leveduras, plantas e animais superiores. O modelo mostrou-se universal, e não só com relação a choques de temperatura, mas também, induzido por outras condições de "stress" por que passam os seres vivos, ocasionados, entre outros, por substâncias químicas e infecções virais. O livro aborda o controle do processo, a nível de transcrição e tradução, da regulação dos genes envolvidos e das proteínas relacionadas com o choque térmico. O volume de dados apresentados é considerável, no que se refere à expressão dos genes envolvidos, o significado funcional dos mesmos e sua regulação.

Cerca de 25% dos capítulos é destinado a estudos em microrganismos, mas ainda o grande volume de dados vem do organismo onde ele foi descrito pela primeira vez, ou seja, a *Drosophila*. No entanto, ficou demonstrado que a resposta em bactérias é similar aquela que ocorre em *Drosophila* e que as proteínas, envolvidas no fenômeno em bactérias, são também importantes para a morfogênese de bacteriófagos.

O significado funcional de fenômenos é discutido e a principal hipótese é de que ele deve proteger as células contra drásticas modificações do ambiente, não apenas com relação aos choques térmicos, mas incluindo também as causadas por infecções, tipo de envenenamento e danos externos aos tecidos.

É livro indispensável para aqueles que trabalham no assunto e para os que desejam se familiarizar com o processo, que, inclusive, deve adquirir importância clínica, uma vez que, a indução dessas proteínas pode ter relevância na hipersensibilidade de células tumorais.

João Lúcio de Azevedo  
Deptº de Genética  
Instituto de Genética ESALQ  
Caixa Postal 83  
13400 Piracicaba SP

UNESCO/UNEP/ICRO - Mircen News, 5, May 1983.

A publicação apresenta um completo resumo das linhas de pesquisa, programas de treinamento de recursos humanos e reuniões científicas realizadas e programadas que recebem financiamento da UNESCO. A rede de centros científicos financiados pela UNESCO abrange onze países.

Os relatórios tratam sobre diversos temas, entre os quais corresponderessaltar, a modo de suscinto resumo, Biodegradação, Microbiologia Aplicada, Biotecnologia, Engenharia Genética, Fusão de Protoplastos e Fixação Simbiótica de Nitrogênio.

Neste último tópico, se apresenta o resumo das atividades que a este respeito vem desenvolvendo o grupo orientado pelo Prof. Jardim Freire, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 776, 90000 Porto Alegre RS.

Sugerimos que os interessados em obter a publicação ou mais informações a respeito de algum dos temas mencionados entrem em contato com o Dr. Freire.

Juan L. Carrau  
Instituto de Biotecnologia  
Universidade de Caxias do Sul  
Caixa Postal 1352  
95100 Caxias do Sul RS