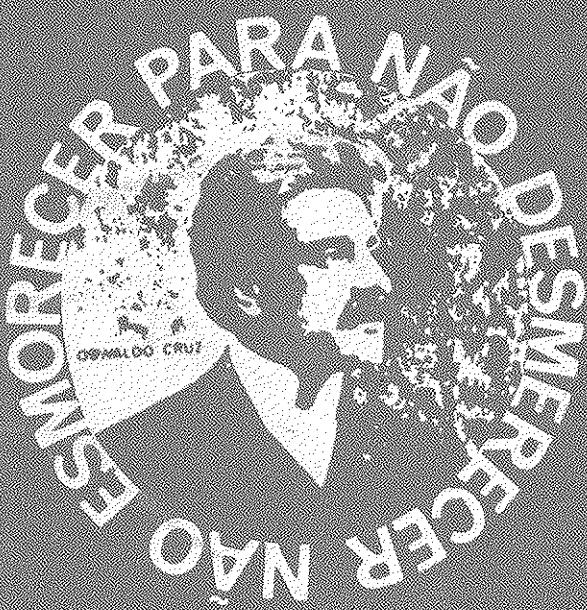


Revista de Microbiologia

Página 1



SBM

Sociedade
Brasileira de
Microbiologia

São Paulo — Brasil

Volume 16 Número 2 Abr-Jun. 1985

Instruções aos autores

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

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

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

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

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

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

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

A página título deverá conter apenas e tão somente: (i) o título do artigo, usando-se letras maiúsculas somente quando obrigatórias, (ii) 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 compreensíveis, sem necessidade de consulta ao texto. São permitidas notas explanativas de rodapé indicadas por asteriscos, mas não descrições pormenorizadas dos experimentos. Materiais e métodos utilizados para a obtenção dos resultados devem ser incluídos na seção correspondente.

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

Diretor Executivo João Salvador Furtado
Instituto de Ciências Biomédicas USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
Cidade Universitária USP
05508 São Paulo SP

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

Assistente de Diretoria Leila Vasconcellos
Sociedade Brasileira de Microbiologia
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
Cidade Universitária USP
05508 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.

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

Sociedade Brasileira de Microbiologia

Diretoria Presidente
Marcelo Magalhães
Universidade Federal de Pernambuco
Cidade Universitária
50000 Recife PE

Vice-Presidente
João Salvador Furtado
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
Cidade Universitária USP
05508 São Paulo

Secretário Geral
Milton de Uzeda
Instituto de Microbiologia UFRJ
Centro de Ciências da Saúde
Bloco I — Ilha do Fundão
21941 Rio de Janeiro RJ

Tesoureiro
Walderez Gambale
Instituto de Ciências Biomédicas USP
Deptº de Microbiologia
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
Cidade Universitária USP
05508 São Paulo SP

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

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

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

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

Companhia Industrial e Comercial Brasileira de Produtos Alimentares
Embrabio - Empresa Brasileira de Biotecnologia Ltda.

Henkel S.A. Indústrias Químicas

Indústrias Químicas e Farmacêuticas Schering S.A.

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

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

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA
VOLUME 16 ABRIL-JUNHO 1985 NÚMERO 2
REV. MICROBIOL. (S. PAULO), 16(2)

CONTEÚDO

Santa Rosa, M.R. de

- 83 Ultraestrutura do vacúolo pulsátil de *Monodinium balbiani*

Melo, S.M. de;
 Santos, P.E.B.
 & Fontenelle, M.I.G.

- 90 Surto de infecção hospitalar por *Serratia marcescens*

Martinez, M.B.
 & De Bonis, J.C.

- 93 Isolamento de *Yersinia enterocolitica* em um portador assintomático

Queiroz, D.M. de M.;
 Mendes, E.N.;
 Cisalpino, E.O.;
 Peres, J.N.
 & Penna, F.J.

- 95 Frequência de *Escherichia coli* enteropatogênica em crianças com diarréia aguda e em controles, em Belo Horizonte

Prieto, G.;
 Martinez, A.
 & Cepeda, I. de

- 101 Prevalencia y evolucion de la resistencia en *Shigella* aislada en Venezuela

Costa, E.O. da;
 Coutinho, S.D.;
 Teixeira, C.M.
 & Cantagalo, P.

- 113 Dermatose por *Candida albicans* em cão

Roehe, P.M.;
 Rodrigues, N.C.;
 Oliveira, S.J. de;
 Guzzardi, I.I.
 Barcellos, D.E.S.N. de;
 Vidor, T.;
 Oliveira, L.G.
 & Bangel, E.V.

- 117 Encefalomielite suína no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil

Salgado, J.M.;
 Bassi, L.C.
 & Silva, C.R.V. e

- 121 Toxicidade de isolados de *Diplodia maydis* (Berk) Sacc. e possíveis toxinas

Echeverrigaray, S.
 & Tavares, F.C.A.

- 127 Atividade da inulinase em leveduras e fermentações de extratos de *Helianthus tuberosus* L

CONTENTS

Ultrastructure of the contractile vacuole in Monodinium balbiani

Outbreak of hospital-acquired infection by Serratia marcescens

Search Yersinia enterocolitica in healthy humans

Enteropathogenic Escherichia coli isolated from children with acute diarrhea, in Belo Horizonte

Prevalence and evolution of resistance in Shigella from Venezuela

Canine dermatosis by Candida albicans

Encephalomyocarditis virus (EMCV). in swine in the state of Rio Grande do Sul, Brazil

Toxicity of Diplodia maydis isolates

*Inulinase activity in yeasts and direct fermentation of *H. tuberosus* extracts*

- Ferraz, C.A.M;
Aquarone, E.
& Krauter, M.
- Cruz, M.R. de M.;
Vairo, M.L.;
Gambassi, D.M.
& Alterthum, F.
- Srivastava, K.C.
- Informação
Técnico-Científica SBM
- Craveiro, A.M.
- Pohland, F.G.
- 132 Efeito da luz e do pH no crescimento de *Spirulina maxima*
- 138 Influência da penicilina V-ácida no controle das infecções bacterianas na fermentação alcoólica
- 143 Produção de álcool a partir de casca de soja: um estudo preliminar
- 153
- 166 Produção de metano a partir de vinhaça
- 171 Tecnologia de biogás nos Estados Unidos: uma revisão
- Effect of light and pH on growth of Spirulina maxima*
- The influence of V-acid penicillin on the control of bacterial contamination of alcoholic fermentation*
- Production of alcohol from the soybean seed coat: a preliminary study*
- Biogas technology in the United States: an overview*

ULTRAESTRUTURA DO VACÚOLO PULSÁTIL DE *MONODINIUM BALBIANI*^{*}

Milden Rodrigues de Santa Rosa

Laboratório de Microscopia Eletrônica
Instituto de Microbiologia UFRJ
Caixa Postal 68040
21944 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Resumo

Microscopia fotônica de *Monodinium balbiani*, obtida de impregnações ao Protargol, evidencia o aspecto geral e a localização do vacúolo pulsátil, assim como os poros excretores, localizados na parte posterior do animal. Descreve-se aspectos ultraestruturais do vacúolo contrátil, com observações sobre os poros excretores e a cortina helicoidal de microtúbulos que os envolvem no sentido longitudinal. Características da membrana seladora do poro excretor (diafragma) e observações sobre o sistema de canalículos que constitui o espongioma ou nefridioplasm.

Summary

Ultrastructure of the contractile vacuole in Monodinium balbiani

Light microscopy of *Monodinium balbiani* after silver impregnation revealed the morphology and the localization of the pulsating vacuole and excretor pores, both of them placed at posterior end of the animal. Some ultrastructural aspects of the contractile vacuole, excretor pores and the helical band of microtubules surrounding longitudinally the pore are described, with details of the pore-sealing membrane belonging to the excretor pore (diaphragm) and the system of "tubules" that constitute the spongiome (nephridioplasm).

Introdução

M. balbiani é um ciliado dulcícola da família *Didinidae*, muito frequente em águas claras. Tem a forma aproximada de um barrillete, 50-80 μ m de comprimento, por ca. 60 μ m na parte mais larga, dele havendo já várias descrições (8, 15). Este ciliado apresenta uma só cintura ciliar, com cerca de 50 cinéias no terço anterior do corpo, o que o faz distinguir de *Didinium*, que apresenta duas. Além da cintura ciliar, apresenta uma proeminência anterior, denominada rostro, por onde se dá a ingestão de presas. O rostro constitui uma boca temporária, que se fecha após a ingestão das presas (8, 15). Na região antapical localiza-se o vacúolo pulsátil, com 7-9 poros excretores.

O vacúolo pulsátil dos ciliados, tem gerado numerosas e importantes observações, remontando, as primeiras descrições, a Spallanzani. Esta organela produz a expulsão

* Trabalho realizado no Instituto de Microbiologia da UFRJ, com auxílio do CEPG/UFRJ e do CNPq (Processos 30.0653/80 e 40.1940/81).

periódica de líquido da célula, através de poros excretores permanentes, nos ciliados. Há sobre o assunto, numerosas e extensivas revisões (4, 5, 9-12). Observações recentes sugerem que o vacúolo pulsátil é contrátil ou contratível (9, 10, 13); teria associado a ele um sistema de canalículos e funcionaria com uma "bexiga". É envolvido por um complexo de finos túbulos, 20-50nm em diâmetro, designados de túbulos nefridiais ou aparelho excretor (11). Nos ciliados, a ligação do vacúolo pulsátil com os poros excretores poderia ser permanente ou temporária (3, 6, 7), havendo no poro uma membrana seladora ou diafragma, que separa o vacúolo pulsátil do meio exterior (6).

Neste artigo, relatam-se resultados dos estudos feitos sobre a ultraestrutura do complexo vacúolo/poro excretor no ciliado.

Material e Métodos

Figura 1 - Preparação ao proteinato de prata segundo o método de Tuffrau. Mostra o aspecto geral da célula com o rostro anterior em regeneração (após a ingestão de uma presa). Notar a cintura ciliar e a região densa que corresponde a massa macronuclear. Na região antapical aparece o vacúolo pulsátil em diástole (v). 1600x. A barra calibradora corresponde a 10µm

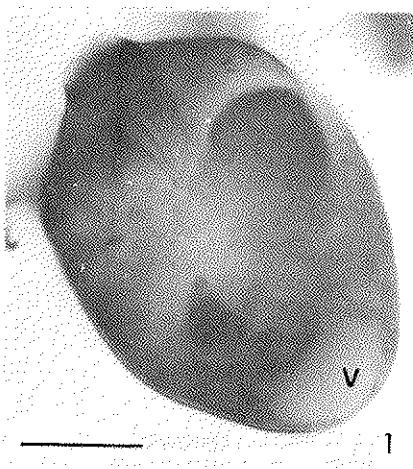
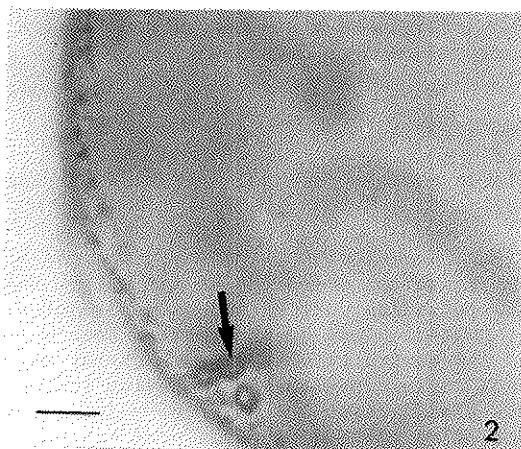


Figura 2 - Preparação, segundo o método de Chatton-Lwoff, ao nitrato de prata. Quatro poros excretores do vacúolo pulsátil são visíveis no canto inferior (flecha). 4000x. A barra corresponde a 2µm



M. balbiani é predador de outros ciliados e extremamente cômodo de ser cultivado "in vitro". É manipulado através de pipetas capilares e cultivado em tubo ou, preferencialmente, em salteiras (Syracuse Dishes-Salières), com água mineral não gasosa, acrescida de presas. As mais usadas foram *Tetrahymena pyriformis* ou *Colpidium campylum*. As culturas foram observadas diariamente e, quando necessário, acrescentado um pouco mais de presas, com pipeta Pasteur.

Nas impregnações ao proteinato de prata, seguiu-se o método de Bodian, segundo as variantes de Dragesco ou de Tuffrau (14), quando prefere-se a fixação, em saleira, com Bouin alcoólico durante 3 a 5 minutos; em seguida, foi feita lavagem com três banhos de água destilada e clarificação com solução bem diluída de hipoclorito de sódio. Após breve lavagem, em água destilada, os animais foram transferidos e adestrados a lâminas, com albumina glicerinada de Mayer. Posteriormente à reidratação, houve imersão das lâminas em solução de protargol a 0,5%, onde permaneceram por 24 horas, em temperatura ambiente. A revelação foi feita com hidroquinona a 1%; em seguida, as lâminas foram lavadas, desidratadas e montadas em bálsamo do Canadá.

Nas impregnações ao nitrato de prata, foi usado o método de Chatton-Lwoff (2). Os animais, em saleiras, foram fixados com Champy durante 1 a 3 minutos e, em seguida, com Da Fano, por 2 horas. Após lavagem, os ciliados foram transferidos para lâminas e revestidos, após homogeneização manual, com gelatina fundida a 10%. Imediatamente após, procedeu-se a gelificação da gelatina, sobre placa de gelo e as preparações foram recobertas com solução de nitrato de prata a 3%. Em seguida, foi realizada a redução da prata, através de exposição à irradiação ultravioleta, até obter-se coloração um pouco mais clara que o Champy. Depois, procedeu-se a lavagem, desidratação e montagem em bálsamo do Canadá.

Os animais foram triados e concentrados através de micromanipulações com pipetas capilares, com o auxílio de microscópio esterioscópico, com iluminação epidiascópica.

Figura 3 – Micrografia eletrônica passando pela região antapical. Notar o vacúolo pulsátil (V) em início de diástole. Envolvendo o vacúolo aparecem túbulos do espongioma do tipo "decorated tubules" (flechas). Na parte inferior aparecem várias mitocôndrias bem densas e mais abaixo o cortex. Na região cortical são vistos diversos mucocistos (flecha branca) com o corpo mucígeno central bem denso. Notar finalmente o poro excretor (p) em corte longitudinal que apresenta cerca de 0,8 μ m de comprimento por aproximadamente 1,2 μ m de diâmetro. Notar ainda a esquerda do poro, uma região desestruturada da região cortical, provavelmente em processo de refazer-se após danos sofridos na sístole anterior. 17.100x. A barra correspondente a 0,5 μ m



Para a microscopia eletrônica, os animais foram concentrados, também, com pipetas capilares e fixados em saleira, com misturas fixadoras cujas concentrações finais variaram, mas foram geralmente: glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato ou tampão cacodilato a 0,1M. Após lavagens no tampão os animais foram pôs fixados em solução de tetróxido de ósmio a 2%, em tampão cacodilato de sódio 0,1M. Após lavagem, os ciliados foram pré-incluídos em solução de ágar a 1%, desidratados e incluídos, definitivamente, em Epon 812.

Os cortes foram obtidos com o ultramicrotomo Ultratome V da LKB e, após serem colhidos em grade de cobre de 200 meshes, foram duplamente contrastados ao acetato de uranila e ao citrato de chumbo. Os documentos electronmicrográficos foram obtidos ao microscópio EM 301 da Philips sob tensão de 60-80Kv.

Resultados e Discussão

Ao microscópio de luz, verifica-se que o vacúolo pulsátil de *M. balbiani*, ocupa uma expressiva porção da parte posterior da célula (Fig. 1) e elimina seu conteúdo através dos 7-9 poros excretores, agrupados também na região posterior (Fig. 2), geralmente numa depressão. Esta poderia representar um artefato de fixação ou uma concavidade formada logo após a sistole vacuolar.

Figura 4 – Microeletronografia semelhante a anterior com uma maior definição do poro excretor. Nesse caso o poro tem aproximadamente a mesma altura da camada cortical ($0,5\mu\text{m}$) e um diâmetro de aproximadamente $1\mu\text{m}$. Notar que a parede do poro é reforçada por uma cortina helicoidal de cerca de 17 microtúbulos com 250 a 300 Å de diâmetro (seta). 44.000x. A barra corresponde a $0,25\mu\text{m}$.

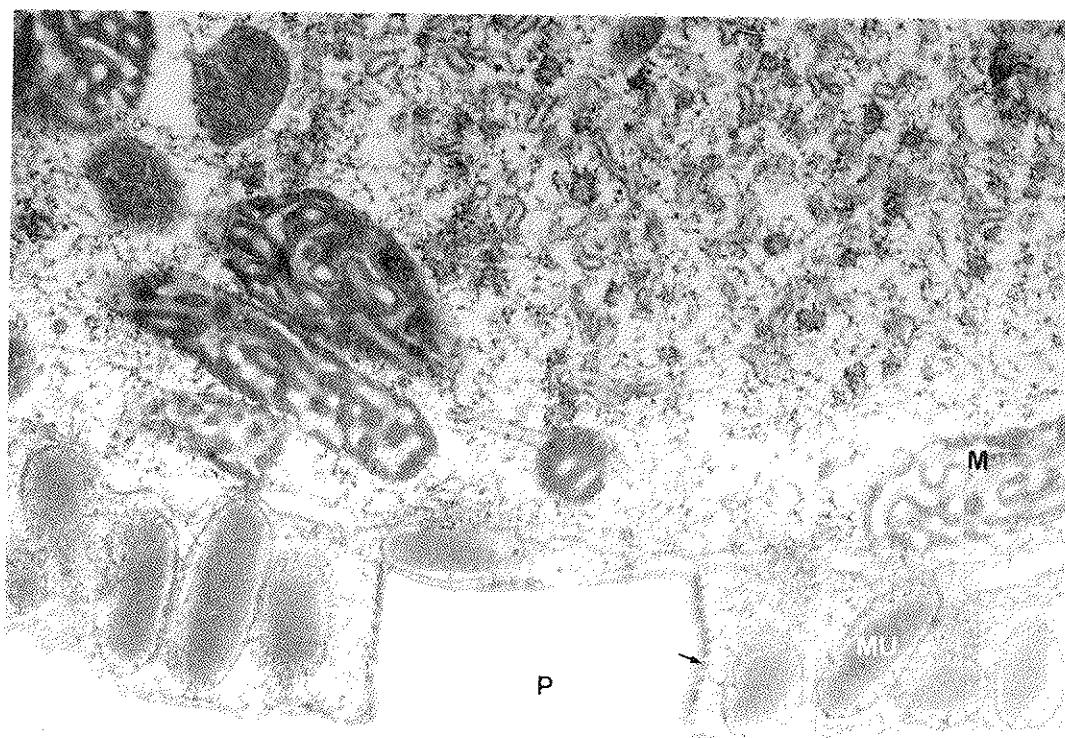
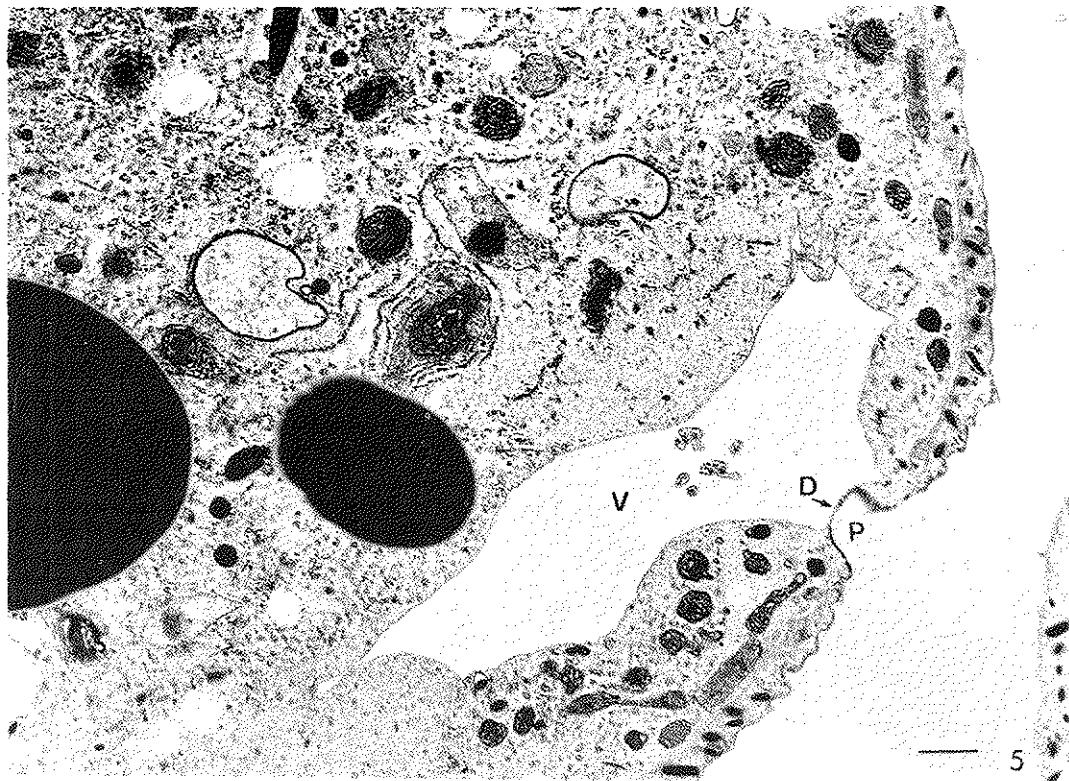


Figura 5 – Aspecto geral da parte posterior da célula passando pelo vacúolo pulsátil (V) em diástole. É bem visível o diafragma do poro excretor (D). 7.500x. A barra corresponde a 10 μ m



Em secções ultrafinas, observou-se certa variação no tamanho dos poros excretores, sendo o valor médio 1,2 μ m de diâmetro por 0,8 μ m de altura, até o diafragma. Estes valores são compatíveis aos descritos por McKanna (6, 7), em *Paramecium*. Normalmente, a altura do poro é igual à da chamada cortical, mas valores maiores, até o dobro, puderam ser observados (Figs. 3, 5).

Exames detalhados dos poros excretóres revelaram uma cortina helicoidal de cerca de 17 microtúbulos, logo abaixo da membrana plasmática, na parede lateral da estrutura (Fig. 4), e que corresponde ao que McKanna (6) chamou de "annulus". Não foram notados em *M. balbiani* outros microtúbulos que pudessem tomar a direção do vacúolo pulsátil, como relatados por Patterson (9, 11), em outros ciliados.

Na zona citoplasmática, adjacente ao vacúolo pulsátil encontra-se um complexo de estruturas tubulares, umas mais delgadas de ca. 50nm de diâmetro, de paredes lisas e outras, de calibre maior, ca. 80nm de diâmetro, com paredes "decoradas" (Figs. 3, 6). Von Gelei, em 1925, havia sugerido o termo nefridioplasma ou espongioma a região osmiofíla de canais, que envolviam o vacúolo pulsátil e que se revelou à microscopia eletrônica como sendo uma estrutura formada por túbulos e vesículas (6, 7). Tem sido demonstrado também que esses túbulos podem ter paredes lisas ou providas de grânulos ou microfibrilas na parte citoplasmática (1, 3, 7). No caso de *M. balbiani*, observações cuidadosas dos túbulos "decorados" mostraram que eles apresentam, em sua luz, reforços anelados, semelhantes à "traquéia" (Fig. 7), fato este ainda não assinalado para outros ciliados. O complexo tubular observado em *M. balbiani* junto ao vacúolo pulsátil corresponde ao espongioma. Verificou-se neste, que

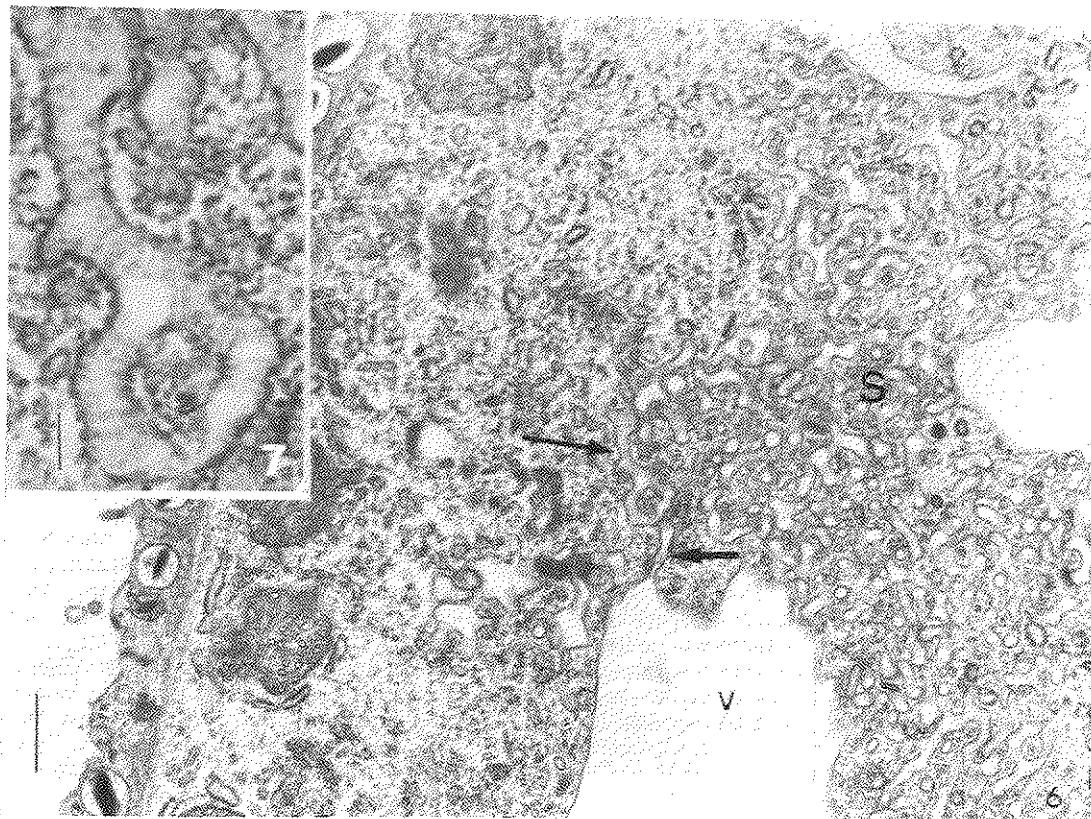
apenas os túbulos lisos desembocam no vacúolo pulsátil (Fig. 6), como ocorre em outros ciliados (6, 7, 9-12) e também, que não haveria continuidade aparente dos elementos do espongioma com os do retículo endoplasmático.

Conforme já descrito em outros ciliados, observou-se nos poros, na fase de pré-sistole, o diafragma ou a membrana seladora do poro (Fig. 5).

Apesar de algumas pequenas particularidades, o aspecto geral do complexo vacúolo pulsátil, espongioma e poro excretor de *M. balbiani* corresponde, sob o ponto de vista ultraestrutural, ao dos demais ciliados já estudados.

Figura 6 - Detalhe do espongioma (S) mostrando grandes dilatações do vacúolo pulsátil (V). Observar canalículo liso do espongioma intercomunicando este com o vacúolo pulsátil (flecha grossa). Observar também, que certos túbulos do espongioma apresentam reforços anelados (flecha fina). 18.200x. A barra corresponde a 0,5 μ m

Figura 7 - Detalhe ampliado da microeletronografia anterior. 72.800x. A barra corresponde a 0,1 μ m



Referências Bibliográficas

1. Carasso, N.; Fauré-Fremiet, E. & Favard, P. - Ultrastructure de l'appareil excréteur chez quelques ciliés périrhîches. *J. Microsc.*, 1:455-468, 1962.
2. Corliss, Y.O. - Silver impregnation of ciliated protozoa by the Chatton: Iwoff technic. *Stain Tech.*, 28:97-100, 1953.
3. Elliot, A.M. & Balk, I.J. - The contractile vacuole and related structures in *Tetrahymena pyriformis*. *J. Protozool.*, 11:250-261, 1964.
4. Fauré-Fremiet, E. & Roiller, C. - Le cortex de la vacuole contractile et son ultrastructure chez les ciliés. *J. Protozool.*, 6:29-37, 1959.
5. Hausmann, K. & Allen, R.D. - Membranes and microtubules of *Paramecium caudatum* (excretory apparatus). *Cytobiologie*, 15:303-320, 1977.

6. McKenna, J.A. - Fine structure of the contractile vacuole pore in *Paramecium*. *J. Protozool.*, 20:631-638, 1973.
7. McKenna, J.A. - Fine structure of fluid segregation organelles of *Paramecium*. *J. Ultrastruct. Res.*, 54:1-10, 1976.
8. Santa Rosa, M.R. de & Didier, P. - Remarques sur l'ultrastructure du cilié *Gymnostome Monodinium balbiani* (Fabre-Domergue, 1888). *Protistologica*, T. XI, 4:469-479, 1975.
9. Patterson, D.J. & Sleigh, A. - Behavior of the contractile vacuole of *Tetrahymena pyriformis* W: a redescription with comments on the terminology. *J. Protozool.*, 23:410-417, 1976.
10. Patterson, D.J. - On the behaviour of contractile vacuoles and associated structures of *Paramecium caudatum* (Ehrbg.) *Protistologica*, T. XIII, 2:205-212, 1977.
11. Patterson, D.J. - Contractile vacuoles and associated structures: their organization and function. *Biol. Rev.*, 55:1-46, 1980.
12. Patterson, D.J. - Contractile vacuole complexe behaviour as a diagnostic character for free-living amoebae. *Protistologica*, T. XVII, 2:243-248, 1981.
13. Sleigh, M.A. & Patterson, D.J. - Cinematographic observations on the contractile vacuole cycle in *Tetrahymena pyriformis*. *J. Protozool.*, 22:56A, 1975.
14. Tuffrau, M. - Perfectionnements et pratique de la technique d'imprégnation au protargol des infusoires ciliés. *Protistologica*, 3:91-98, 1967.
15. Wessenberg, H. - Capture and ingestion of *Paramecium* by *Didinium nasutum*. *J. Protozoology*, 17:250-270, 1970.

SURTO DE INFECÇÃO HOSPITALAR POR SERRATIA MARCESCENS*

Sinval Martins de Melo
 Paulo Eustáquio Brito Santos
 & Maria Inaculada G. Fontenelle
 Deptº de Microbiologia
 Instituto de Ciências Biológicas UFMG
 Caixa Postal 2486
 30000 Belo Horizonte MG, Brasil

Resumo

Serratia marcescens provocou surto de meningite em crianças internadas com gastroenterite, que recebiam hidratação parenteral. O germe foi isolado do líquor e/ou sangue das crianças e em amostras de soro, quando em perfusão. O surto de infecção hospitalar foi eliminado, assim que as seringas descartáveis, que eram reutilizadas, após esterilização química, deixaram de ser utilizadas.

Summary

Outbreak of hospital-acquired infection by Serratia marcescens

Serratia marcescens caused an outbreak of meningitis in children on treatment for gastritis, that were receiving parenteral hydration. The germ was isolated from children's cerebrospinal fluid, blood, and/or serum samples, when in perfusion. The outbreak of hospital infection finished as soon as the plastic syringes were no more used again, after chemical sterilization.

Introdução

As infecções hospitalares são responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade em muitas instituições. A situação no Brasil revelou incidência de 4,1 a 13,2% (10, 11).

Os bastonetes Gram negativos (BGN) são os mais frequentes e estão ligados a casos graves de doenças como septicemias e meningites (7).

Considerada inofensiva, até há poucos anos, *S. marcescens*, produtora de pigmento, foi utilizada como marcador biológico. Estudava-se a dispersão microbiana em ambiente hospitalar espalhando-a em locais convenientes (9).

Até 1964 a literatura registrou três casos de infecções atribuídas à *Serratia*. A partir de então, foram inúmeras as publicações mencionando esta bactéria em casos de septicemias, meningites, otites médias, peritonites, osteomielites, infecções por ferimentos, etc. (5).

* Trabalho executado no Deptº de Microbiologia ICB/UFMG, com auxílio da CAPES, CNPq e FINEP.

Os seguintes meios de transmissão têm sido implicados: desinfetantes (hexaclorofeno, compostos de amônio quaternário), nebulizadores, soluções intravenosas, cateteres de polietileno, broncoscópios, equipamentos de oxigênio. Infecções por *Serratia* podem ser também iatrogênicas, como na manipulação do trato geniturinário, diálise peritoneal, hemodiálise, transfusão de sangue, cateterização venosa e punção lombar.

A dispersão do patógeno parece ser do tipo mão-a-mão, pelo pessoal do hospital (9). O trato geniturinário constitui importante reservatório natural de *S. marcescens*, enquanto o trato gastrintestinal não parece ser relevante, em se tratando de adultos. O uso de antibióticos é aceito como um fator de risco para o desenvolvimento de *S. marcescens* (9).

Neste trabalho, tratamos de um surto de infecção hospitalar, envolvendo crianças internadas com gastroenterite, e que estavam sendo hidratadas parenteralmente. O exame de líquor e sangue das crianças, bem como o de soros em perfusão nos pacientes, revelou a presença de *S. marcescens*.

Material e Métodos

Foram examinados, bacteriologicamente, 17 espécimes, assim distribuídos: líquor, 6; sangue, 2; soro em perfusão, 4; soro estocado para hidratação parenteral, 5.

O isolamento das amostras foi feito em caldo tripticase soja citratado a 1%, após incubação a 37°C. As culturas negativas foram desprezadas, decorridos sete dias de observação. Como as culturas mostraram tratar-se de BGN, estas foram reisoladas em EMB-ágar (Difco), submetidas a testes bioquímicos para identificação genérica (1) e a testes de utilização de carbono a partir de carboidratos e de crescimento (a 5°C, 40°C e em concentração de 8,5% de NaCl) para a determinação da espécie (6, 8). Uma antibioticotipagem foi feita empregando-se o ágar Mueller-Hinton (Difco) e discos (Difco) para 13 antibióticos (técnica de Kirby-Bauer). A determinação antígenica para as amostras identificadas foi realizada com soro anti "O" de título 1:10, obtido em coelho imunizado com antígeno "O" de uma delas (2). O teste usado foi o da soroaglutinação rápida em lâmina, com o soro diluído a 1:10 em solução fisiológica.

Resultados

De 17 espécimes examinados foram obtidos seis isolados que se comportaram como *Serratia*, segundo testes bioquímicos para reconhecimento de gêneros de Enterobacteriaceae (1). A procedência das seis amostras foi a seguinte: paciente A, de soro, em perfusão e líquor; paciente B, de soro em perfusão e sangue; pacientes C e D, de líquor. Esses microrganismos não produziram pigmento, cresceram em temperatura de 5°C e 40°C, em caldo tripticase soja com 8,5% de NaCl e em KCN de Brown. Não produziram gás em glicose, utilizaram carbono a partir do adonitol, D-sorbitol e deixaram de utilizar a partir de L-arabinose, D-xilose, cellobiose, lactose, melicitose, melibiose e rafinose. Esses resultados são compatíveis com *Serratia marcescens* (6, 8). Além das provas acima, que provam tratar-se de um mesmo biótipo, foi feito antibiograma com as seis amostras, que apresentou o seguinte resultado: todas elas foram sensíveis à amicacina, canamicina, cloranfenicol, gentamicina, nitrofurantoina, sisomicina e tobramicina e resistentes à carbenicilina, cefalotina, estreptomicina, rifampicina, sulfametoxazol-trimetoprim e tetraciclina. Finalmente, foi constatada aglutinação com um soro de título 1:10 obtido com uma delas.

Discussão

O aparecimento de um surto de meningite em crianças com gastroenterite, que recebiam hidratação parenteral, levou a direção da instituição a solicitar uma investigação bacteriológica. Esta resultou no isolamento de um mesmo tipo de *Serratia marcescens* caracterizado por diferentes marcadores epidemiológicos (biotipagem, antibioticotipagem e sorotipagem). O encontro desse mesmo tipo ou sub-espécie

bacteriana presente, simultaneamente em soro em perfusão e em sangue e/ou líquor em pacientes que estavam recebendo tais soros, sugere um tipo accidental e grosseiro de contaminação hospitalar, ligado ao sistema de hidratação. Todavia, mudanças na conduta de tratamento, como hidratação oral ou o não reaproveitamento de seringas descartáveis na administração dos soros foram suficientes para erradicar o surto.

Serratia marcescens é um patógeno oportunista, cuja importância cresce a cada dia. Sua participação em meningites e sua resistência a antibióticos e a certos desinfetantes usados indevidamente para esterilizar materiais descartáveis, tem sido motivo de preocupação (5, 9).

Acreditamos que problemas semelhantes não são raros em nosso meio. Surto de dimensão e consequências maiores ocorreu num grande hospital desta cidade há algum tempo. As bactérias isoladas, conforme comunicação pessoal, eram do grupo *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, não podendo ser afastada então a hipótese do envolvimento de *Serratia marcescens* não produtora de prodigiosina.

Referências Bibliográficas

1. Bailey, W.R. & Scott, E.G. - Diagnostic microbiology: a textbook for the isolation and identification of pathogenic microorganisms. 3.ed. Saint Louis, C.V. Mosby, 1970.
2. Bier, O. - Bacteriologia e imunologia. 15.ed. São Paulo, Melhoramentos, 1970.
3. Ehrenkrans, H.J.; Bolyard, E.A. & Wiener, M. - Antibiotic-sensitive *Serratia marcescens* infections complicating cardiopulmonary operations: contaminated disinfectant as a reservoir. *The Lancet*, 11:1289-1292, 1980.
4. Feingold, D.S. - Hospital-acquired infections. *New Engl. J. Med.*, 283:1384-1391, 1970.
5. Filoy, L.; Serrano, D. & Borjas, E. - Infection intra-hospitalaria por *Serratia marcescens* y su sensibilidad a los antibióticos. *Bol. Med. Infant. Mex.*, 37:871-877, 1980.
6. Grimont, P.A.D.; Grimont, F. & Dulong de Rosnay, H.L.C. - Taxonomy of the genus *Serratia*. *J. Gen. Microbiol.*, 98:39-66, 1977.
7. McNamara, M.J.; Hill, M.C.; Balows, A. & Tucker, B. - A study of the bacteriologic patterns of hospital infections. *Am. Intern. Med.*, 66:480-488, 1967.
8. Véron, M. - Nutrition et taxonomie des Enterobacteriaceae et bactéries voisines. I - Méthode d'étude des auxanogrammes. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 126A:267-274, 1975.
9. Yu, V.L. - *Serratia marcescens*: historical perspective and clinical review. *New Engl. J. Med.*, 300:887-893, 1979.
10. Zanon, U. - Infecções hospitalares. In: - Neves, J. - Diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.881-971, 1978.
11. Zanon, U. - Infecções hospitalares: um problema médico-social. *Ars Curandi*, 14:37-53, 1981.

ISOLAMENTO DE YERSINIA ENTEROCOLITICA EM UM PORTADOR ASSINTOMÁTICO

Marina Baquerizo Martinez
 & José Cesar De Bonis

Deptº de Análises Clínicas e Toxicológicas
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP
 Caixa Postal 30786
 01051 São Paulo SP, Brasil

Resumo

Yersinia enterocolitica foi pesquisada em 276 amostras de fezes de indivíduos que não apresentavam sinais e sintomas de gastrenterites. Após o enriquecimento em tampão fosfato por três semanas, as amostras de fezes foram semeadas em meio Y e incubadas a 28°C por 48 horas. Houve apenas um isolamento (0,4%) de *Yersinia enterocolitica*.

Summary

Search Yersinia enterocolitica in healthy humans

Yersinia enterocolitica was searched in 276 stool samples of healthy humans. After three weeks enrichment in phosphate buffer at 4°C the stool samples were inoculated in Y medium and incubated at 28°C during 48 hours. Only one *Y. enterocolitica* was found among all samples analysed.

Yersinia enterocolitica é uma das principais causas de enterite nos países escandinavos e Canadá. No Brasil, o primeiro isolamento de origem humana deu-se em 1976 (Piszolitto, A.C.; Falcão, D.P.; Shimizu, M.T.; Galvão, S.H.M. & Giraldini, E. - Contr. Microbiol. Immunol., 5:169-173, 1979).

Não há evidências definitivas de que o homem seja reservatório de *Yersinia enterocolitica*. Em revisão realizada por Swaminathan (Swaminathan, B.; Harmon, M.C. & Mehlmann, J.J. - J. Appl. Bacteriol., 52:151-183, 1982), pode-se observar que vários autores pesquisaram esta bactéria em indivíduos assintomáticos: Kanezawa & Ikemura isolaram *Yersinia enterocolitica* de 10,4% de 1706 indivíduos sem sintomatologia. Os sorotipos isolados eram diferentes dos sorotipos normalmente implicados em doenças humanas. Asakawa & col. examinaram 4673 indivíduos assintomáticos e obtiveram somente 0,39% de isolamento. Shayegani & col. pesquisaram *Yersinia enterocolitica* em 95 indivíduos sem sintomas, tendo encontrado *Yersinia enterocolitica* sorotipo 08 em duas pessoas (2,1%).

Com o objetivo de pesquisar *Yersinia enterocolitica* de indivíduos assintomáticos em nosso meio, foram analisadas 276 amostras de fezes de pessoas cujas idades variaram de 4 meses a 84 anos, sendo 142 pertencentes ao sexo feminino e 134 ao sexo masculino.

Em paralelo a técnica usual de isolamento de enterobactérias, utilizando fezes recentemente emitidas, foi seguida a técnica preconizada por Soltész (Soltész, L.V.; Schalén, C.E.; Mardh, P. - Acta Path. Microbiol. Scand. Sect., 88:11-16, 1980). Ocorreu apenas um isolamento (0,4%) de *Yersinia enterocolitica* em adulto jovem do sexo feminino. A cepa foi isolada apenas no meio de Soltész, com colônias pequenas, não fermentadoras de lactose. As provas bioquímicas, realizadas a 28°C

(exceto quando especificada), mostraram que a cepa isolada apresentava comportamento bioquímico típico de *Yersinia enterocolitica*: celobiose +; lactose -; melibiose -; ramnose -; sacarose +; trealose +; glicose (ácido) +; glicose (gás) -; uréia +; indol -; H₂S (TSI) -; VM +; VM 37°C +; VP -; VP 37°C -; motilidade +; motilidade 37°C -; lisina descarboxilase -; arginina dihidrolase -; ornitina descarboxilase +; ONPG +; ONPG 37°C +; oxidase -; fenilalanina desaminase -.

A tipagem identificou-a como pertencente ao sorotipo 03, biotipo 4 e fagotípico VIII. O antibiograma (Bauer, A.W.; Kirby, E.M.M.; Sherris, J.C.; Turck, M. - Amer. J. Clin. Path., 45:493-496, 1966), revelou ser a amostra sensível a tetraciclina, cloranfenicol, carbenicilina, canamicina, colistina, sulfametoxazol-trimetoprim, sulfadiazina, neomicina, sulfato de gentamicina, cefoxitina, amicacina e resistente a ampicilina ecefalotina.

Agradecimentos

Agradecemos a Prof. Deise P. Falcão da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, pela biotipagem e fagotipagem da amostra.

FREQUÊNCIA DE *ESCHERICHIA COLI* ENTEROPATOGÉNICA EM CRIANÇAS COM DIARRÉIA AGUDA E EM CONTROLES, EM BELO HORIZONTE

Dulciane Maria de Magalhães Queiroz
Edilberto Nogueira Mendes

Deptº de Clínica Médica
Faculdade de Medicina UFMG
Av. Alfredo Balena, 190
30000 Belo Horizonte MG, Brasil

Eduardo Osório Cisalpino
José Noronha Peres

Deptº de Microbiologia
Instituto de Ciências Biológicas UFMG
Av. Antonio Carlos, s/n
30000 Belo Horizonte MG, Brasil

& Francisco José Penna

Deptº de Pediatria
Faculdade de Medicina UFMG

Resumo

Escherichia coli enteropatogênica foi pesquisada nas fezes de 80 crianças, com diarréia aguda e de 33 crianças, sem diarréia, de até 2 anos e 3 meses de idade, em Belo Horizonte, no período de junho/1981 a agosto/1982. Foram isolados sorogrupos enteropatogênicos clássicos de 10 pacientes (12,5%) e de apenas uma criança do grupo controle (3,0%). *Escherichia coli* enterotoxigênica foi isolada de 18 pacientes (22,5%) e de duas crianças sem diarréia (6,0%). Amostras produtoras apenas de enterotoxina termoestável (ST) e produtoras, simultaneamente, de enterotoxinas termoestável e termolábil (ST/LT) foram isoladas apenas de crianças com diarréia. Todas as amostras de *Escherichia coli* produtoras de enterotoxina ST e 60% das amostras produtoras de ST/LT exibiram fatores de colonização (CFA). Nenhuma amostra de *Escherichia coli* invasora foi isolada das 113 crianças estudadas. Foram ainda executados testes de susceptibilidade a antimicrobianos das amostras isoladas.

Summary

Enteropathogenic Escherichia coli isolated from children with acute diarrhea, in Belo Horizonte

Enteropathogenic *Escherichia coli* were searched for in the feces of 80 children with acute diarrhea and 33 children without diarrhea, all of them younger than two years and three months, in Belo Horizonte, MG, Brazil, from June/1981 to August/1982. Classical enteropathogenic *Escherichia coli* serogroups (associated with infantile diarrhea) were isolated from ten patients (12,5%) and from only one child of the

A Tabela 4 mostra os fatores de colonização (CFA) encontrados nos diferentes fenótipos de *Escherichia coli* enterotoxigênica isolados de crianças com diarréia. As amostras de *Escherichia coli* enterotoxigênica, isoladas de crianças sem diarréia (produtoras apenas de enterotoxina LT) não apresentaram nenhum dos fatores de colonização pesquisados.

A maioria das amostras de *Escherichia coli* enteropatogênica isoladas das crianças com diarréia foi suscetível à amicacina, à gentamicina e ao colistin. Foi observada baixa susceptibilidade às cefalosporinas de 1ª geração, à neomicina, à associação sulfametoazol-trimetoprim e às tetraciclinas, bem como resistência múltipla a 5 ou mais antibacterianos em 23 amostras (82,0%).

Discussão

A literatura brasileira é escassa no que se refere a trabalhos que relatam, simultaneamente, a frequência das três classes de *Escherichia coli* enteropatogênica. Os resultados deste estudo mostram a importância deste grupo de microrganismos na etiologia dos processos diarréicos da infância (35,0%), à semelhança dos trabalhos desenvolvidos por Magalhães & col. (12) que, estudando 60 crianças com diarréia em Recife, isolaram *Escherichia coli* enteropatogênica em 33,5% dos casos e Murahovisch & Trabulsi (13), em São Paulo, que relataram o encontro destes colibacilos em 25,2% de 350 crianças diarréicas estudadas.

É importante salientar as diferentes frequências de isolamento relatadas em cada região. Assim, neste estudo, *Escherichia coli* enterotoxigênica foi o colibacilo mais frequente (22,5%), seguida de *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (12,5%). Diversas publicações, entretanto, mostram uma menor incidência de amostras enterotoxigênicas, em crianças diarréicas. Linhares & col. (11), em Belém, relatam o encontro destes colibacilos em 3,5%, Magalhães & col. (12), em Pernambuco, em 12,0%; Reis & col. (15), em São Paulo em 13,4%; Echeverria & col. (5), nas Filipinas, em 10,8% e Pickering & col. (14), em Houston e México, em 6,0%. Por outro lado, altas incidências de *Escherichia coli* enteropatogênica clássica foram relatadas por Alvariza (1), em São Paulo, (31,0%); por Magalhães & col. (12), em Recife (22,5%) e por Trabulsi & col. (19) em São Paulo (21,0%).

No grupo controle, não foram isoladas amostras de colibacilos produtoras de enterotoxina ST ou LT/ST. Entretanto, amostras produtoras apenas de enterotoxina LT foram identificadas, praticamente na mesma proporção, nos grupos de crianças com e sem diarréia. Este achado, também observado por outros pesquisadores (5, 10, 14), acrescido do fato de que estas amostras invariavelmente não apresentam fatores de colonização (CFA), tem levado autores como Trabulsi (18) e Reis & col. (15) a questionar o papel desempenhado pela *Escherichia coli* produtora apenas da enterotoxina LT na doença diarréica em São Paulo.

Esta hipótese necessita ser analisada cuidadosamente, pois existem trabalhos que relatam a associação entre amostras produtoras apenas da enterotoxina LT e doença diarréica, tanto em crianças quanto em adultos (8, 22). Experimentos em voluntários humanos demonstram que estes colibacilos são capazes de causar doença diarréica, quando administrados em dose adequada (9). Além disto, a ausência de CFA/I ou CFA/II nestas amostras não significa, necessariamente, que elas não sejam capazes de aderir, pois podem possuir outros fatores de colonização ainda não descritos.

A baixa susceptibilidade a vários antimicrobianos apresentada pelas amostras de *Escherichia coli* enteropatogênica isoladas neste estudo pode estar relacionada ao aparecimento de resistência em consequência da pressão seletiva exercida pelo uso amplamente difundido destas drogas em diversas situações clínicas ou não, tanto em humanos quanto em animais (21).

Tanto na resistência decorrente de mutação cromossômica, quanto na resistência mediada por plasmídios, a presença da droga favorece a seleção da amostra resistente. Entretanto, a resistência mediada por plasmídios pode ocorrer, simultaneamente, para várias drogas, mesmo para as não relacionadas estruturalmente. Assim, um único agente antimicrobiano pode exercer pressão seletiva e propiciar o aparecimento de amostras multi-resistentes.

Uma multi-resistência foi verificada, não apenas com as amostras de *Escherichia coli* enteropatogênica clássica, como também com as amostras enterotoxigênicas, o que pode dificultar a terapêutica específica, quando indicada.

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e do Conselho de Pesquisa (CPq)/UFMG.

Referências Bibliográficas

1. Alvariza, M.C.B. - Prevalência de colibacilos enteropatogênicos clássicos em crianças normais e com diarréia na cidade de São Paulo: características das amostras. São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1981. (Tese de Mestrado).
2. Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M.; Sherris, J.C. & Turck, M. - Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol., 45:493-496, 1966.
3. Cisalpino, E.O. - Contribuição à etiologia das infecções intestinais por *Escherichia coli* em Belo Horizonte. Belo Horizonte, Faculdade de Odontologia e Farmácia da Universidade de Minas Gerais, 1958. (Tese de Livre Docência).
4. Dean, A.G.; Ching, Y.C.; Williams, R.G. & Harden, L.B. - Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. J. Infect. Dis., 125:407-411, 1972.
5. Echeverria, P.; Blacklow, N.R.; Viollet III, J.L.; Ulyangco, C.V.; Cukor, G.; Soriano, V.B.; Dupont, H.L.; Gross, J.H.; Ørskov, F. & Ørskov, I. - Reovirus-like agent and enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in pediatric diarrhea in the Philippines. J. Infect. Dis., 138:326-332, 1978.
6. Edwards, P.R. & Ewing, W.H. - Identification of Enterobacteriaceae. 3.ed. Minneapolis, Burgess, 1972.
7. Evans Jr., D.J.; Evans, D.G. & Dupont, H.L. - Hemagglutination patterns of enterotoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* determined with human, bovine, chicken and guinea pig erythrocytes in presence and absence of mannose. Infect. Immun., 23:336-346, 1979.
8. Gorbach, S.L.; Kean, B.H.; Evans, D.G.; Evans Jr., D.J. & Bessudo, D. - Traveler's diarrhea and toxigenic *Escherichia coli*. N. Engl. J. Med., 292:933-936, 1975.
9. Levine, M.M.; Rennels, M.B.; Daya, V. & Hughes, T.P. - Hemagglutination and colonization factors in enterotoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* that cause diarrhea. J. Infect. Dis., 141:733-737, 1980.
10. Levine, M.M., Ristaino, P.; Sack, R.B.; Kaper, J.B.; Ørskov, F. & Ørskov, I. - Colonization factor antigens I and II and type 1 somatic pili in enterotoxigenic *Escherichia coli*: relation to enterotoxin type. Infect. Immun., 39:889-897, 1983.
11. Linhares, A.C.; Monção, H.C.; Gabbay, Y.B.; Araújo, V.L.C.; Serruya, A.C. & Loureiro, E.C.B. - Acute diarrhea associated with rotavirus among children living in Belém, Brazil. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 77:384-390, 1983.
12. Magalhães, M.; Andrade, M. & Carvalho, A.E. - Pathogenic *Escherichia coli* associated with infantile diarrhea. Rev. Microbiol. (S. Paulo), 12:38-41, 1981.
13. Murahovschi, J. & Trabulsi, L.R. - Aspectos etiológicos e epidemiológicos das diarréias infecciosas bacterianas. In: - Trabulsi, L.R. - Microbiologia das infecções intestinais. Rio de Janeiro, Atheneu, cap.2, p.11-24, 1981.
14. Pickering, L.K.; Evans Jr., D.J.; Muñoz, O.; Dupont, H.L.; Coelho-Ramirez, P.; Vollet, J.J.; Conklin, R.H. & Olarte, J. - Prospective study of enteropathogens in children with diarrhea in Houston and Mexico. J. Pediatr., 93:383-388, 1978.
15. Reis, M.H.L.; Guth, B.E.C.; Gomes, T.A.T.; Murahovschi, J. & Trabulsi, L.R. - Frequency of *Escherichia coli* strains producing heat-labile toxin or heat-stable toxin or both in children with and without diarrhea in São Paulo. J. Clin. Microbiol., 15:1062-1064, 1982.

16. Snyder, J.D. & Merson, M.H. - The magnitude of the global problem of acute diarrhoeal disease: a review of active surveillance data. Bull. W.H.O., 60:605-613, 1982.
17. Speirs, J.I.; Stavric, S. & Konowalchuk, J. - Assay of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin with Vero Cells. Infect. Immun., 16:617-622, 1977.
18. Trabulsi, L.R. - Microbiologia das infecções intestinais. Rio de Janeiro, Atheneu, 1981.
19. Trabulsi, L.R.; Manissadjian, A.; Oliveira Penna, H.A.; Liberatore, R.; Duailibe, L.; Camargo, B. & Peixoto, E.S. - Diarréias infantis por colibacilos enteropatogênicos: estudos preliminares sobre a ocorrência de certos grupos e tipos sorológicos em São Paulo. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 3:267-270, 1961.
20. W.H.O. Scientific Working Group - *Escherichia coli* diarrhoeae. Bull. W.H.O., 58:23-36, 1980.
21. W.H.O. Scientific Working Group - Antimicrobial resistance. Bull. W.H.O., 61:383-394, 1983.
22. Wood, L.V.; Wolfe, W.H.; Ruiz-Palacios, G.; Foshee, W.S.; Corman, L.I.; McCleskey, F.; Wright, J.A. & Dupont, H.L. - An outbreak of gastroenteritis due to a heat-labile enterotoxin producing strain of *Escherichia coli*. Infect. Immun., 41:931-934, 1983.

PREVALENCIA Y EVOLUCION DE LA RESISTENCIA EN SHIGELLA AISLADA EN VENEZUELA

Gustavo Prieto
 Ada Martínez
 & Irene de Cepeda

Centro Regional de Referencia Bacteriológica
 Hospital Universitario de Maracaibo
 Facultad de Medicina
 Universidad Del Zulia
 Maracaibo Venezuela

Resumen

De 1369 cepas de *Shigella* aisladas durante los años 1968-1982, el 89% de ellas son resistentes y el 84% de la resistencia es del tipo múltiple. No se observa resistencia para gentamicina, tobramicina, colimicina, polimixina-B, ácido nalidíxico, furadantina y trimethoprim-sulfametoazole. La resistencia más frecuentemente encontrada es Su 88%, St 84% y Te 47%. La resistencia es para Kn 16%, Nm 16%, Cm 13%, Am 13%, Cb 13% y Cr 6%. Resistencia para ampicilina está presente en *S. flexneri* (1972), *S. sonnei* (1973) y en el serotipo A₂ de *S. dysenteriae* (1974). Una marcada disminución en la resistencia para cloramfenicol se observa a través de los años del estudio. Aunque la resistencia múltiple más frecuentemente presente en estas shigelas es para 2 y 3 agentes, Su-St y Su-St-Te, su complejidad puede comprometer hasta 8 (2%) ó 9 (0.3%) antimicrobianos. La resistencia múltiple más compleja, Su-St-Te-Cm-Kn-Nm-Am-Cb-Cr, ha aparecido en *S. flexneri* desde 1972 y está presente en sus serotipos B₁, B₂ y B₆. Los niveles de resistencia en las shigelas estudiadas son clínicamente significantes. Se hace un análisis sobre la utilidad que tienen en la actualidad los diferentes agentes antimicrobianos en el tratamiento de la shigelosis en nuestro medio. El uso de ampicilina está perdiendo vigencia y ella no debería ser utilizada en el tratamiento de la infección si la sensibilidad no es soportada por un estudio de sensibilidad y resistencia. Ácido nalidíxico, ácido oxonílico y principalmente trimethoprim-sulfametoazole, son en nuestro medio, nuevas alternativas para el tratamiento de la shigelosis ampicilina resistente.

Summary

Prevalence and evolution of resistance in Shigella from Venezuela

In Venezuela of 1369 *Shigella* strains isolated between 1968-1982, 89% is resistant and 84% of it has multiple resistance. There were no resistance to gentamycin, tobramycin, polymyxin B, colymycin, nalidixic acid, nitrofurantoin and sulfamethoxazole-trimethoprim. The resistance most frequently found is: Su 88%, St 84% and Te 47%. The resistance to Kn is 16%, Nm 16%, Cm 13%, Am 13%, Cb

13% and Cr 6%. Resistance to ampicillin is present in *Shigella flexneri* (1972), *Shigella sonnei* (1973) and *Shigella dysenteriae A2* (1974). Through the study a decrease on cloramfenicol resistance is observed. The multiple resistance most frequently found in *Shigella* strains is for 2 and 3 agents, Su-St and Su-St-Te, but its complexity could implicate up to 8 (2%) or 9 (0.3%) antimicrobial agents. The most complex multiple resistance Su-St-Te-Cm-Kn-Nm-Am-Cb-Cr has appeared in *Shigella flexneri* since 1972 and is shown by its serotypes B₁, B₂ and B₆. The resistance levels are clinically significant. Comments about utility of different antimicrobial agents in the treatment of shigellosis in Venezuela are made. Ampicillin use is loosing utility and the necessity to know the strain susceptibility is stressed. Nalidixic acid, oxolinic acid and sulfamethoxazole-trimethoprim are in this country the new alternative for the treatment of shigellosis due to ampicillin resistance strains.

Introducción

Durante las tres últimas décadas la humanidad ha estado sometida a un experimento de carácter universal a través de la difusión mundial que se le ha dado al uso de los antibióticos. En la actualidad los resultados finales de tal experimento no pueden predecirse, no obstante, algunas consecuencias del mismo se han hecho evidentes. Los antibióticos han emergido como un factor ecológico significante y han logrado producir violaciones importantes en el evolucionado equilibrio natural existente entre las especies microbianas y las poblaciones. En el mismo sentido se ha interferido la interrelación huésped-parásito afectando con ello la estructura de la patología moderna, la naturaleza y formas de los procesos infecciosos cuyos diagnósticos clínico y de laboratorio se han complicado. Los patrones fenotípicos de resistencia que muestran las bacterias están relacionados, en las diferentes áreas geográficas, al uso en ellas de determinados antibióticos y esto es más evidente cuando tal uso ocurre en comunidades relativamente cerradas como es la hospitalaria.

Venezuela, donde el uso indiscriminado de los antibióticos es tan notorio que bien puede constituir un buen ejemplo de la utilización en forma irracional de este recurso médico, no ha podido escapar a esta verdad universal. Los altos porcentajes de resistencia y la frecuente contribución a la misma de la resistencia extracromosomal han sido demostrados por Prieto & col. (22, 23, 24, 25) en nuestras poblaciones bacterianas, especialmente en enteropatógenos como *Shigella*, *Salmonella* y *Escherichia coli* enteropatógena.

En el transcurso de los últimos 15 años cambios en la evolución de esta resistencia han acontecido en nuestro medio relacionados muy probablemente a variaciones ocurridas en la frecuencia de utilización de determinados antimicrobianos y al intenso uso que, por lo general, sigue a la introducción de otros en el arsenal terapéutico médico y veterinario. En el presente trabajo reportamos la prevalencia y evolución de la resistencia plasmidial a los agentes antimicrobianos en 1369 cepas de *Shigella* aisladas durante ese periodo.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas - En 1369 cepas de *Shigella* aisladas durante el periodo de 15 años (1968-1982) de coprocultivos procedentes principalmente de niños con clínica de disenteria bacilar, se determina el estado de susceptibilidad y resistencia ante 16 agentes antimicrobianos entre los cuales se incluyen aquellos de uso rutinario en el tratamiento de la shigellosis. La metodología para su aislamiento e identificación ha sido descrita en el trabajo anterior.

Susceptibilidad a los agentes antimicrobianos - El método del disco único de alta potencia según los criterios establecidos por Bauer y Kirby, es usado para la determinación del patrón de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos (2, 3, 6). La concentración de los discos usados y los diámetros de las zonas de inhibición que permiten establecer sensibilidad o resistencia a los agentes antimicrobianos aparecen en la Tabla 1.

Concentración Inhibitoria Mínima (C.I.M.) - Para determinar los niveles de resistencia en microgramos por mililitro se utiliza la técnica de dilución seriada en tubo (6), el inóculo utilizado es aproximadamente 10^5 bacterias por ml. El medio empleado es Caldo Mueller Hinton y la concentración inhibitoria mínima es determinada por ausencia de turbidez en el tubo.

Resultados

Tabla 1 - Guía para interpretar el tamaño del halo de inhibición.

Símbolos: * = incluye: cephalotin, cephaloridine, cephalexin, cefazolin, cephacetrile y cephapicin; ** = El disco de tetraciclinas es usado para las pruebas de susceptibilidad de todas las tetraciclinas, clortetracidina, demeclocycline, methacycline, doxycycline, oxytetracycline, rolitetracycline, minocycline y tetraciclina

Agente antimicrobiano	Potencia del disco	Zona de inhibición más cercana al disco en mm		
		Resistente	Intermedio	Sensible
Ampicilina (Am)	10 µgr	11 o menos	12 - 13	14 o más
Carbenicilina (Cb)	100 µgr	17 o menos	18 - 22	23 o más
Cefalosporinas* (Cr)	30 µgr	14 o menos	15 - 17	18 o más
Cloramfenicol (Cm)	30 µgr	12 o menos	13 - 17	18 o más
Colimicina (Cl)	10 µgr	8 o menos	9 - 10	11 o más
Gentamicina (Gm)	10 µgr	12 o menos	13 - 14	15 o más
Kanamicina (Kn)	30 µgr	13 o menos	14 - 17	18 o más
Ácido nalidíxico (An)	30 µgr	13 o menos	14 - 18	19 o más
Neomicina (Nm)	30 µgr	12 o menos	13 - 16	17 o más
Furadantina (Fd)	300 µgr	14 o menos	15 - 16	17 o más
Polimixina-B (Pb)	300 µgr	8 o menos	9 - 11	12 o más
Streptomicina (St)	10 µgr	11 o menos	12 - 14	15 o más
Sulfas (Su)	250 ó 300 µgr	12 o menos	13 - 16	17 o más
Tetraciclinas** (Te)	30 µgr	14 o menos	15 - 18	19 o más
Tobramicina (Tb)	10 µgr	11 o menos	12 - 13	14 o más
Trimethoprim-sulfametoazole (Ts)	25 µgr	10 o menos	11 - 15	16 o más

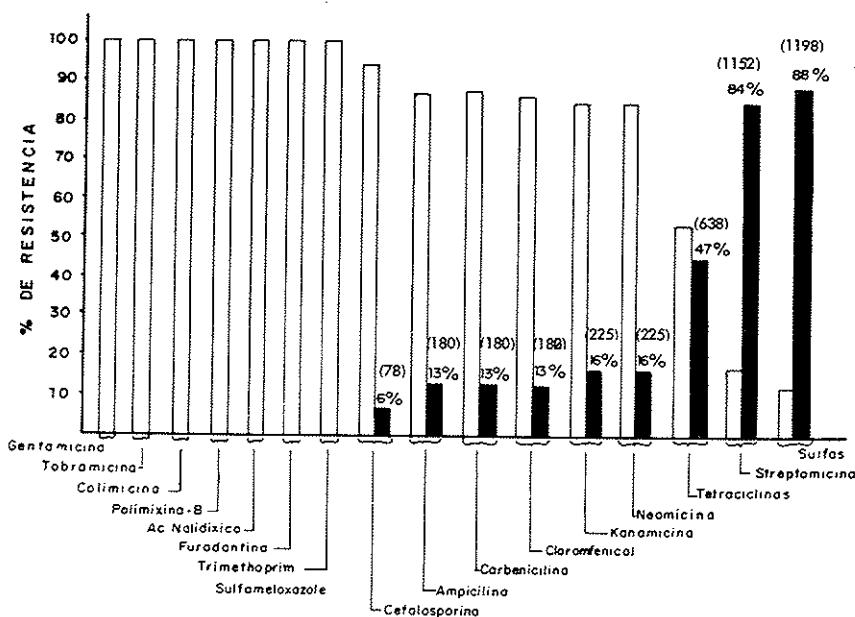
De las 1369 cepas estudiadas sólo 153 (11.17%) son sensibles a los 16 agentes antimicrobianos utilizados en este estudio, mientras que las 1216 (88.82%) restantes han desarrollado resistencia a uno o más agentes. El Figura 1 muestra los porcentajes de distribución de ésta sensibilidad y resistencia para los diferentes agentes antimicrobianos. Ninguna de las cepas ha desarrollado resistencia para gentamicina, tobramicina, colimicina, polimixina-B, ácido nalidíxico y furadantina. Tampoco se observa resistencia al trimethoprim-sulfametoazole en 489 cepas estudiadas con este antimicrobiano. La resistencia encontrada con más frecuencia es en orden decreciente: sulfas 88%, streptomicina 84% y tetraciclinas 47%. La resistencia para otros agentes como kanamicina, neomicina, cloramfenicol, ampicilina, carbenicilina y cefalosporinas oscila entre el 16% observado para los dos primeros y el 6% para el último.

Tabla 2 - *Shigella*, 1369 cepas (1968 - 1982). Porcentaje de resistencia

Agentes antimicrobianos	1968	1969	1970	1971	1972	1973	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982
Sulfas	100	93	100	94	91	95	88	89	88	90	87	79	82	71	62
Streptomicina	97	93	95	82	83	87	85	87	88	82	82	78	80	73	60
Tetraciclinas	86	63	55	50	50	49	46	44	45	32	41	43	51	44	34
Cloramfenicol	83	63	45	24	23	12	13	12	7	-	1	-	1	10	6
Kanamicina	17	3	-	-	10	8	21	15	18	21	22	26	30	10	14
Neomicina	17	3	-	-	10	8	21	15	18	21	22	26	30	10	14
Ampicilina	-	-	-	-	7	5	17	16	18	24	18	15	17	5	10
Carbenicilina	-	-	-	-	7	5	17	16	18	24	18	15	17	5	10
Cefalosporinas	-	-	-	-	4	4	4	10	6	10	5	5	6	5	6

Figura 1 - *Shigella*, 1369 cepas (1968 - 1982). Susceptibilidad y resistencia a 16 agentes antimicrobianos.

Símbolos: □ = % sensibilidad; ■ = % resistencia



En la Tabla 2 se puede apreciar, durante los 15 años del estudio, los porcentajes de resistencia para cada uno de los 9 agentes antibacterianos a los cuales las shigelas han desarrollado resistencia. En términos generales para sulfas y streptomicina se observan porcentajes elevados de resistencia en todas las 4 especies, las cuales oscilan entre el 60% y el 100% durante todos los años del estudio. Para tetraciclinas se observan variaciones en la resistencia presente en las 3 especies más frecuentemente aisladas, oscilando del 86% al 32%. La resistencia para 1982 es del 34%. Hay tendencia a disminuir los porcentajes de resistencia para sulfas, streptomicina y tetraciclinas. Una disminución más marcada para cloramfenicol es registrada. Esta disminución de resistencia se ha operado en las 3 especies más frecuentemente aisladas. *S. dysenteriae* desde porcentajes altas de resistencia, 71%, al inicio del estudio se muestra sensible desde 1978. *S. flexneri* para 1968 muestra porcentajes de resistencia del 90%, no observándose aislamientos con resistencia para este agente en los años 1977 y 1979. El porcentaje de resistencia que se registra en 1982 es del 13%. *S. sonnei* que inicialmente muestra 50% de resistencia, no está presente en aislamientos producidos en los últimos 6 años del estudio, con excepción de un 14% registrado en 1981.

En la resistencia para agentes como kanamicina y neomicina que al comienzo del estudio está presente sólo en *S. flexneri*, se observa una tendencia a sufrir pequeñas oscilaciones que le mantienen cerca del porcentaje inicial del 17% de resistencia registrado en 1968. Para 1982 se observa un 14% de resistencia para este agente. Esta misma tendencia también se observa en la resistencia para ampicilina y carbenicilina, la cual siendo detectada en 1972 (7%) en cepas de *S. flexneri*, se hace extensiva en 1973 a *S. sonnei*, en 1974 a *S. dysenteriae* y en 1979 a *S. boydii*. El porcentaje más alto de resistencia para éste agente es de un 24% en 1977. La resistencia registrada para 1982 es del 10%. Para cefalosporinas, resistencia que también se detecta en *S. flexneri* en 1972 en un 4% de las cepas aisladas ese año, permanece sin variaciones de incremento importantes en los años siguientes del estudio.

La Tabla 3 muestra en las cuatro especies de *Shigella* la distribución porcentual de la resistencia para los 9 agentes antimicrobianos a los cuales han desarrollado resistencia durante el periodo 1968-1982. En *S. dysenteriae*, *S. flexneri* y *S. sonnei* se observan porcentajes de resistencia para sulfas y streptomicina, los cuales oscilan entre el 80% al 89%. Todas las 5 cepas de *S. boydii* que muestran resistencia en las primeras tres especies para tetraciclínas es del 48%, 46% y 48% respectivamente. El mayor porcentaje de resistencia para cloramfenicol es observado en *S. dysenteriae* 25%, mientras que en *S. flexneri* es del 16% y en *S. sonnei* lo es del 6%. Para kanamicina y neomicina por el contrario, la resistencia en *S. flexneri* y *S. sonnei* es del 17% para ambos agentes, mientras que en *S. dysenteriae* es sólo del 8%. El mayor porcentaje de resistencia para ampicilina (16%), carbenicilina (16%) y cefalosporinas (8%) está presente en *S. flexneri*. En *S. sonnei* también se observa este tipo de resistencia en el orden del 8%, 8% y 2% respectivamente. *S. dysenteriae* aun cuando ha desarrollado resistencia para ampicilina (9%) y carbenicilina (9%) no lo ha hecho para cefalosporinas.

La distribución de resistencia en el serotipo A₂ de *S. dysenteriae* y en los serotipos B₁ y B₂ de *S. flexneri* es mostrada en la Tabla 4. Es notorio la evolución de la misma en el serotipo A₂ de *S. dysenteriae*, el cual muestra al inicio del estudio resistencia sólo a sulfas, produce nuevos aislamientos en 1972 resistentes a sulfas, streptomicina y tetraciclínas, desde entonces, ésta resistencia está presente frecuentemente en los años que siguen del estudio. Resistencia al cloramfenicol se detecta solamente en los años 1974 y 1975. Es este serotipo de *S. dysenteriae* el único que aunque infrecuentemente ha logrado desarrollar resistencia para kanamicina, neomicina, ampicilina y carbenicilina.

Tabla 3 - *Shigella*, 1369 cepas (1968 - 1982). Porcentaje de resistencia por especies

	<i>S. dysenteriae</i> (A)	<i>S. flexneri</i> (B)	<i>S. sonnei</i> (D)	<i>S. boydii</i> (C)
Sulfas	80	89	87	63
Streptomicina	80	84	86	63
Tetracilinas	48	46	48	25
Cloramfenicol	25	16	6	-
Kanamicina	8	17	17	13
Neomicina	8	17	17	13
Ampicilina	9	16	8	13
Carbenicilina	9	16	8	13
Cefalosporinas	-	8	2	-

Tabla 4 - *S. flexneri* serotipos B₁ y B₂ y *S. dysenteriae* serotipo A₂. Porcentajes de resistencia

Agentes antimicrobianos	1968	1969	1970	1971	1972	1973	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982	
Sulfas	A ₂	100	-	-	-	67	100	88	100	-	75	57	50	50	-	50
	B ₁	100	100	100	100	84	97	94	96	76	95	89	50	88	88	100
	B ₂	100	92	100	100	98	98	89	96	91	92	97	96	88	75	70
Streptomicina	A ₂	-	-	-	-	67	100	88	100	-	75	57	50	50	50	50
	B ₁	100	100	-	100	58	95	65	60	72	81	58	50	83	63	33
	B ₂	100	92	100	89	93	100	89	93	91	92	97	96	88	100	70
Tetracilinas	A ₂	-	-	-	-	33	-	50	20	-	50	14	50	-	-	-
	B ₁	100	66	-	100	37	37	41	56	56	19	21	50	63	33	
	B ₂	100	58	89	89	77	79	68	54	48	36	52	26	50	33	30
Cloramfenicol	A ₂	-	-	-	-	-	-	38	20	-	-	-	-	-	-	-
	B ₁	100	66	-	66	26	-	8	8	-	5	-	6	13	33	
	B ₂	100	66	78	33	36	13	4	14	-	-	-	-	8	10	
Kanamicina y Neomicina	A ₂	-	-	-	-	-	-	38	-	-	25	14	25	-	-	-
	B ₁	67	11	-	-	26	-	18	8	16	24	25	21	44	-	33
	B ₂	-	-	-	-	-	19	24	21	27	28	31	17	23	8	20
Ampicilina y Carbenicilina	A ₂	-	-	-	-	-	-	38	-	-	14	75	-	-	-	-
	B ₁	-	-	-	-	32	3	18	16	28	43	32	14	33	13	33
	B ₂	-	-	-	-	2	10	29	30	21	28	28	13	27	-	20
Cefalosporinas	A ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B ₁	-	-	-	-	16	3	6	4	28	24	5	-	17	-	33
	B ₂	-	-	-	-	2	4	16	21	15	8	7	4	-	-	20

Tabla 6 - *Shigella*, 1369 cepas (1968 - 1982). Patrones de resistencia

Tipo de patron	1968	1969	1970	1971	1972	1973	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982	Total	%
Su																	
St																	
Su-St																	
Su-Te																	
St-Te																	
Kn-Nn																	
Am-Cb																	
Am-Cb-Cr																	
Su-St-Te																	
Su-St-Cm																	
Te-Ch-Cb																	
Su-Am-Cb-Cr																	
Su-St-Te-Cm																	
Su-St-Kn-Nn																	
Su-St-Am-Cb																	
Kn-Nn-Am-Cb																	
Su-St-Am-Cb-Cr																	
Su-St-Te-Am-Cb																	
Su-St-Te-Kn-Nn																	
Su-St-Cm-Kn-Nn																	
Su-Te-Ch-Am-Cb																	
Su-Kn-Nn-Am-Cb																	
Su-Kn-Nn-Am-Cb-Cr																	
Su-St-Te-Am-Cb-Cr																	
Su-St-Kn-Am-Am-Cb																	
Su-St-Te-Ch-Am-Cb																	
Su-St-Te-Ch-Kn-Nn																	
Su-St-Kn-Nn-Am-Cb-Cr																	
Su-St-Te-Ch-Am-Cb-Cr																	
Su-St-Te-Kn-Nn-Am-Cb																	
Su-St-Te-Kn-Nn-Am-Cb-Cr																	
Sensible	3	3	11	6	17	23	11	10	9	18	17	8	17	1	5	153	11.17

Para tetraciclinas el porcentaje de resistencia es del 47%, a lo cual si sumamos el hecho de los efectos adversas que ésta provoca sobre los tejidos óseos y dentarios, lo cual limita su uso en pediatría, especialmente en los grupos etarios en los cuales el mayor número de casos de shigelosis tiene lugar, no es difícil concluir que éste agente tiene poca cabida en el tratamiento de la shigelosis en nuestro medio.

La disminución notable de los porcentajes de resistencia observados para cloramfenicol en éste estudio pudieran estar relacionados a la limitación que en los últimos años ha ocurrido en su uso en nuestro medio. La alta proporción de shigelas sensibles en la actualidad a éste antibiótico pudiera dejar ver la posibilidad de su utilización en el tratamiento de la shigelosis, desafortunadamente, sus conocidos efectos colaterales indeseables no justificarian su empleo para el tratamiento de una infección que como ésta se autolimita.

Tabla 7 - *S. dysenteriae*, 77 cepas (1968 - 1982). Patrones de resistencia

Tipo de patron	1968	1969	1970	1971	1972	1973	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982	Total	%
Su	1															1	1.29
St															1	1	1.29
Su-St		1															
St-Te				4	3	2	4		1	4		2		1	22	28.57	
Su-St-Te		1	2		3	1	5		1						1	1.29	
Su-St-Te-Cm	5	6		2		2	1								13	16.88	
Kn-Nn-Am-Cb															16	20.77	
Su-St-Te-Kn-Nn												1			1	1.29	
Su-St-Te-Am-Cb												2			1	1.29	
Su-St-Te-Qn-Kn-Nn															2	2.59	
Su-St-Te-Am-Cb							1								1	1.29	
Su-St-Kn-Nn-Am-Cb							1								1	1.29	
Su-St-Te-Kn-Nn-Am-Cb							1								1	1.29	
Su-St-Te-Qn-Kn-Nn-Am-Cb							1								1	1.29	
Sensible				1	2		1		1	3	1	2	1	1	14	18.18	

Tabla 8 - *Shigella flexneri*, 870 cepas (1968 - 1982). Patrones de resistencia

Tipo de patron	1968	1969	1970	1971	1972	1973	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982	Total	%	
St																1	0.11	
Su				1	1	6	11	4	11	1	3	4	1	1	2	46	5.28	
Te																1	0.11	
Su-Te	2	8	3	9	24	31	22	41	19	23	29	22	16	12	7	268	30.80	
St-Te															2	0.22		
Su-Pe				1	1		1	1								4	0.45	
Kn-Nm																1	0.11	
Am-Cb							1									1	0.11	
Am-Cb-Cr							1									2	0.22	
Su-St-Te				1	5	25	39	25	23	19	12	9	6	10	5	179	20.57	
Su-St-Cm				2	1	1	3		1	1						9	1.03	
Su-Am-Cb-Cr																1	0.11	
Su-St-Te-Cm	13	15	9	9	19	4	4	13	3							2	91	10.45
Su-St-Kn-Nm						1	2	1	1							6	0.68	
Su-St-Am-Cb																2	0.22	
Kn-Nm-Am-Cb																4	0.45	
Su-St-Am-Cb-Cr																3	0.34	
Su-St-Te-Am-Cb																7	0.80	
Su-St-Te-Kn-Nm				1	2	3	2	4	1	3	3	5				24	2.75	
Su-St-Cm-Kn-Nm																1	0.11	
Su-Te-Cm-Nm-Cb																1	0.11	
St-Kn-Nm-Am-Cb-Cr																1	0.11	
Su-Kn-Nm-Am-Cb																4	0.45	
Su-St-Kn-Nm-Am-Cb				2	2	2	2		5	2		4				17	1.95	
Su-St-Te-Am-Cb-Cr																15	1.72	
Su-St-Te-Cm-Am-Cb																4	0.45	
Su-St-Te-Cm-Kn-Nm	5	1			2	4		1								1	1.60	
Su-St-Kn-Nm-Am-Cb-Cr				1	1	5	3	2		1	2					15	1.72	
Su-St-Te-Kn-Nm-Am-Cb					2	3	6	1	4	8	2	2				28	3.21	
Su-St-Te-Cm-Am-Cb-Cr				2		1	1	1								5	0.57	
Su-St-Cm-Kn-Nm-Am-Cb																2	0.22	
Su-St-Te-Kn-Nm-Am-Cb-Cr																2	0.22	
Su-St-Te-Cm-Kn-Nm-Am-Cb																2	0.22	
Su-St-Te-Cm-Kn-Nm-Am-Cb-Cr																2	0.22	
Sensible	1	1	5	2	11	19	8	8	3	8	8	2	1	9	85	9.74		

La discrepancia observada entre los efectos in-vitro e in-vivo con algunos agentes antimicrobianos en el tratamiento de la shigelosis se conoce están fundamentalmente relacionados a su capacidad de absorción y a los niveles séricos intracelulares por ellos alcanzados, esto es especialmente cierto si se aspira que los mismos tengan efecto sobre bacterias como shigelas que en su mecanismo fundamental de patogenicidad exhiben la capacidad de invadir las células epiteliales, la lámina propia y hasta la sub-mucosa misma de la pared intestinal. Agentes no absorbibles como polimixina-B, colimicina ante los cuales las shigelas estudiadas se muestran uniformemente sensibles, y kanamicina (14%) y neomicina (14%), con porcentajes de resistencia moderados y estabilizados, no tienen cabida en el tratamiento actual de ésta infección. Tampoco la tienen otros aminoglicósidos como gentamicina y tobramicina para los cuales estas shigelas no registran desarrollo de resistencia hasta el presente. Estos adolecen, además de la ineficacia de absorción y por tanto la necesidad de utilizarlos por vía sistémica, de su ineffectividad clínica bien conocida en esta infección y de efectos colaterales indeseables.

De poca utilidad son otros agentes que tienen una capacidad de absorción limitada lo cual no les permite alcanzar niveles adecuados en los sitios mencionados, como lo son los nitrofuranos ante los cuales estas shigelas muestran in-vitro una sensibilidad del 100%. Su utilidad clínica parece no ser importante y además conocemos que pacientes tratados con ellos pueden estar eliminando shigelas hasta por 7 días e igualmente recidivas ocurren cuando es utilizado como agente terapéutico en ésta infección (11, 18). Las cefalosporinas para las cuales la resistencia alcanzada en estas cepas es de sólo el 6% tampoco tienen aplicación para el tratamiento de esta infección (19, 20), incluyendo entre ellas, aquellas que mejor se absorben como cefalexina. Su fracaso terapéutico en la shigelosis está relacionado a la relativamente elevada concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM) que en las shigelas es del orden de 5-10ugr/ml, ello a pesar de que la concentración sérica del antibiótico es dos veces superior a la CBM, no obstante, ésta concentración no le permite aún mostrarse efectiva para estas bacterias clínicamente ni bactericidamente cuando ésta es valorada en el laboratorio por el método de dilución del suero. En relación a cefalosporinas debe agregarse además, por lo

menos en lo que a nuestras shigelas respecta, que su resistencia por lo general aparece fenotípicamente y posiblemente genotípicamente ligada a ampicilina, al no observarse disociación de resistencia entre estos agentes y al estar muy probablemente mediada, de acuerdo a estudios genéticos que adelantamos en la actualidad, por los mismos genes de resistencia.

Tabla 9 - *Shigella sonnei*, 414 cepas (1968 - 1982). Patrones de resistencia

Tipo de patron	1968	1969	1970	1971	1972	1973	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982	Total	%	
St																1	0.24	
Su				3	1	1			2			1				8	1.93	
Te								1			2					3	0.72	
Su-St	1	1	5	8	10	9	19	24	21	12	3	12	4		2	131	31.64	
Su-Te				1	1											2	0.48	
Am-Cb												1					1	0.24
Su-St-Te				1	7	4	5	5	25	11	12	11	16	14	5	9	125	30.19
Su-St-Cm							3										3	0.72
Te-Am-Cb																	1	0.24
Su-St-Te-Cm	1	1					2	2	3							9	2.17	
Su-St-Kn-Nm					2	1		1	2							8	1.93	
Su-St-Am-Cb-Cr									1							1	0.24	
Su-St-Te-Am-Cb							1		1							3	0.72	
Su-St-Te-Kn-Nm								1	1	1	2	12	9	2	1	29	7.00	
Su-St-Cm-Kn-Nm							1	3								4	0.96	
Su-Ts-Cm-Am-Cb															1	1	0.24	
Su-St-Te-Am-Cb-Cr							1	1								2	0.48	
Su-St-Kn-Nm-Am-Cb								3	2							1	0.24	
Su-St-Te-Cm-Kn-Nm				3	3			1								8	1.93	
Su-St-Kn-Nm-Am-Cb-Cr									1							1	0.24	
Su-St-Te-Kn-Nm-Am-Cb							2	4	1	3	2	1	1	1		13	3.14	
Su-St-Te-Kn-Nm-Am-Cb-Cr									1	1	1	1				3	0.72	
Sensible	2		1	4	4	4	4	4	1	1	3	8	7	5	7	51	12.31	

La ampicilina en la década del 60 se convirtió en el antimicrobiano de elección para el tratamiento de la shigelosis, cuando numerosos estudios mostraron que era capaz de producir promoción en la mejoría clínica, apresurar la reversión de los cultivos e impedir recidivas (9, 12, 22). El antibiótico constituye también para nosotros hasta 1972, sin duda alguna el agente de escogencia para tratar nuestra shigelosis (22). Desde que Prieto & col. (24) en 1972 reportan resistencia para este antibiótico, al igual que lo muestran los resultados de este estudio, el uso de ampicilina parece ir perdiendo vigencia ante el incremento de shigelas resistentes, las cuales para 1982 han alcanzado una resistencia del orden del 10%, lo cual le permite aún ser de utilidad, pero que implica la necesidad forzosa de un estudio previo de sensibilidad y resistencia de la cepa infectante. En Estados Unidos y en Europa éste antibiótico ya no tiene cabida en el tratamiento de la shigelosis a consecuencia de los altos porcentajes de resistencia existentes, en los cuales en algunos reportes han sido hasta del 95%. Además, en muchos sitios se ha asistido a un crecimiento explosivo de esta resistencia. El desarrollo de resistencia observado se ha tratado de relacionar al intenso uso que en los últimos años y en la actualidad se le da a éste antimicrobiano (5, 7, 17, 21, 26, 30). Esto último es también una realidad en nuestro medio, por lo cual es de esperarse que los porcentajes de resistencia a este agente continúen en incremento y su disminución entre las diferentes especies de *Shigella* se intensifique, indicativo de lo cual pudiera ser el hecho de que estando originalmente presente en *S. flexneri* para 1972, aparezca en *S. sonnei* para 1973 y en *S. dysenteriae* para 1974, así como también los altos porcentajes de resistencia que para éste agente existen en salmonelas aisladas en la localidad (23).

En este estudio al igual que en otros (22, 25) no observamos segregación de resistencia entre ampicilina y carbenicilina, lo cual es debido probablemente a que es un mismo determinante el responsable de tal resistencia.

Tabla 10 - *Shigella*, niveles de resistencia en µgr/ml

Agente antimicrobiano	nº de cepas	1000	500	250	125	62.5	31.2
Sulfas	70	70					
Streptomicina	65	19	11	11	14	6	3
Tetraciclinas	66	3	5	27	20	6	7
Cloramfenicol	67	62				5	3
Kanamicina	43	43					
Ampicilina	180	140	25	13	2		
Carbenicilina	180	145	23	17			
Cefalosporinas	78				18	48	12

Alentador es la sensibilidad que actualmente muestran estas shigelas al ácido nalidíxico y a la combinación de antimicrobianos trimetoprim-sulfametoazole. Del ácido nalidíxico, para el cual estas shigelas se muestran uniformemente sensibles, conocemos que su eficacia en el tratamiento de ésta infección no es comparable al de ampicilina, ya que si bien produce curas bacteriológicas rápidas, ejerce poco efecto en el curso natural de la enfermedad y las recidivas son más frecuentes. Mayores probabilidades de éxito parece tener el ácido oxonílico, un derivado quinolínico similar en estructura y mecanismos de acción al ácido nalidíxico, como lo muestran los resultados de algunos estudios clínicos realizados (7, 13). No obstante, de ambos se conoce a través de su utilización en el tratamiento de infecciones urinarias, su tendencia a provocar el desarrollo de resistencia cromosomal, lo cual pudiera acontecer en shigelas si se le utiliza en el tratamiento de la shigelosis. Cepas de *Shigella* resistentes al ácido nalidíxico, en el orden del 19%, ya han sido reportadas(4).

Trimetoprim-sulfametoazole se muestra como una buena alternativa para el tratamiento de la shigelosis en nuestro medio ya que todas las 475 cepas estudiadas con éste agente muestran sensibilidad, ello unido a que en varios estudios clínicos se ha mostrado efectivo en el tratamiento de la infección (1, 17, 18, 21, 29). Su utilidad en nuestro medio sería especialmente en el tratamiento de las shigelosis causadas por cepas multirresistentes que incluyen la resistencia para ampicilina.

La presencia de niveles de resistencia clínicamente significantes y el alto porcentaje de resistencia múltiple presente en las shigelas estudiadas (84%) en las cuales predominan los patrones de resistencia para 2 y 3 agentes, pero pudiendo estar presentes patrones de resistencia complejos que comprometen 8 ó 9 agentes antimicrobianos, los cuales han hecho su aparición en las especies y serotipos de shigelas frecuentemente aisladas, son factores que colaboran a establecer dificultades en la escogencia de un antimicrobiano para el tratamiento de la shigelosis en nuestro medio. Al predominio del cepas multirresistentes, que en algunas cepas ya se ha tornado compleja, pudiera estar contribuyendo el uso indiscriminado al cual se somete intensamente a los agentes antimicrobianos en nuestro medio, tanto en el ambiente hospitalario como en la comunidad. La necesidad dual de que se establezcan disposiciones legales que conduzcan al uso racional de los antibióticos y el advenimiento de nuevos agentes antimicrobianos ó combinaciones de ellos son evidentes en Venezuela.

Referencias Bibliográficas

1. Anderson, E. & Threlfall, E. - The characterization of plasmids in the Enterobacteria. *J. Hyg. Camb.*, 72:471-487, 1974.
2. Bauer, A.; Kirby, W.; Sherris, J. & Turck, M. - Antibiotic susceptibility by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45:493-496, 1966.
3. Bauer, A. - Current status of antibiotic susceptibility testing with single high potency disk. *Am. S. Med. Technol.*, 32:97-102, 1968.
4. Contrioli, G.; Friedman, G. & Ficke, M. - Update of *Shigella gastroenteritis*: changing patterns of antibiotic resistance, 1964-1976. *Current Chemoter.*, 1:169-173, 1977.
5. Davies, J.; Farrant, W. & Uttley, A. - Antibiotic resistance of *Shigella sonnei*. *Lancet*, 2:1157-1159, 1970.
6. Finegold, S.; Martin, W. & Scott, E. - Determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents; assay of antimicrobial agents. In: Bayley & Scott's, eds.- *Diagnostic microbiology*. 5.ed. St. Louis, Mosby, p.385-410, 1978.
7. Gordon, R.; Thompson, T.; Carlson, W., Dyke, J. & Stevens, L. - Antimicrobial resistance of *Shigellae* isolated in Michigan. *Jama*, 231:1159-1165, 1975.

Tabla 11 - *Shigella*, 180 cepas. Niveles en µgr/ml

	µgr/ml	Nº de cepas	%
Ampicilina	10.000	4	2.22
	5.000	55	30.55
	2.500	35	19.44
	1.250	46	25.55
	625	25	13.88
	312	13	7.22
	156	2	1.11
Carbenicilina	10.000	11	6.11
	5.000	60	33.11
	2.500	45	25.00
	1.250	29	16.11
	625	23	12.77
	312	17	9.44
Cefalosporinas	125	18	10.00
	62.5	48	26.66
	31.2	12	6.66
	15.6	50	27.77
	7.8	26	14.44
	3.9	26	14.44

8. Haltalin, K.; Nelson, J.; Ring, R.; Sladoje, M. & Hinton, L. - Double blind treatment study of shigellosis. *J. Pediat.*, 70:970-981, 1967.
9. Haltalin, K.; Nelson, J.; Ring, R.; Sladoje, M. & Hinton, L. - Double blind treatment study of shigellosis comparing ampicillin, sulfadiazine and placebo. *J. Pediat.*, 71:970-976, 1967.
10. Haltalin, K.; Kusmiesz, H.; Hinton, L. & Nelson, J. - Treatment of acute diarrhea in outpatients. *Am. J. Dis. Child.*, 124:554-561, 1972.
11. Haltalin, K. & Nelson, J. - Failure of furazolidone therapy in shigellosis. *Am. J. Dis. Child.*, 123:40-45, 1972.
12. Haltalin, K.; Kusmiesz, H. & Nelson, J. - Double-blind treatment study of acute diarrhea in outpatients comparing ampicillin and placebo. *Am. J. Dis. Child.*, 124:554-560, 1972.
13. Haltalin, K.; Nelson, J. & Kusmiesz, H. - Comparative efficacy of nalidixic acid and ampicillin for severe shigellosis. *Archives Dis. Child.*, 48:305-312, 1973.
14. Hardy, A.; Burns, W. & Decapito, T. - Studies of acute diarrheal diseases X-A: cultural observations on efficacy of sulfonamides in *Shigella dysenteriae* infections. *Public Health Rep.*, 58:689-693, 1943.
15. Hardy, A. - Studies of acute diarrheal diseases X-C: further observations on relative efficacy of sulfonamides in *Shigella* infections. *Public Health Rep.*, 60:1037-1039, 1945.
16. Hardy, A. - Studies of acute diarrheal diseases: XVII - Sulfonamides in Shigellosis. *Public Health Rep.*, 61:857-859, 1946.
17. Hardy, A.; Masson, R. & Martin, G. - The antibiotics in acute bacillary dysentery. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 55:1070-1074, 1952.
18. Lexomboon, U.; Monswan, P.; Duangmani, C.; Panyasri, B. & M'cMinn, T. - Clinical evaluation of co-trimoxazole and furazolidone in treatment of Shigellosis in children. *Brit. Med. J.*, 3:23-26, 1972.
19. Nelson, J. & Haltalin, K. - In-vitro effectiveness of four cephalosporins against *Shigellae* and clinical ineffectiveness of cephaloglycin. *Chemother.*, 17:40-50, 1972.
20. Nelson, J.; Haltalin, K. - Comparative efficacy of cephalexin and ampicillin for shigellosis and other types of acute diarrhea in infants and children. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 7:415-420, 1975.
21. Nelson, J.; Kusmiesz, H.; Jackson, L. & Woodman, E. - Trimethoprim-sulfametoaxazole therapy for shigellosis. *Jama*, 235:237, 1976.
22. Prieto, G. - Estudio de la susceptibilidad de 58 cepas de *Shigella* a 13 agentes antimicrobianos: factores "R" como determinantes genéticos responsables de su resistencia múltiple. *Rev. Fac. Med. (Maracaibo)*, 3:170-192, 1970.
23. Prieto, G. - Contribución de la resistencia episomal (Factor R) a la multirresistencia de las salmonelas. *Rev. Fac. Med. (Maracaibo)*, 6:14-37, 1973.
24. Prieto, G.; Martinez, A.; Vargas, J. & Martinez, N. - Multirresistencia en *Shigella* mediada por factores "R" que incluyen el determinante de resistencia para ampicilina-carbenicilina. *Rev. Microbiol. (S.Paulo)*, 6:81-89, 1975.
25. Prieto, G.; Vargas, J.; Martinez, A. & Bracho, H. - Factores "R" que median resistencia para ampicilina-carbenicilina en *Citrobacter diversus*. *Rev. Microbiol. (S.Paulo)*, 8:117-122, 1977.
26. Rahaman, A.; Huq, I.; Dey, C.; Golam, A. & Curlin, G. - Ampicillin resistant *Shiga bacillus* in Bangladesh. *Lancet*, 406-407, 1974.
27. Rodriguez, W.; Khan, W.; Ross, S.; Controni, G. & Goldenberg, R. - Trimethoprim-sulfametoaxazole in Shigellosis. *Current Chemother.*, 1:172-175, 1977.
28. Ross, S.; Controni, G. & Khan, W. - Resistance of *Shigellae* to ampicillin and other antibiotics. *Jama*, 221:45-47, 1972.
29. Ross, S.; Controni, G. & Khan, W. - Resistance of *Shigellae* to ampicillin and other antibiotics. *J. Am. Med. Ass.*, 221-223, 1972.
30. Torrence, M.; Owens, M. & Cho, C. - Ampicillin-resistant *Shigella*. *Jama*, 226:1359-1341, 1973.
31. Weisman, J.; Gangarosa, E. & Dupont, H. - Changing needs in the antimicrobial therapy of Shigellosis. *J. Infect. Dis.*, 127:611-613, 1973.

DERMATOSE POR CANDIDA ALBICANS EM CÃO

Elizabeth Oliveira da Costa
 Selene Dall'Acqua Coutinho
 Cláudio Mello Teixeira

Deptº de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal
 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnica USP
 Cidade Universitária
 05340 São Paulo SP, Brasil

& Paulo Cantagalo

Clinica Veterinária
 Rua Elizeu de Almeida, 50
 05533 São Paulo SP, Brasil

Resumo

Candidiase cutânea, em cadela mestiça Weimaraner de 4 anos de idade, com lesões úmidas e pruriginosas, zonas de hiperqueratose e alopecia, localizadas na região occipital e extremidade dorsal do membro anterior esquerdo. O exame do material revelou a presença de grande quantidade de células leveduriformes, não se observando filamentos, o cultivo resultou em *Candida albicans*.

Summary

Canine dermatosis by Candida albicans

A case of cutaneous candidiasis in a 4-year-old female Weimaraner, which presented alopecia, hiperkeratose and pruriginous skin lesion localized on the occipital area and dorsal surface of the extremity of the left anterior limb. Many small oval thin walled yeasts, with multiple buds, were observed under the microscope from preparations treated with potassium hydroxide. Pure cultures were obtained from skin scrapings and characterized as *Candida albicans*. Candidiasis in dog are mainly associated with otitis and mucosal membrane infections ("thrush"). Candidial skin infections in dog are rare. This seemed to be the first description in our country.

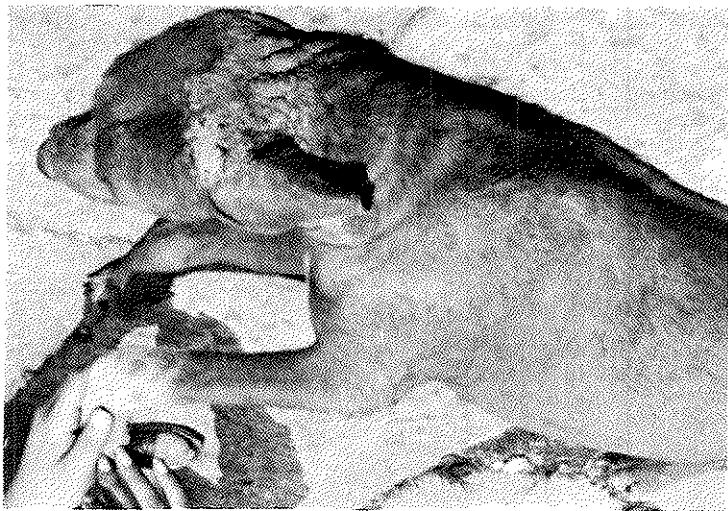
Introdução

A forma cutânea da candidiase na espécie canina, é rara no mundo (9). Foram assinaladas no exterior infecções causadas por *C. albicans* (1, 5) e *C. parapsilosis* (2). Em outras espécies animais são poucas as referências de candidiase cutânea, tendo sido descrita em suínos (11), em castor (12) e golfinhos (10).

No Brasil, o isolamento de leveduras do gênero *Candida*, de animais da espécie canina, foi relatado por Moreno & col. (8), em 1973 em levantamento microbiológico de flora vaginal e por Feigl & col. (3), em 1981, em estudo da etiologia das otites externas, não tendo sido descrita a forma cutânea nesta espécie animal.

O objetivo é relatar o caso de uma cadela mestiça Weimaraner, de 4 anos de idade, com lesões úmidas e pruriginosas, zonas de hiperqueratose e alopecia em região occipital e extremidade dorsal do membro anterior esquerdo (Figura 1).

Figura 1 - Cadela mestiça Weimaraner com lesões devido a *Candida albicans* na região occipital e extremidade dorsal do membro anterior esquerdo



O presente caso apresentava 1 ano e meio de evolução, tendo o início das lesões coincidido com a prenhez. Havendo registro de várias tentativas de tratamento mal sucedidas.

Material e Métodos

O material obtido pelo raspado superficial da lesão, pelos e escamas de pele, foi submetido ao exame direto com hidróxido de potássio a 30%, através do qual observou-se grande quantidade de células leveduriformes, não tendo sido visualizado filamentos.

O material foi semeado em ágar sabouraud dextrose (Difco), mantido à temperatura ambiente e 37°C, por 72 horas. O exame microscópico das colônias obtido foi realizado pela técnica de gram.

A identificação da levedura foi feita através das provas de assimilação de açúcares (auxanograma), produção de urease, formação de tubo germinativo e filamentação, segundo Lodder (6).

Resultados e Discussão

Observou-se crescimento de colônias brancas, cremosas e lisas, tendo o exame microscópico evidenciado células esféricas e/ou ovais, Gram positivas, com brotamento múltiplo.

A assimilação de açúcares revelou tratar-se de levedura dextrose positiva; galactose positiva; maltose negativa; lactose negativa; rafinose negativa; cellobiose positiva. Não produziu urease; houve formação de tubo germinativo em 3 horas, em soro equino estéril (Figura 2), e produção de clamídósporo, blastósporo e pseudomicélio (Figura 3) em ágar clamídósporo (Difco).

Os casos de candidíase normalmente estão associados à queda geral de resistência, devido a deficiências nutricionais ou outros estados debilitantes, gestação e tratamentos prolongados com antibióticos (4). No presente caso, o inicio das lesões coincide com a gestação do animal.

Durante a evolução do quadro, antes de diagnosticada a candidíase, o animal fora submetido a diversos tratamentos: triclorfon (Nevugon, Bayer; Selsun; Staficilin N, Bristol) a 50% em álcool e banhos com sulfeto de selênio, oxacilina e permanganato de potássio.

Figura 2 - Formação de tubo germinativo em 3 horas a 37°C em soro equino estéril. Amostra de *Candida* isolada de cadela mestiça Weimaraner (Microfotografia 10 x 40)

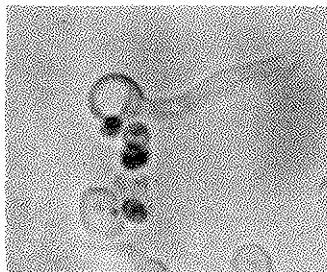
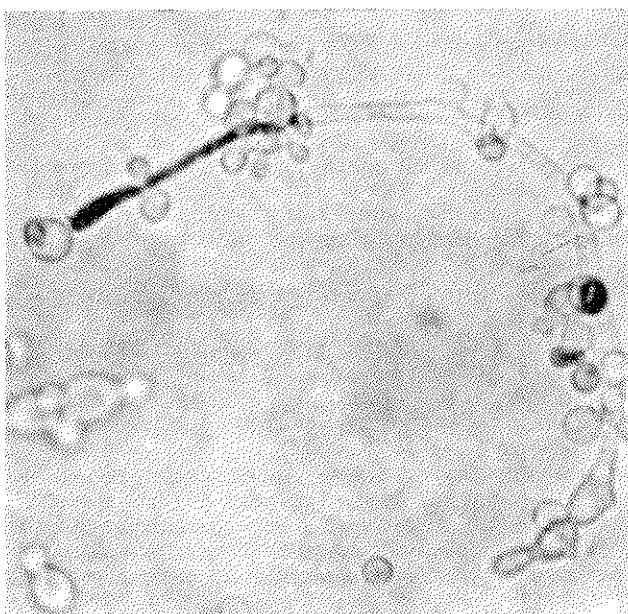


Figura 3 - Produção de clamidósporos, blastósporos e pseudomicélio em ágar clamidósporo (Difco) pela amostra de *Candida* isolada de cadela Weimaraner (Microfotografia 10 x 40)



As lesões observadas, descritas anteriormente, estão de acordo com Kral & Uscavage (5), tanto na localização quanto na caracterização. Estes autores relatam em cadela boxer de 7 anos, lesões iniciais no pescoço e patas dianteiras, que posteriormente alastraram-se para o dorso e patas traseiras. As lesões apresentaram-se crostosas, rugosas e com hiperqueratose.

Na descrição de Kral & Uscavage (5), as lesões de pele apareceram após tratamento prolongado com antibióticos, devido a problema respiratório. Isolou-se, do raspado de pele, *C. albicans* e o tratamento foi realizado à base de nistatina uso tópico e sistêmico. As lesões regrediram, porém a pele continuou espessa e com alopecia, tendo o proprietário optado pelo sacrifício. À necropsia, diagnosticou-se dermatite granulomatosa e enterite crônica.

No caso descrito por Dale (2), em 1972, em pastor alemão de 5 anos e meio de idade, as lesões caracterizavam-se por alopecia, hiperemia e ulcerações. A lesão inicial localizava-se na base da cauda, observando-se progressão após tratamento com corticosteróides e antissépticos. Devido ao insucesso, fez-se cultura do raspado de pele, tendo sido isolado *Staphylococcus aureus*, instituindo-se então tratamento com tetraciclinas. As lesões da cauda persistiram e nova lesão apareceu na região do esterno, isolando-se *Candida parapsilosis*. Tratado com nistatina houve regressão das lesões em 15 dias.

O tratamento da candidíase na cadela mestiça Weimaraner constou de violeta geniana a 2%, uso tópico, 4 vezes ao dia, até uma semana após a regressão das lesões, pois sabe-se que este medicamento tem ação sobre as várias espécies de *Candida*; nistatina (Micostatin, Squibb), um comprimido ao dia durante um mês e meio, pois apesar de nada ter sido observado na mucosa oral, as lesões de pele eram antigas e o animal ao coçar-se por lambadura poderia apresentar em outras mucosas do tubo digestivo; levamizole (Ascardil infantil Johnson & Johnson) 80mg, 2 vezes por semana, durante 3 meses, como imunomodulador, uma vez que a ocorrência de candidíase está associada a estados em que há comprometimento da resposta imune do hospedeiro. Após 2 a 3 dias do início da medicação, notou-se regressão parcial das lesões, observando-se cura completa em 15 dias.

Nos trabalhos citados, assim como nesta descrição de candidiase cutânea, observa-se a incidência da moléstia após tratamento com antibióticos, uma vez que, como é sabido, *Candida* utiliza-os como fonte de nitrogênio e/ou carbono (7).

Diante do exposto, deve-se salientar a importância de um diagnóstico correto e consequentemente um tratamento eficaz. O clínico deve ser alertado sobre a ocorrência de candidiase cutânea em cães, para que um diagnóstico e tratamento inadequados não resultem em agravamento do quadro.

Agradecimentos

Às médicas veterinárias Vânia M. Carvalho e Ligia F. Lopes.

Referências Bibliográficas

1. Carr, S.H. - Dermatological fungal infections in the dog. *Canine Practice*, 7:45-48, 1980.
2. Dale, J.E. - Canine dermatosis caused by *Candida parapsilosis*. *Vet. Med. & Small Animal Clinician*, 67:548-549, 1972.
3. Feigl, M.H.; Mós, E. do N.; Larsson, C.E. & Santos, M.A.A. - Estudo microbiológico das otites externas em cães. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 12:88-91, 1981.
4. Jungermann, P.F. & Schwartzmann, R.M. - *Veterinary medical mycology*. Philadelphia, Lea & Febiger, 1972.
5. Kral, F. & Uscavage, J.P. - Cutaneous candidiasis in a dog. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 136:612-615, 1960.
6. Lodder, J.F. - *The yeasts: a taxonomic study*. Amsterdam, North Publishing, 1971.
7. Mehnert, B.; Ernst, K. & Gedek, W. - Hefen als Mastitiserreger beim Rind. *Zenibl. Vet. Med.* 11a:92-97, 1964.
8. Moreno, G.; Bicudo, P.L. & Lopes, C.A.M. - Aspectos bacteriológicos da flora vaginal em cadelas. *Arg. Inst. Biológico*, 40:59-62, 1973.
9. Mueller, G.H. & Kirk, R.W. - *Small animal dermatology*. 2.ed. Philadelphia, W.B. Saunders, p.308, 1976.
10. Nakkeeb, S.; Targowski, S.P. & Spotte, S. - Chronic cutaneous candidiasis in bottle-nosed dolphins. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 171:961-965, 1977.
11. Reynolds, I.M.; Miner, P.W. & Smith, R.E. - Cutaneous candidiasis in swine. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 152:182-186, 1968.
12. Saez, H. - Candidiase cutanée chez un castor d'Europe, *Castor fiber*: aspect épidémiologique et forme parasitaire de *Candida albicans*. *Acta Zoologica et Pathologica Antuerpiensia*, 66:101-110, 1976.

ENCEPHALOMYOCARDITIS VIRUS (EMCV) IN SWINE IN THE STATE OF RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL*

Paulo Michel Roehe
Norma Centeno Rodrigues
Sérgio José de Oliveira
Idalino Innocente Guizzardi
David Emilio Santos Neves de Barcellos
Telmo Vidor
Liliane Guimarães Oliveira
& Eliane Villamil Bangel

Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor"
Caixa Postal 2076
90000 Porto Alegre RS, Brasil

Summary

Mortality was observed in 9 piglets out of a litter of 10 in a farm in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. The disease occurred throughout a period of 15 days, affecting animals about 30 days old, with sudden deaths and no previous clinical signs. Piglets from other litters remained healthy. Samples collected from dead piglets yielded the growth of a virus, further characterized as Encephalomyocarditis Virus (EMCV) by neutralization index tests. Histopathological examinations revealed lesions compatible with EMCV infection.

Resumo

Encefalomielite suína no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil

Foi observada mortalidade em nove leitões de uma leitegada de dez em uma granja no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. A enfermidade se estendeu por um período de 15 dias, afetando animais em torno de 30 dias de idade, com morte súbita, sem prévios sinais clínicos evidentes. Leitões de outras leitegadas permaneceram saudáveis. Material coletado de leitões mortos pela doença permitiram o isolamento de um vírus, posteriormente caracterizado como Vírus da Encefalomielite (VEMC) por testes de índice de neutralização. Exames histopatológicos revelaram lesões compatíveis com a enfermidade provocada pelo VEMC.

Introduction

Encephalomyocarditis Virus (EMCV) belongs to the family *Picornaviridae*, genus *Cardiovirus*. Rats and mice are considered natural reservoirs of the virus, where infection is produced with or without evident clinical signs (2, 3). The virus can infect various other species, including man (3).

* Trabalho apresentado no III Congresso Brasileiro de Suinocultura, Curitiba PR, 21 a 23 de Novembro de 1983.

EMCV was first identified as cause of disease in pigs in Panama in 1958 (6). Outbreaks of the disease were further detected in Florida (4) and in Australia (1) where high mortality rates were observed. Sangar & col. (7) found that 29 out of 60 healthy swine from different countries in Britain had detectable levels of antibodies against EMCV.

The mechanism by which swine are infected is not perfectly understood, but water and feed contamination with rat or mice excreta are regarded as important. Disease in swine had been frequently associated with an increase in rodent population in the affected farms (2).

The age of most affected animals ranges from 5 to 20 weeks with variable morbidity (2-50%). Mortality rates approach 100% (2). In most cases affected animals show no noticeable clinical sign. Sudden death due to heart failure is the prominent feature. Occasionally, signs as depression, inappetence, trembling, paralysis, vomiting or dyspnoea can be observed.

There is no data on infection in pigs by EMCV in Brazil.

The present paper describes the laboratory isolation and identification of EMCV from an outbreak of encephalomyocarditis in swine in the state of Rio Grande do Sul.

Material and Methods

Specimens for laboratory diagnosis - From a farm from the Alto Taquari Valley region, Rio Grande do Sul, two 4 week old piglets were received in the laboratory, one dead and another still alive. The pigs were necropsied and fragments of viscera were collected for bacteriological, histological and virological examinations.

Bacteriological examinations - Blood-agar and MacConkey plates were seeded with samples collected from liver, intestines, lungs and brain of the two pigs. The plates were kept for two days at 37°C, and the results recorded.

Histological examination - Fragments of myocardium and liver were fixed in 10% formalin solution, embedded in paraffin, sectioned in 5 μ cuts and stained by Hematoxylin-Eosin (HE).

Virological examination - Fragments of cerebrum and myocardium of each pig were grinded and diluted to approximately 10% in Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.2.. The suspensions were clarified by low speed centrifugation (1000 x G) and inoculated into groups of 6 suckling mice 8 days old, 0.5ml intraperitoneally (ID). Another group of ten 21 days old mice were inoculated with 0,03ml intracerebrally (IC).

BHK - 21 cells were seeded in tubes at concentration of $2,5 \times 10^5$ cells per ml in Eagle's Minimal Essential Medium (E-MEM) supplemented with 10% bovine fetal serum (growth medium). After the monolayers have been formed, the growth medium was discarded and replaced by E-MEM without serum (maintenance medium).

To each of four tubes, 0.2ml of the respective inoculum were added and the tubes were incubated at 37°C till any sign of cytopathic effect (CPE) was observed. Control tubes were inoculated with suspensions prepared from cerebra and myocardia of uninfected mice. Cell control tubes were kept uninoculated throughout the observation period. Tubes showing extensive CPE were frozen and thawed three times, centrifuged at 1000 x G and the supernatant kept at -20°C till used on virus neutralization index tests.

Antisera - Anti-EMCV serum was prepared in 4 week old mice as follows: antigen was prepared with a standard strain of EMCV (kindly supplied by Dr. R.R. Golgher, Laboratório de Vírus do Instituto de Biologia, Universidade Federal de Minas Gerais), grown in VERO cells. The virus was inactivated with Betapropiolactone (BPL) at a final concentration of 1:2000 in the tissue culture supernatant. Antigen was emulsified 40:60 in nine parts of Marcol 52 (Exxon Co. Houston, Texas, USA)

plus one part of Mintanide 80 (Mannide Monoleate, SEPPIC, Paris, France). Mice were given three intramuscular injections of 0.5ml with two week intervals. Sera were collected two weeks after the last inoculation, and EMCV-neutralization tests carried out. The antiserum obtained (Titre 1:316) was used for neutralization-index tests with the field isolate.

Neutralization index tests - Virus neutralization index tests were carried out as follows: anti-EMCV serum was diluted 1:10 in E-MEM and mixed with equal volumes of tenfold dilutions (10^{-1} to 10^{-4}) of the suspect viral isolates obtained from both pigs in cell culture, as described above. Control virus titration was prepared by mixing equal volumes of the viral isolates in tenfold dilutions with 10% normal serum mixtures were incubated at 37°C for 60 min. Four tubes of BHK - 21 monolayers were infected with 0.2ml of each dilution of the mixtures and incubated at 37°C for four days. Tubes where CPE was observed, were recorded and the endpoints calculated by the method of Spearman (8) and Karber (5).

Results

Clinical examination - From a litter of the ten piglets, 9 died in a 15 days interval, with sudden deaths and no other noticeable clinical signs.

Anatomopathology - Cardiac hypertrophy with the presence of multiple whitish patches in the myocardium, 1 to 4mm in diameter, with considerable deepness, extending up to the endocardium, were observed. In one of the piglets collections of fibrin were seen in the abdominal cavity.

Bacteriological examinations - Bacteriological examinations revealed no growth of pathogenic bacteria.

Histopathological examinations - Histological exams showed necrotic areas in the heart, with mononuclear cell infiltration. In the liver, various degrees of degeneration and centrolobular necrosis, vacuolization of hepatocytes and intense hepatic cords congestion.

Virological examination - All the mice died 24-72 hours after IP and IC inoculation. In three further passages in suckling mice, the animals died 24-48 hours after IP inoculation. Suckling mice inoculated IC showed lethargy, intense dehydration and incoordination, followed by death around 48 hours post-infection (PI).

The infected cells cultures showed extensive CPE around 48 hours PI, characterized by rounding up and the lysis of the cells.

Neutralization index tests - The titre obtained in the virus plus anti-EMCV serum mixture was 10^2 50% Tissue Culture Infective Doses (TCID₅₀). The titre obtained in the virus-normal serum mixture was $10^{4.5}$. The difference obtained (2.5 logs) was considered indicative of homology.

Discussion

EMCV has been isolated in different countries, causing disease in swine and other species, with variable morbidity and mortality (2, 4, 6). Serological findings evidenced that swine can be infected with little or no noticeable clinical signs (2, 3, 6). The presence or absence of clinical signs have been attributed to variations in virulence from EMCV strains (2, 6). However, EMCV may be ubiquitous in pig populations, being clinically affected those animals that are put under conditions of stress, or those that have not yet had time to build up their immunity against the virus, such as litters from uninfected mothers or mothers with low levels of protection.

The EMCV isolate here described caused death in 9 piglets out of a litter of 10, whereas all the other litters in the farm remained healthy. It might be due to absence of contamination of the litters or to well established immunity provided to the litters by their sows. Such explanations are, however, merely speculative. It was not possible to determine whether the observed incidence of the disease was due to the pathogenicity of the strain or to other factors such as those mentioned above. An evaluation of the serological status of the mothers within the affected herd should be carried out in an attempt to check this possibility.

Complementary studies have shown that this field isolate has no haemagglutinating activity, and is highly pathogenic for mice, but the pathogenicity for pigs has not yet been fully evaluated. Such properties are reported as variable among different strains (2, 7), and will be appropriately characterized by us. Histopathological, virological and necropsy findings are in accordance with previous reports (1, 2). However, calcification was not observed in the necrotic patches of myocardium, whereas in the liver no eosinophilic substance was found in the vacuoles of the hepatocytes.

Regarding the control of outbreak, we suggested measures aiming rat control in the farm. Since then, no other outbreak has been notified, as well as no other clinical evidence of the disease has been found in the herd region.

A serological survey will be carried out to evaluate the level of EMCV infection in samples from that and other areas where there is intense pig farming in the State, aiming to a better understanding of EMCV biology and to assist programmes of pig disease control if eventually necessary.

Acknowledgements

The authors wish to thank to Dr. R.R. Golgher for the supplance of the EMCV used throughout this study. Thanks also to Mrs. B.R. Lorenzoni for the translation and typing work. This research was supported by the State Government of Rio Grande do Sul, Brazil.

References

1. Acland, H.M. & Littlejohns, I.R. - Encephalomyocarditis: virus infection of pigs. 1 - An outbreak in New South Wales. *Aust. Vet. J.*, 51:409-415, 1975.
2. Acland, H.M. & Littlejohns, I.R. - Encephalomyocarditis. In: - Leman, A.D.; Glock, R.D.; Mengeling, W.L.; Penny, R.H.C.; School, E. & Straw, B., eds. - Diseases of swine. 5.ed. Ames, Iowa, Iowa University Press, p.339-343, 1981.
3. Andrewes, C.H.; Pereira, H.G. & Wildy, P. - Picornaviridae. In: - Andrewes, C.; Pereira, H.G.; Wildy, P. eds. - Viruses of vertebrates. Londres, Bailliere Tindall, p.1-37, 1978.
4. Gainer, J.H.; Sandefur, J.R. & Bigler, W.J. - High mortality in Florida swine herd infected with the encephalomyocarditis virus: an accompanying epizootiologic survey. *Cornell Vet.*, 58:31-47, 1968.
5. Karber, G. - Beitrag zur Kollektiven Behandlung Pharmacologisher Reihenversuche. *Arch. Exp. Path. Pharmak.*, 62:480-483, 1931.
6. Murname, T.G.; Craighead, J.E.; Mondragon, H. & Shelokov, A. - Fatal disease of swine due to encephalomyocarditis virus. *Science*, 131:498-499, 1960.
7. Sangard, D.V.; Rowlands, D.J. & Brown, F. - Encephalomyocarditis virus antibodies in sera from apparently normal pigs. *The Vet. Rec.*, 100:240-241, 1977.
8. Spearman, C. - The method of right and wrong cases (constant stimuli) with Gauss' formulae. *Brit. J. Psychol.*, 2:227-242.
9. Spradbrow, P.B. & Chung, Y.S. - Haemagglutination-inhibition antibodies to encephalomyocarditis virus in Queensland cattle. *Aust. Vet. J.*, 46:126-128, 1970.

TOXICIDADE DE ISOLADOS DE DIPLODIA MAYDIS (BERK) SACC. E POSSÍVEIS TOXINAS

Jocelém Mastrodi Salgado
Luiz Carlos Basso

Deptº de Química ESALQ/USP
Caixa Postal 9
13400 Piracicaba SP, Brasil

& Celso Rubens Vieira e Silva

Centro de Patologia Clínica
Caixa Postal 348
13400 Piracicaba SP, Brasil

Resumo

Isolados de *Diplodia maydis*, obtidos de milho, apresentaram diversos graus de nefrotoxidez, para ratos. Tal toxidez mostrou estreita relação com seis compostos fluorescentes, com diferentes Rfs, especialmente o composto com Rf 0.31, cujo comportamento foi muito semelhante à diplodia toxina. Foram feitas análises anátomo-patológicas, hematológicas e determinação do ganho ou perda de peso.

Summary

Toxicity of *Diplodia maydis* isolates

Characterization of the toxicity of substances produced by isolates of *Diplodia maydis*, by determining the gain or loss on weight of the animals, by anatomic, pathological and hematological exams and by chromatographic analysis of the toxin produced. The isolates of *Diplodia maydis* tested in rats showed different degrees of nephrotoxicity. Six compounds with Rf of 0.23; 0.31; 0.40; 0.46; 0.49 and 0.56 were detected. The compound with Rf 0.31 showed a good relationship between levels and degrees of nephrotoxicity.

Introdução

Diplodia maydis, além de causar a podridão branca da espiga, também é o agente causal de uma podridão do colmo e da morte das plantas jovens (2). É um patógeno de importância econômica mundial, na produção de milho. Na África, é responsável por surtos de uma micotoxicose, em gado e carneiro, conhecida como diplodiose (5, 13). Poucos relatos de toxidez aguda, para animais de laboratório, têm sido mencionados.

No estudo da toxidez de *Diplodia maydis*, para animais de laboratório (6), através de exame histopatológico, foi observada a ocorrência de miocardites tóxicas, entérites, necrose tubular renal, degeneração e necrose periférica das ilhotas de Langerhans, e uma congestão venosa generalizada, em ratos que consumam milho mofado por *D. maydis*.

2. Dickson, J.G. - Diseases of field crops. 2.ed. New York, McGraw Hill, 1956.
3. Eppley, R.M. - Screening method for zearalenone, aflatoxin and ochratoxin. J. A.O.A.C., 51:74-78, 1968.
4. Marasas, W.F.O. & Rensburg van, J. - In: - Horsfall, J.G. & Colling, E.B., eds. - Plant disease in advance treatise. New York, Academic Press, vol.4, p.357-379, 1979.
5. Mitchell, D.T. - Poisoning of cattle by *Diplodia* infected maize. S. Afr. J. Sci., 16:446-452, 1919.
6. Rabie, C.J.; Rensburg van, S.J.; Kried, N.P.J. & Lubben, A. - Toxicity of *Diplodia maydis* to laboratory animals. Appl. Environ. Microbiol., 34:111-114, 1977.
7. Robbins, S.L. - Pathologic basis of disease. Philadelphia, W.B. Saunders, vol.24, 1974.
8. Rodricks, J.V.; Hesseltine, C.W. & Mehlman, M.A. - Mycotoxins in human and animal health. Illinois, Pathotox Publ., Park Forest South, 1977.
9. Roger, L. - Phytopathologie des pays chauds. Paris, Le Chevalier, 1953.
10. Salgado, J.M. - Levantamento de fungos toxicogênicos associados a cereais e seus subprodutos através de ensaio biológico com ratos albinos. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP, 1979.
11. Sharda, D.P.; Wilson, R.F.; Williams, L.E. & Swiger, L.A. - Effect of feeding corn inoculated with *Diplodia zeae* in laboratory animal. J. Anim. Sci., 34:225-229, 1972.
12. Steyn, P.S.; Wessels, P.L. & Holzapfel, C.W. - The isolation and structure of a toxic metabolit from *Diplodia maydis* (Berk) Sacc. Tetrahedron, 28:4775-4785, 1972.
13. Theiler, A. - Die Diplodiosis der rinder und schafe in Süd-Africa. Dtsch. Tierärzt Wochenschr, 45:395-399, 1927.
14. Wyllie, T.D. & Morehouse, L.G. - Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses: an encyclopedic hand-book. New York, Dekker, vol.1, 1977.
15. Willie, T.D. & Morehouse, L.G. - Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses: an encyclopedic hand-book. New York, Dekker, vol.2, 1978.

ATIVIDADE DA INULINASE EM LEVEDURAS E FERMENTAÇÕES DE EXTRATOS DE *HELIANTHUS TUBEROSUS* L.

Sérgio Echeverrigaray
 & Flávio C.A. Tavares

Deptº de Genética ESALQ
 Caixa Postal 83
 13400 Piracicaba SP, Brasil

Resumo

Devido às concentrações de inulina em *H. tuberosus*, leveduras com boa produção de inulinase e alto potencial fermentativo são imprescindíveis na viabilização industrial deste vegetal. Selecionando-se leveduras com estas propriedades, dentre 21 espécies avaliadas, encontram-se 11 linhagens com boa capacidade fermentativa. As leveduras com maior rendimento de produção de álcool foram *Kluyveromyces marxianus*, *K. fragilis*, *Candida pseudotropicalis* e *Torulopsis coelliculosa*. Em fermentações sucessivas conduzidas a 30°C, com 15,6% de ART e por 48 horas, chegou-se a obter o rendimento médio de 85% em relação ao teórico. Nestas condições, após 10 horas de fermentação encontraram-se rendimentos de 74,4% e uma taxa de fermentação de $5,9\text{g/l/h}^{-1}$. A atividade máxima da inulinase foi de $3,6\mu\text{M}$ (equivalente frutose)/ml/min e verificou-se ocorrer repressão catabólica da inulinase por frutose em *K. marxianus* e *K. fragilis*. Com estes resultados conclui-se ser viável a fermentação de extratos sem prévia hidrólise, o que facilitará o processamento industrial de extratos de *H. tuberosus*.

Summary

Inulinase activity in yeasts and direct fermentation of H. tuberosus extracts

The high concentration of inulin in *H. tuberosus* requires yeasts with good inulinase activity and fermentation yields for the industrial use of this plant. Selecting yeasts with such properties among 21 species, 11 strains were found with superior fermentation abilities. The highest fermentation yields were observed for *Kluyveromyces marxianus*, *K. fragilis*, *Candida pseudotropicalis* and *Torulopsis coelliculosa*. After successive fermentation mean yield values reached 85% from the theoretical in fermentation conducted at 30°C, with 15.6% of total reducing sugars and 48 hours. After 10 hours, under such conditions, yields of 75.4% were obtained with a volumetric rate of 5.9g/l/h^{-1} . The maximum inulinase activity found was $3.6\mu\text{M}$ (fructose equivalent)/ml/min and inulinase catabolic repression by fructose was detected in both *Kluyveromyces* yeasts. The results supports the possibility to conduct fermentation without previous hydrolysis which will ease the industrial processing of *H. tuberosus* extracts.

Introdução

A alta concentração de inulina e a elevada produtividade agrícola que se pode obter com *H. tuberosus* (tupinambor ou Jerusalém Artichoke), tornam este vegetal capaz de complementar, satisfatoriamente, a produção de álcool, a partir da cana-de-açúcar, ampliando-se o período de safra e mediante o aproveitamento de novas áreas em regiões, onde não é possível cultivar a cana. O aproveitamento da inulina, um polímero de frutose, apresenta outras possibilidades industriais como a produção de xaropes de frutose.

O uso de *H. tuberosus*, em processos envolvendo hidrólise ácida a temperaturas elevadas e fermentação para a produção de álcool, já foi feito industrialmente (3). Várias leveduras apresentam as propriedades de assimilação da inulina e, algumas delas, também de fermentação (1, 7, 11). As leveduras *Kluyveromyces marxianus*, *K. fragilis* e *Torulopsis coeliculosa* são as que mais se destacam (7, 8).

Como as características de alta atividade de inulinase e as propriedades fermentativas são fundamentais para a utilização industrial de *H. tuberosus*, iniciou-se um programa de melhoramento, onde, em etapa preliminar, se procedeu à avaliação de leveduras quanto às características de interesse industrial, para a produção de álcool e, também, quanto à produção da enzima inulinase e de biomassa, caracteres considerados importantes para um processo de produção de xaropes de frutose.

Tabela 1 - Avaliação da produção de etanol em extratos brutos de *H. tuberosus* com espécies selecionadas (ART = 15,59; tempo: 48 horas; temperatura: 30°C). Dados médios de 3 repetições

Linhagens	Etanol (g/L)				Rendimento %
	I	II	III	X	
Fleischmann (S.c.)	6.23	6.47	6.81	6.50	64.4
ADCC 24858 (S.c.)	7.19	7.37	7.51	7.36	72.9
IZ 610 (K.f.)	7.49	8.09	8.09	7.89	78.2
IZ 275 (K.f.)	6.90	7.51	7.94	7.45	73.8
IZ 429 (K.f.)	7.65	7.98	8.28	7.97	79.0
IZ 1339 (K.m)	8.04	8.67	8.76	8.49	84.1
IZ 619 (K.m)	8.23	8.61	8.53	8.46	83.8
IZ 1821 (K.m)	8.14	8.77	8.81	8.57	84.9
IZ 148 (K.m)	7.23	7.89	8.28	7.80	77.3
IZ 431 (C.p.)	8.23	8.67	8.77	8.56	84.8
IZ 1970 (T.c.)	7.85	7.70	7.19	7.85	75.1
IZ 1966 (T.c.)	7.33	7.37	7.56	7.42	73.5

Figura 1 - Avaliação de leveduras para fermentação alcoólica de extratos de *H. tuberosus* L. (24 horas - ART: 14,00%)

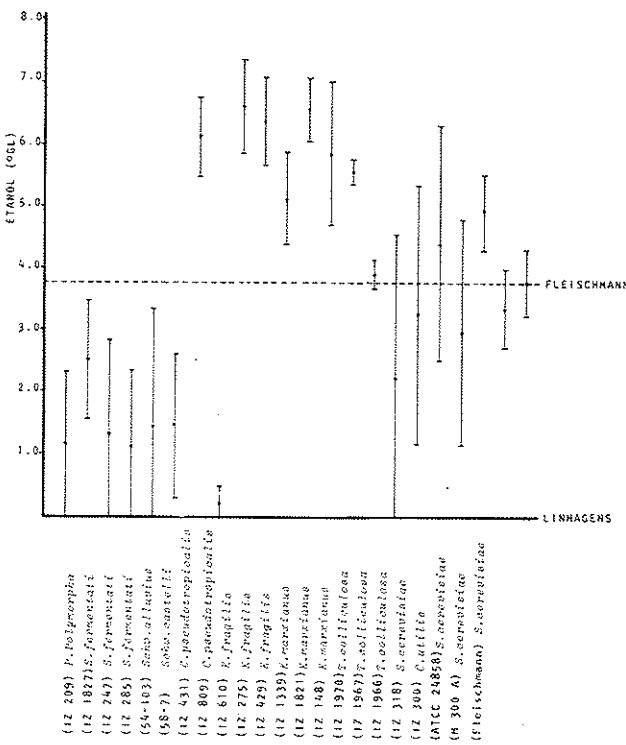
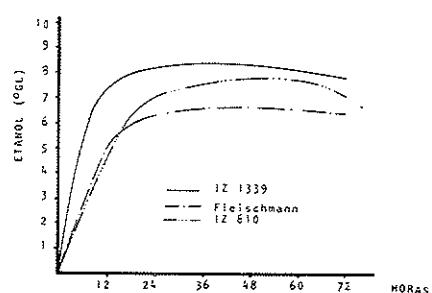


Figura 2 - Cinética da fermentação alcoólica de extratos de *H. tuberosus* L. com ART inicial de 15,59% e inóculo de 10% de matéria fresca (*K. marxianus* (IZ1339); *K. fragilis* (IZ 610); *S. cerevisiae* (Fleischmann))



Material e Métodos

As leveduras avaliadas foram cedidas pelo Departamento de Tecnologia Rural da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", por H. Phaff da Universidade da Califórnia-Davis, e adquiridas do American Type Culture Collection, USA.

A avaliação do crescimento de leveduras foi efetuada em meio sintético com inulina (Difco) 1%, Yeast Nitrogen Base 0,67%, ágar 2% e pH 6,8.

Para fins de obtenção de extratos brutos de inulina, a farinha de tubérculos de *H. tuberosus* foi cedida pelo Prof. J.O.B. Carioca, do Núcleo de Fontes Não Convencionais de Energia, UFCE.

O preparo dos extratos foi feito de duas maneiras. A farinha de *H. tuberosus*, na quantidade de 650g/litro em água, foi prensada de modo a se obter um extrato com 14,08% de açúcares redutores totais. No preparo de meios, com este extrato, acrescentou-se 1% da solução de sais (sulfato de amônio 5%, fosfato monobásico de potássio 2%, sulfato de magnésio 1%, sulfato de zinco 0,1% e sulfato de manganês 0,1%), ajustado o pH a 3,7 e usado sem esterilização. No segundo método de preparação de extratos, para fins de ensaios de cinética da fermentação e comparação entre espécies de leveduras, utilizou-se 390g/l de farinha, aquecendo-se a 80°C e pH 8,0, por 10 minutos, seguindo-se de prensagem e filtração. Foi acrescentado, a este extrato, 1% da solução de sais e autoclavou-se a meia atmosfera, por 30 minutos, após o que se ajustou a pH 4,0.

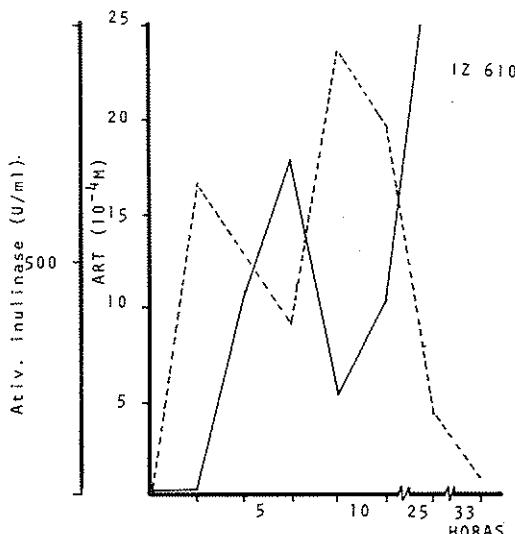
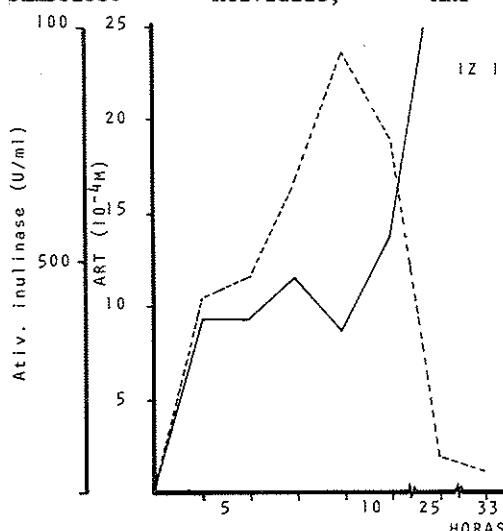
Para avaliação da inulinase extracelular, utilizou-se o meio com inulina (Difco) 1%, peptona (Difco) 2% e extrato de leveduras (Difco) 1%. A atividade da inulinase extracelular foi avaliada no meio de cultivo, determinando-se os açúcares redutores liberados, após 10 min., a 40°C, na presença de inulina.

O etanol foi determinado por cromatografia gasosa (cromatógrafo GG 37D, coluna PAD 2499), nos ensaios de avaliação e cinética da fermentação. Ensaios em maior volume tiveram a determinação do etanol em Densímetro PAAR DM 46 após destilação fracionada. Empregou-se o método de Somogyi-Nelson, na determinação de açúcares redutores totais, após hidrólise ácida com ácido clorídrico 1N a 100°C.

A análise qualitativa de açúcares foi feita por cromatografia de papel (Whatman nº 3), usando-se como solvente n-propanol-acetato de etila-água (7:1:2) e corando-se com 2% de difenilamina em etanol, 2% de anilina em etanol e 85% (V/V) de ácido fosfórico na proporção de 5:5:1.

Figura 3 - Cinética da produção de inulinase extracelular durante o crescimento de *K. fragilis* (IZ 610) e *K. marxianus* (IZ 1339) em inulina e repressão catabólica.

Símbolos: — = Atividade; --- = ART



Resultados

O primeiro caráter a ser avaliado foi assimilação da inulina, onde 75 linhagens, pertencentes a 21 espécies de leveduras, incluindo os gêneros *Candida*, *Saccharomyces*, *Schwanniomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces* e *Torulopsis* foram testadas quanto a seu crescimento neste carboidrato. As leveduras, capazes de utilizar este polímero, pertencem às espécies *Candida tropicalis*, *C. utilis*, *C. pseudotropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. fermentatis*, *Schwanniomyces castelli*, *S. alluvius*, *Pichia polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *K. marxianus* e *Torulopsis coelliculosa*.

Quanto à capacidade fermentativa de extratos de *H. tuberosus*, verificou-se, através de ensaios com fermentações sucessivas, que linhagens de *C. pseudotropicalis*, *K. fragilis* e *K. marxianus* foram aquelas mais promissoras (Fig. 1). Selecionando-se estas linhagens procedeu-se a novos ensaios de fermentação e, após 48 horas, obteve-se rendimentos de produção de álcool de cerca de 85% do teórico, para linhagens de *K. marxianus* e *C. pseudotropicalis*. Teores alcóolicos de 8,6°GL obtidos são comparáveis àqueles das fermentações industriais da sacarose (Tabela 1).

A análise cinética da fermentação em processo descontínuo, em extratos de *H. tuberosus* (Fig. 2), evidencia uma taxa de fermentação elevada, nas primeiras 10 horas em *K. marxianus* e 24 horas em *K. fragilis*, chegando a rendimentos de 74,38% e 70,76%, respectivamente.

A partir deste ponto a velocidade de fermentação é bem menor, chegando aos teores máximos de: 84% de rendimento com 8,50°GL de etanol, em 48 horas, para *K. marxianus*; 77,4%, com 7,81°GL de etanol, em 58 horas, para *K. fragilis*; e 64,5%, com 6,59°GL de etanol, em 58 horas, para *S. cerevisiae*.

A produção de inulinase mostrou-se variável, entre e dentro de espécies (Tabela 2) e, na amostra avaliada, encontrou-se, como produtoras de mais de 900U/ml de enzima em extratos brutos, as linhagens IZ 1339, de *K. marxianus* e IZ 275, de *K. fragilis*. As variações, encontradas em tempos diferentes de cultivo, estão associadas à repressão catabólica, pela liberação da frutose no meio, como evidenciado pelos resultados de cinética da atividade de inulinase (Figs. 3 e 4), verificando-se este efeito mais acentuado em algumas linhagens, como IZ 610. A atividade máxima observada foi de 3.600U/ml, para IZ 1339, após 72 horas de crescimento.

Discussão

A utilização de *H. tuberosus*, como fonte de carboidratos, vem sendo objeto da atenção de várias instituições (8, 9, 12, 17), notadamente pelo que pode representar na produção de álcool, biomassa e xaropes de frutose.

Para o Brasil, este vegetal, ainda pouco pesquisado, apresenta propriedades capazes de representar uma biomassa alternativa da cana-de-açúcar, não somente pelas facilidades de cultivo e processamento, mas por ser viável em regiões mais pobres como no Nordeste, em áreas onde é inviável o cultivo de cana.

A fermentação da inulina está diretamente associada à produção da inulinase, uma enzima extracelular que hidrolisa este carboidrato, em unidades de frutose, sem a formação de oligossacarídeos intermediários (6, 8, 9, 10, 18).

Desde que leveduras que possuam alta atividade de inulinase possam ser melhoradas e apresentar elevados rendimentos, a fermentação direta de extratos de *H. tuberosus* apresenta possibilidades atraentes para as condições brasileiras. Considerando-se que *H. tuberosus* pode ser cultivado em regiões carentes de proteína, a produção de biomassa de leveduras e concomitante produção de xaropes de frutose, tornariam viáveis empreendimentos onde o custo de ração protéica é elevado.

Os ensaios de avaliação de leveduras, neste trabalho, mostram que a produção de inulinase e atividade fermentativa são caracteres com variabilidade genética sufi-

Tabela 2 - Avaliação da atividade de inulinase em linhagens selecionadas, após 24 horas e 48 horas de crescimento em meio com inulina (1,5%)

Linhagens	Atividade de inulinase (U/ml = nmol frut./ml.min)	
	24 horas	48 horas
IZ 148 (K.m)	282.1	708.5
IZ 1821 (K.m)	301.3	456.0
IZ 1339 (K.m)	439.8	946.6
IZ 429 (K.f)	88.5	267.9
IZ 275 (K.f)	728.3	990.7
IZ 610 (K.f)	448.8	494.1
IZ 431 (C.p)	429.6	297.7
Fleischmann	41.0	0.0

cientes para que se obtenham resultados mediante seu melhoramento. Os resultados mostram ainda que, mesmo partindo de leveduras não melhoradas, já é possível fermentar, dispensando-se a prévia hidrólise da inulina. Os valores, obtidos em rendimento e produção de álcool, são equivalentes àqueles obtidos por outros pesquisadores (8, 9, 10, 13, 19), a atividade máxima de inulinase obtida também é equivalente àquela encontrada por outros pesquisadores (4, 5, 7, 15, 16, 18) e com os valores de atividade obtidos pode-se prever que, em sistema contínuo de produção, altos rendimentos de hidrólise podem ser atingidos.

Conclui-se ainda, que é possível utilizar *H. tuberosus* no Brasil, com vantagens sobre outras fontes alternativas de produção de álcool, biomassa e xarope de frutose, dispensando-se a hidrolise prévia.

Referências Bibliográficas

1. Barnett, J.A. & Pankhurst, R.J. - A new key to the yeasts. Amsterdam, North Holland Publishing, 1974.
2. Beluche, I.; Guiraud, J.P. & Galzy, P. - Inulinase activity of *Debaryomyces cantarelli*. *Folia Microbiol.*, 25:32-39, 1980.
3. Boinot, F. - Le topinambour dans la fabrication de l'alcool. *Bull. Assoc. Chim.*, 59:792-805, 1942.
4. Byun, S.M. & Nahm, B.H. - Production of fructose from Jerusalem artichoke by enzymatic hydrolysis. *J. Food. Sci.*, 43:1871-1873, 1978.
5. Chautard, P.; Guiraud, J.P. & Galzy, P. - Inulinase activity of *Pichia polymorpha*. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 28:245-255, 1981.
6. Fleming, S.E. & Grootwassink, J. - Preparation of high fructose syrup from the tubers of the Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 12:1-28, 1979.
7. Guiraud, J.P.; Viard-Gaudin, C. & Gazly, P. - Étude de l'inulinase de *Candida salmenticensis* Van Uden et Buckley. *Agric. Biol. Chem.*, 44:1245-1252, 1980.
8. Guiraud, J.P.; Daurelles, J. & Galzy, P. - Alcohol production from Jerusalem artichoke using yeasts with inulinase activity. *Biotech. Bioeng.*, 23:1461-1465, 1981.
9. Guiraud, J.P.; Deuille-Duc, T. & Galzy, P. - Selection of yeast strains for ethanol production from inulin. *Folia Microbiol.*, 26:147-150, 1981.
10. Guiraud, J.P.; Caillaud, D.M. & Galzy, P. - Optimization of alcohol production from Jerusalem artichoke. *Europ. J. Applied Microbiol. Biotechnol.*, 14:81-85, 1982.
11. Lodder, J., ed. - The yeast: a taxonomic study. 2.ed. Amsterdam, North Holland Publishing, 1970.
12. Margaritis, A.; Bajpal, P. & Cannell, E. - Optimizacion studies for the bioconversion of Jerusalem artichoke tubers to ethanol and microbiol biomass. *Biotechnol. Lett.*, 3:595-599, 1981.
13. Margaritis, A. & Bajpal, P. - Ethanol production from Jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus*) using *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces rosei*. *Biotechn. Bioeng.*, 24:941-953, 1982.
14. Margaritis, A. & Bajpal, P. - Continuous ethanol production from Jerusalem artichoke tubers. I - Use of free cells of *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechn. Bioeng.*, 24:1473-1482, 1982.
15. Negoro, H. & Kito, E. - β -fructofuranosidase from *Candida kefyr*. *J. Fermen. Technol.*, 51:96-102, 1973a.
16. Negoro, H. & Kito, E. - Purification and enzymatic properties of intracellular β -fructofuranosidase from *Candida kefyr*. *J. Fermen. Technol.*, 51:103-110, 1973b.
17. Pilnik, W. & Verveld, G. - Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) as a source of fructose a natural alternative sweetener. *Z. Acker und Pflanzenbau*, 142:153-162, 1976.
18. Snyder, H.E. & Phaff, H. - Studies on a Beta-fructosidase (inulinase) produced by *Saccharomyces fragilis*. *Ant. Van Leeuwenhoek*, 26:433-452, 1960.

EFEITO DA LUZ E DO pH NO CRESCIMENTO DE SPIRULINA MAXIMA

Carlos Augusto Montenegro Ferraz
 Eugênio Aquarone
 & Margareth Krauter

Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP
 Deptº de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
 Caixa Postal 30786
 01051 São Paulo SP, Brasil

Resumo

Foi analisada a influência da luz e do pH, no crescimento de *Spirulina maxima*. Nas diferentes intensidades luminosas estudadas (0,9 a 2,5 Klux), com o aumento da luminosidade observou-se uma maior concentração celular final. O pH 9,5 foi o mais favorável para o crescimento de *S. maxima*. Neste pH, a fonte de carbono presente no meio de cultivo apresenta-se predominantemente na forma de HCO_3^- , que é a forma mais assimilável de carbono para *S. maxima*. Obteve-se uma biomassa com teor proteico (cerca de 66%) mais elevado que o verificado em outras biomassas microbianas ou em fontes proteicas tradicionais.

Summary

Effect of light and pH on growth of Spirulina maxima

The influence of light and pH on growth of *Spirulina maxima* was studied. At the increase of light intensity (0.9 to 2.5 Klux) there was a higher cellular concentration. The most adequate pH to the growth was 9.5. At this pH, the carbon forms of medium showed mainly as HCO_3^- which is the best carbon source to *S. maxima*. The biomass produced had around 66% of protein. This tenor is higher than others biomasses or traditional protein sources.

Introdução

Spirulina maxima é um microrganismo foto-autótrofo pluricelular, colonial, de morfologia filamentar e espiralada, de "habitats" aquosos de elevada salinidade e alcalinidade. Devido às suas características procariontes (gram-negativo), associadas ao mecanismo fotossintetizante oxigênico, típico de vegetais superiores, sua classificação taxonômica tem sido controvertida, sendo considerada algumas vezes como alga verde-azul e em outras como cianobactéria (6, 11, 14, 20, 25). A tendência atual é de considerá-la uma cianobactéria, especialmente após a revisão de Rippka & col. (30).

A cultura macia de microrganismos fotossintetizantes pode representar uma fonte alternativa e inclusive vantajosa, para a produção de proteínas de apreciável valor biológico para consumo animal e humano. Estudos neste sentido têm sido executados desde o início da década de 50 (9, 11, 12, 17, 21, 32, 34) principalmente com dois gêneros de microalgas verdes - *Chlorella* e *Scenedesmus* (7, 8, 18, 27) tendo, entretanto, surgido problemas para sua utilização industrial devido aos elevados custos

de extração e secagem da biomassa, além da presença de parede celulósica com baixo teor de digestibilidade (11, 22, 31). Estes problemas são notavelmente atenuados com *Spirulina*, tendo sido usada como alimento humano desde tempos remotos em certas regiões da África e México (11, 15). Estudos nutricionais demonstraram ser *Spirulina*, uma das mais ricas fontes proteicas já encontradas, possuindo elevado valor nutricional, boa digestibilidade e todos os aminoácidos essenciais em proporções recomendadas pela FAO, com exceção de metionina (20, 25, 26, 33).

Quanto aos aspectos tecnológicos de cultivo, *Spirulina* apresenta vantagens em relação aos demais fotótrofos, entre elas a separação fácil e econômica do meio de cultivo devido à forma espiralada e maiores dimensões (diâmetro de cerca de 10 μm e comprimento variando de dezenas a centenas de μm). Além disto, existe a perspectiva de utilização de resíduos industriais e urbanos como fonte de nutrientes, reduzindo os custos de produção. Neste processo ocorreria mineralização da carga orgânica poluente (DQO e DBOs) do resíduo, através de uma micro-flora heterotrófica associada, que em contra partida, receberia o oxigênio oriundo da fotossíntese (10, 11, 15, 19, 23, 26).

Neste trabalho, procurou-se verificar de que modo o crescimento de *S. maxima* é influenciado por variações em algumas de suas condições de cultivo, quais sejam: luminosidade e pH. Além disto, determinou-se os valores de proteínas, lipídios totais e cinzas da biomassa obtida. Estes dados serão úteis quando for ampliada a escala de trabalhos e se iniciar o estudo da utilização de resíduos.

Material e Métodos

Microrganismo - Spirulina maxima fornecida pelo Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi del C.N.R. - Università di Firenze, Itália.

Meio de cultivo - Meio próprio para *Spirulina* (28) apresentando a seguinte composição (g/l): NaCl, 0,92; Na₂SO₄, 1,88; K₂HPO₄, 0,50; Na₂CO₃, 8,89; NaHCO₃, 15,15; CaCl₂.2H₂O, 0,05; KNO₃, 2,57; MgSO₄.7H₂O, 0,25; Fe-EDTA, 1,0ml; solução de microelementos, 1,0ml e água destilada q.s.p. 1l.

Fe-EDTA (g/l): EDTA-Na₂, 29,8; FeSO₄.7H₂O, 24,9 e água destilada q.s.p. 1l.

Solução de microelementos (mg/l): SnCl₂.2H₂O, 304; MnCl₂.4H₂O, 173; COCl₂.6H₂O, 194; SeCl₂.6H₂O, 146; BaCl₂.2H₂O, 2.846; LiCl, 293; CuSO₄.5H₂O, 186; FeSO₄.7H₂O, 704; NiSO₄.6H₂O, 717; Na₂MoO₄.2H₂O, 121 e água destilada q.s.p. 1l.

Meio de manutenção - Foi empregado o meio de cultivo com ágar a 1,2% (P/V). Após os repiques, as culturas eram incubadas a 30°C sob luminosidade constante (2,5 Klux), durante uma semana. Após este período as culturas eram mantidas a temperatura ambiente com luz indireta.

Condições de cultura - Sistema 1 - Culturas cresceram em frascos erlenmeyer de 500ml, contendo 200ml de meio de cultura, mantidas em shaker rotatório a 150rpm e temperatura de (30 ± 1)°C. Os frascos receberam um inóculo de 10% (v/v), correspondendo a cerca de 50mg/l de massa seca. Lâmpadas fluorescentes (Phillips, 65 watts) forneceram diferentes intensidades luminosas (0,9; 1,2; 1,5; 2,0 e 2,5 Klux) em função da sua distância em relação aos frascos. A fim de verificar-se a influência da luminosidade no crescimento, a iluminação foi mantida constante durante as aproximadamente 450h de cultivo.

Para o estudo do pH, as culturas foram mantidas a 2,5 Klux (150rpm e 30 ± 1)°C variando-se o pH inicial pelo acréscimo de HCl ou NaOH. Após 240h de cultivo, correspondentes ao início da fase estacionária de crescimento, a concentração celular foi determinada e considerada máxima.

Sistema 2 - Empregou-se fermentador Virtis com dorna de vidro, de capacidade nominal de 5l, contendo 2,5l de cultura. Este sistema foi utilizado na verificação da influência da correção do pH pelo acréscimo de CO₂ através da aeração. Condições de trabalho foram: aeração de 0,5vvm, temperatura (30 ± 1)°C, 150rpm e iluminação de 2,5 Klux, fornecida por lâmpadas (Phillips de 65 watts) fluorescentes.

Avaliação do crescimento - Com amostras colhidas durante o crescimento celular foram realizadas medidas de absorbância (560nm) em espectofotômetro Coleman, modelo 6A e determinações de massa seca, utilizando-se membranas Millipore^R (0,45µm). Correlacionando-se a absorbância das culturas com os respectivos pesos secos, verifica-se uma relação linear, expressa pela equação: Absorbância (560nm) = 1,146 · peso seco (g/l) + 0,069, que apresenta um coeficiente de correlação de 0,974. Tais dados estão de acordo com a literatura e serão utilizados nas interconversões dos resultados (16, 19).

Composição da biomassa - Realizada pela determinação de nitrogênio total, massa seca e cinzas (24). A fração lipídica (incluindo carotenóides, vitaminas lipossolúveis e esteróides) foi obtida por extração em Soxhlet, com clorofórmio-metanol (8).

Resultados e Discussão

A influência da luminosidade no crescimento de *Spirulina maxima* é observada na Figura 1, existindo uma correspondência entre o aumento da intensidade luminosa e o crescimento celular máximo. Por seu microrganismo foto-autótrofo, a participação da energia luminosa pode ser encarada como um substrato limitante. Nota-se ainda que, nas intensidades de luz estudadas, para todo aumento da luminosidade ocorria um correspondente aumento no crescimento celular, não atingindo, portanto, a região de saturação luminosa, que é da ordem de 4,5 Klux para cianobactérias e algas verdes (2).

Inicialmente, existem poucas células por unidade de volume, e consequentemente, cada célula recebe uma intensidade de luz superior àquela necessária para a fotossíntese, resultando um crescimento exponencial e constante (35). A duração da fase exponencial é diretamente proporcional à intensidade luminosa e inversamente proporcional à concentração celular inicial. Sendo igual o inóculo, em todas as luminosidades estudadas, observa-se a mais longa fase exponencial para a maior intensidade luminosa (2,5 Klux). Com o aumento da concentração celular ocorre uma diminuição progressiva da quantidade de luz disponí-

Figura 1 - Efeito da luminosidade no crescimento de *S. maxima*.

Símbolos: + = 2,5Klux; □ = 2,0Klux; ○ = 1,5Klux; Δ = 1,2Klux; • = 0,9Klux

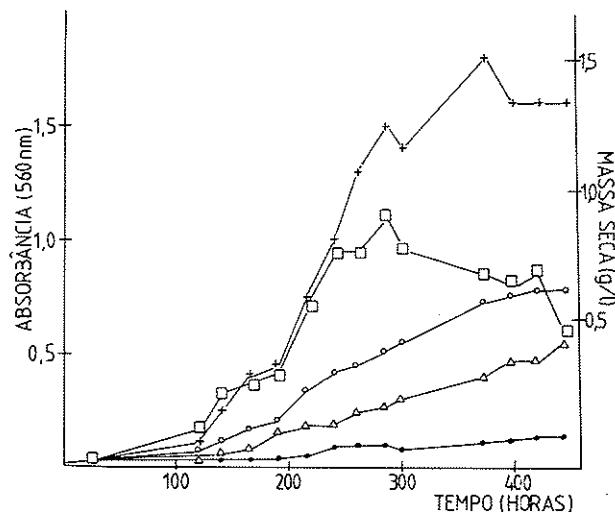
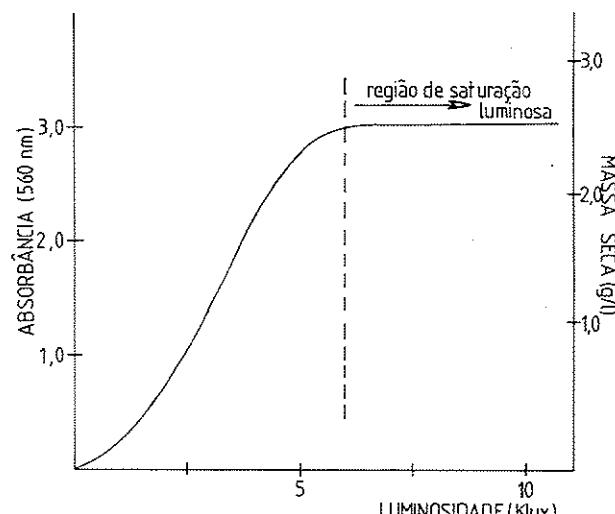
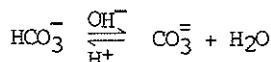
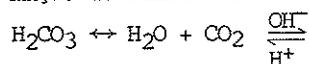


Figura 2 - Curva padrão de crescimento e influência da luminosidade



vel para cada célula, tornando-se foto-limitada a cultura e surgindo, portanto, uma fase linear de crescimento. Quando a intensidade luminosa é demasiadamente baixa, a forma de curva de crescimento altera-se substancialmente, e as fases mencionadas podem nem sempre ocorrerem. É o que se observa para as culturas que receberam as menores luminosidades (0,9 e 1,2 Klux), restando um comportamento intermediário para o cultivo com 1,5 Klux de luminosidade.

Quanto à influência do pH inicial no crescimento de *Spirulina maxima*, observa-se pela Figura 2, um valor máximo de pH 9,5, para as condições estudadas. Neste pH, o equilíbrio entre as diferentes formas de carbono inorgânico contidos no meio de cultura (anidrido carbônico, carbonato ácido e carbonato) está deslocado no sentido de formação de carbonato ácido;



Sendo carbonato ácido, seguido por anidrido carbônico, a forma de carbono preferencialmente assimilada por *S. maxima* (2), a predominância deste ion assegura o maior crescimento final. Com o desenvolvimento da cultura, a concentração de íons carbonato aumenta e consequentemente o pH. Daí a necessidade de restabelecer a reserva de íons carbonato ácido, o que pode ser feito pelo fornecimento de anidrido carbônico. Tal efeito pode ser visto pela Figura 3, onde, no sistema aerado, a introdução contínua de ar estéril (contendo cerca de 0,1% (v/v) de CO₂) forneceu a reposição de carbonato ácido, garantindo o pH adequado para o crescimento de *S. maxima*. Em contrapartida, no sistema não aerado, o acúmulo de carbonato não permitiu um crescimento máximo superior a 1/3 do verificado no sistema aerado.

O pH ótimo de crescimento, nitidamente alcalino, associado a um meio de cultivo isento de compostos orgânicos, são fatores condicionantes para uma ausência de contaminação significativa por microrganismos heterotróficos aeróbicos. Inclusive, com a utilização de resíduos orgânicos como fonte de nutrientes, a população bacteriana associada ao

Figura 3 - Influência do pH inicial no crescimento de *S. maxima*

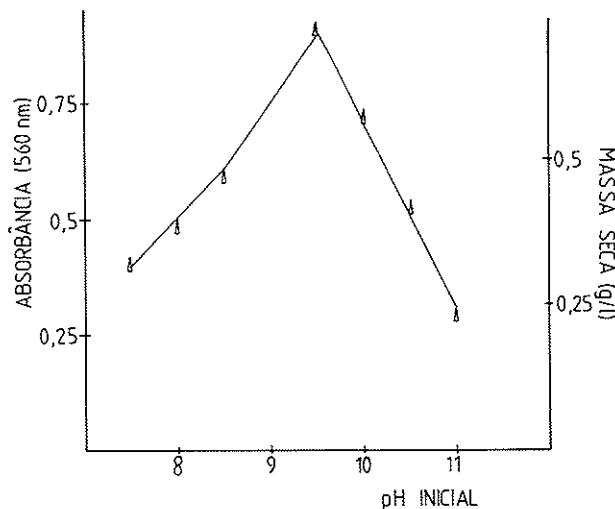
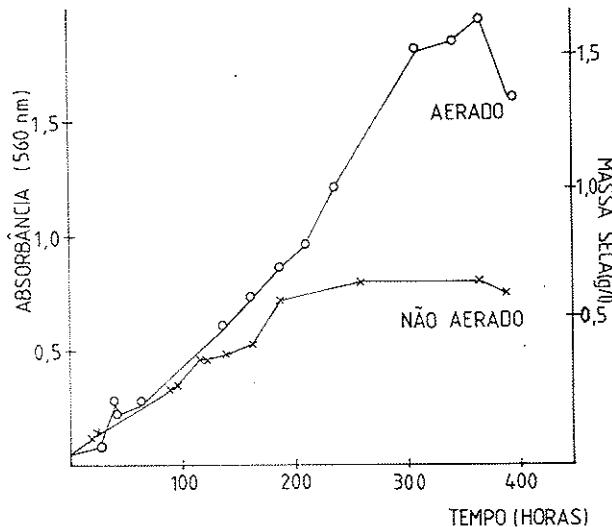


Figura 4 - Influência da aeração



crescimento de *S. maxima* não é qualitativamente diferente daquela verificada em meio mineral, embora seja quantitativamente mais elevada (1).

Com referência à biomassa de *S. maxima*, esta apresentou uma interessante composição química se comparada a outras fontes nutricionais (Tabela 1). Observa-se um elevado teor proteico, cerca de 44% maior que o da soja, 32% mais elevado que a média obtida com outras biomassas microbianas e inclusive maior que o encontrado nos queijos. O teor lipídico é similar ao da soja, apresentando, entretanto, uma menor proporção de minerais.

Conclui-se que *Spirulina maxima*, de elevado valor nutricional, é positivamente influenciada pela luz, nas intensidades luminosas estudadas. Quanto ao pH ótimo de crescimento, por ser notadamente alcalino, atenuará os problemas de contaminação quando da obtenção desta biomassa em larga escala. Esta produção será feita utilizando-se resíduos urbanos ou industriais, minimizando os custos de produção, com simultânea redução da carga orgânica poluente. Um modo, economicamente viável, para a obtenção de grandes quantidades de biomassa será o emprego de tanques abertos ou inclusive lagoas, próximos a fontes produtoras de resíduos (3, 4, 29). Caso a fonte seja, por exemplo, uma usina alcooleira, aproveitar-se-iam seus principais sub-produtos para a obtenção de *S. maxima*. Seria utilizado, tanto o anidrido carbônico, oriundo da fermentação alcoólica, quanto a vinhaça, resíduo da destilação do mosto fermentado.

Referências Bibliográficas

1. Balloni, W.; Filpi, C. & Ferrari, F. - Utilizzazione di *Spirulina maxima* nella depurazione delle acque di scarico. In: - Atti del convegno prospettive della coltura di *Spirulina* in Italia. Firenze, 1980.
2. Balloni, W.; Tomasselli, L.; Giovannetti, L. & Margheri, M.C. - Biologia fondamentale del genere *Spirulina*. In: - Atti del convegno prospettive della coltura di *Spirulina* in Italia. Firenze, 1980.
3. Becker, E.W. - Algae mass cultivation: production and utilization. Process. Biochem., p.10-14, 1981.
4. Behr, W. & Soeder, C.I. - Commercial aspects of utilizing microalgae with special reference to animal feeds. U.O.F.S. Publ. Series C, 3:63-72, 1981.
5. Bernstein, S.; Tzeng, C.H. & Sisson, D. - The commercial fermentation of cheese whey for the production of and/or alcohol in single cell protein from renewable and nonrenewable resources. Biotechnol. and Bioeng. Symposium, 7, New York, Humphrey & Gaden, 1977.
6. Eloff, J.N.; Steinitz, Y. & Shilo, M. - Photooxidation of cyanobacteria in natural conditions. Appl. Environ. Microbiol., 31:119, 1976.
7. Endo, H.; Nakajima, K.; Chino, R. & Shirota, M. - Growth characteristics and cellular components of *Chlorella regularis*, heterotrophic fast growing strain. Agr. Biol. Chem., 38:9-18, 1974.
8. Ferraz, C.A.M.; Frey, K.G. & Aquarone, E. - Influência do acetato de sódio na produção celular de lipídios e no "uptake" de manganês e ferro de *Chlorella vulgaris*. Rev. Microbiol. (S. Paulo), 14:78-83, 1983.
9. Florenzano, G. - Prime ricerche in Italia nell'impianto sperimentale di Firenze sulla coltura massiva non sterile delle alghe. Nuovo Giorn. Ital., 65:1, 1958.
10. Florenzano, G. - Fotosintesi microbica, difusa ambientale e produzione di proteine in 54ª Riunione della SIPS, Brescia, Italia, 1977.
11. Florenzano, G. - La coltura di *Spirulina*, antica fonte di proteine alimentari. Oli Grassi Derivati, 27:38-42, 1981.

Tabela 1 - Composição química de *Spirulina maxima* comparada a outras fontes proteicas (g de substância seca/100g de biomassa).
Símbolos: a = Becker, 1981 (3); b = Bernstein, 1977 (5); c = Grandi, 1983 (13)

Componente	<i>S. maxima</i>	Algas verdes ^a	Leveduras ^b	Soja ^a	Queijos ^c
Proteína total (X x 6,25)	65,9	40-55	35-50	33-40	27-58
Lipídios	19,7	8-15	2-6	15-20	34-64
Cinzas	2,6	5-12	12-20	4-5	8-9

12. Geoghegan, M.T. - Unicellular algae as a source of food. *Nature*, 168:426, 1951.
13. Grandi, J.G. - Leites fermentados, manteigas e queijos. In: - Aquarone, E.; Lima, U.A. & Borzani, W. - Alimentos e bebidas produzidas por fermentação. *Biotecnologia*, vol.5. São Paulo, Edgard Blücher, 1983.
14. Hudson, B.J.F. & Karis, J.G. - The lipids of the alga *Spirulina*. *J. Sci. Fd. Agric.*, 25:759-763, 1974.
15. Kosaric, N.; Nguyen, H.T. & Bergougnov, M.A. - Growth of *Spirulina maxima* algae in effluents from secondary wastewater treatment plants. *Biotechnol. Bioenginn.*, 26:881-896, 1974.
16. Leudy, A. & Therien, N. - An improved microscopic for optical density measurement of the semi microscopic blue green alga *Spirulina maxima*. *Biotechnol. Bioenginn.*, 29:1219-1224, 1977.
17. Litchfield, J.H. - Single cell protein. *Science*, 219:740-746, 1983.
18. Materassi, R.; Paoletti, C. & Balloni, W. - La coltura di microalghe anche come sistema di produzione di grassi. *Riv. It. Sost. Grasse*, 54:109-113, 1977.
19. Materassi, R.; Balloni, W.; Pushparaj, B.; Pelosi, E. & Sili, C. - Cultura massiva di *Spirulina* in sistemi culturali aperti. In: - Atti del convegno prospettive della coltura di *Spirulina* in Italia. Firenze, 1980.
20. Miller, S.A. - In: - Single cell protein. Massachusetts, Matelesard & Tannerbaum, 1968.
21. Milner, H.N. - Algae as food. *Scientific American*, 189:31-35, 1953.
22. Mitsuda, H. - Utilization of *Chlorella* for food. 1st. International Congress of Food Science and Technology, London, 1962.
23. Moraine, R.; Shelef, G.; Meydan, A. & Levi, A. - Algae single cell protein from waste water treatment and renovation process. *Biotechnol. Bioenginn.*, 21:1191-1207, 1979.
24. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 12.ed. Washington, William Horwitz, 1980.
25. Ogawa, T. & Tervi, G. - Studies on growth of *Spirulina platensis*. *J. Ferment. Technol.*, 48:361-367, 1970.
26. Oron, G.; Shelef, G. & Levi, A. - Growth of *S. maxima* on cow-manure wastes. *Biotechnol. Bioenginn.*, 21:2169-2173, 1979.
27. Paoletti, C.; Pelosi, E. & Materassi, R. - Influenza delle condizioni culturali sulla composizione in acidi grassi di *Scenedesmus* spp. I - Influenza della luce. *Riv. It. Sost. Grasse*, 49:428-431, 1972.
28. Paoletti, C.; Pushparaj, B. & Tonneselli, L. - Ricerche sulla nutrizione minerale di *Spirulina platensis*. Atti XVII Congr. Naz. Soc. Ital. Microbiol., Padova, 1975.
29. Richmond, A. & Preiss, K. - The biotechnology of algaculture. Interdisciplinary sciences reviews, vol. 5, Heyden & Son, 1980.
30. Ripka, R.; Dervells, J.; Waterbury, J.B.; Herdmann, M. & Stainer, R. - Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 111:1-61, 1979.
31. Shino, K. & Hayami, H. - Studies on decolorization of *Chlorella*. I - Production of yellow *Chlorella*. 1st. International Congress of Food Science and Technology, London, 1962.
32. Sporehr, H.A. & Milner, H.W. - The chemical composition of *Chlorella*: effect of environmental conditions. *Plant Physiol.*, 24:120-149, 1949.
33. Takano, M.; Sado, J.I.; Ogawa, T. & Terni, G. - Freezing and freeze-drying of *Spirulina platensis*. *Cryobiology*, 10:440-444, 1973.
34. Tamiya, N. - Growing *Chlorella* for food and feed. Proc. World Symp. Appl. Solar Energy, Phoenix, 1957.
35. Wesley, O.; Pipes, A.; Sotiris, P. & Koutsoyannis, A. - Light limited growth of *Chlorella* in continuous cultures. *Appl. Microbiol.*, 10:1-9, 1962.

INFLUÊNCIA DA PENICILINA V-ÁCIDA NO CONTROLE DAS INFECÇÕES BACTERIANAS NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Maria Regina de Melo Cruz
 Marina Lia Vairo
 Dirce Maria Gambassi

Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo
 S.A. - IPT
 Caixa Postal 7141
 01000 São Paulo SP, Brasil

& Flávio Alterthum

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

Resumo

Duas raças de bactérias gram positivas foram escolhidas entre várias isoladas de tanques de fermentação de indústrias produtoras de etanol. Quando testadas, ambas foram capazes de reduzir, significativamente, a produção de etanol. O crescimento da raça isolada da indústria de Goiânia podia ser eficientemente controlada pela adição de 500UI de penicilina V-ácida por litro de mosto enquanto que raça isolada em Petrolina era resistente a essa concentração do antibiótico.

Summary

The influence of V-acid penicillin on the control of bacterial contamination of alcoholic fermentation

Two strains of gram positive bacteria were selected among several isolated from fermentation tanks in two ethanol producing plants. When tested both were quite effective in reducing the final yield of ethanol. The growth of the strain isolated from the plant in Goiânia could be effectively controlled by 500UI V-acid penicillin per liter of must whereas the strain from Petrolina, was resistant to the same concentration of the antibiotic.

Introdução

O uso da penicilina no controle de contaminações bacterianas é largamente difundido nas usinas que produzem etanol pela via microbiológica. No Brasil, o primeiro trabalho sobre o assunto data de 1957 (3) quando verificou-se que o emprego desse antibiótico como desinfetante na fermentação alcoólica de mosto de milho promoveu um aumento de 17,2% no etanol produzido e uma redução de 65% na acidez total do mosto. No ano seguinte, resultados semelhantes foram obtidos quando utilizou-se a penicilina G potássica no controle das infecções bacterianas na fermentação alcoólica de mosto de melão (4). Da mesma forma, em 1959, Aquarone (2) verificou que a adição de 500UI de penicilina, nos ensaios de fermentação alcoólica de mosto de me-

laço de cana-de-açúcar, originava vinhos mais ricos em etanol e menos ácidos. Menezes considera que o uso de penicilina na concentração de 500 a 1000 unidades por litro na fermentação alcoólica, resulta em um acréscimo de rendimento de etanol (8).

Apesar da existência de inúmeros trabalhos sobre a atuação da penicilina sobre as bactérias gram-positivas de interesse médico (7), inexistem na literatura referências da sua utilização sobre as principais bactérias presentes na fermentação alcoólica até porque a maioria desses microrganismos não foram isolados e identificados.

Dai a razão deste trabalho, que analisou o efeito da penicilina V-ácida (Fontoura-Wyeth) na concentração de 500UI/l mosto sobre duas bactérias gram-positivas, isoladas de microdestilarias.

Material e Métodos

Isolamento dos contaminantes - As amostras foram colhidas em duas microdestilarias da Embrapa (CNP - Arroz e Feijão, Goiânia - Go e CPA - Trópico Semi-Arido, Petrolina, PE) durante a safra de cana-de-açúcar de 82/83. Em cada destilaria foram colhidas três amostras das dornas em fermentação e transportadas a baixa temperatura ($\approx 4^{\circ}\text{C}$) ao laboratório para sofrerem o seguinte tratamento: a) diluições sucessivas em tubos contendo água destilada esterilizada; b) Aliquotas de 0,1ml das diluições adequadas foram espalhadas, com auxílio de alça de Drigalski, sobre a superfície de meio ágar-melaço (melaço diluído em água potável até concentração de 50g de ART/l; sulfato de amônio, 1,0g/l e ágar bacteriológico, 25g/l; c) incubação das placas a 30°C durante 48 a 72h.

Para eliminar a interferência das leveduras presentes nas amostras, nos tubos de diluições colocava-se nistatina (50mg/l).

Procedia-se à contagem das colônias de bactérias e ao isolamento das predominantes.

Para os ensaios de fermentação alcoólica foram escolhidas duas bactérias contaminantes sendo uma delas um bacilo gram-positivo e a outra, um coco gram-positivo isoladas respectivamente, das amostras das microdestilarias de Petrolina e de Goiânia.

Manutenção dos contaminantes - Após o isolamento, as bactérias selecionadas eram repicadas quinzenalmente em tubos contendo meio sólido inclinado (3,0g de extrato de carne; 5,0g de peptona; 10,0g de glicose; 25,0g de ágar bacteriológico e 1l de água destilada).

Tabela 1 - Fermentações alcoólicas sucessivas em mostos de melaço de cana-de-açúcar contaminados com um bacilo gram-positivo. Efeito da penicilina V-ácida adicionada desde a primeira fermentação.

Símbolos: * = Concentração inicial de fermento nos três cilindros da experiência nº I (50g/l); Cilindro nº 1 = testemunha (sem adição de bactérias); Cilindro nº 2 = adição do inóculo de bactérias; Cilindro nº 3 = adição do inóculo de bactérias e penicilina V-ácida (500 UI/l)

Exp.	Cilindro (nº)	Conc. Inic. de bact. (UFC/ml)	Açúcar final (g/l)	Acidez final (g/l)	Etanol produzido (g/l)	Leveduras mortas (%)	n (%)	Δr. (%)
I*	1	10*	7,4	3,8	64,3	3,3	83,6	-
	2	8,2x10 ⁷	5,6	4,3	65,0	1,7	87,1	+4,2
	3	1,0x10 ⁸	6,5	5,1	62,4	1,7	80,0	-4,3
II	1	10*	6,0	3,7	62,4	8,2	81,8	-
	2	1,6x10 ⁸	24,9	6,6	41,5	44,4	56,9	-30,4
	3	1,5x10 ⁸	8,6	5,3	50,3	22,8	67,4	-17,6
III	1	10*	6,4	3,7	65,4	45,2	77,9	-
	2	1,1x10 ⁹	28,9	8,6	44,5	64,3	51,5	-33,9
	3	2,3x10 ⁸	28,1	6,7	48,6	51,0	58,8	-24,5
IV	1	3,0x10 ⁸	7,0	3,5	64,0	38,7	75,2	-
	2	4,0x10 ⁸	88,3	9,6	1,3	89,7	1,5	-98,0
	3	3,5x10 ⁸	76,9	9,7	4,8	83,7	5,8	-92,3

Tabela 2 - Fermentações alcoólicas sucessivas em mostos de melão de cana-de-açúcar contaminados com um coco gram-positivo. Efeito da penicilina V-ácida adicionada desde a primeira fermentação.

Símbolos: * = Concentração inicial de fermento nos três cilindros da experiência nº I (50g/l); Cilindro nº 1 = testemunha (sem adição de bactérias); Cilindro nº 2 = adição do inóculo de bactérias; Cilindro nº 3 = adição do inóculo de bactérias e penicilina V-ácida (500 UI/l)

Exp. (nº)	Cilindro (nº)	Conc. Inic. de bact. (UFC/ml)	Açúcar final (g/l)	Acidez final (g/l)	Etanol produzido (g/l)	Leveduras mortas (%)	n (%)	Δn (%)
I*	1	10 ⁴	6,2	3,9	58,6	0,6	83,9	-
	2	2,8x10 ⁷	6,6	3,9	57,9	0,5	80,9	-2,5
	3	4,6x10 ⁷	6,4	3,9	56,8	1,1	80,8	-2,7
II	1	10 ⁵	6,2	3,8	70,8	27,8	83,2	-
	2	5,5x10 ⁷	6,1	3,8	51,2	32,4	70,9	-14,8
	3	1,3x10 ⁷	6,2	3,7	56,6	28,3	78,8	+5,3
III	1	3,0x10 ⁵	6,6	3,7	57,8	51,5	85,6	-
	2	2,8x10 ⁶	21,3	4,7	52,3	58,5	66,1	-22,8
	3	3,7x10 ⁶	6,4	3,7	54,3	52,9	84,9	-0,8
IV	1	9,3x10 ⁶	6,0	3,0	67,8	48,0	89,5	-
	2	5,9x10 ⁹	67,7	9,1	29,8	67,4	37,1	-58,5
	3	6,7x10 ⁵	6,2	3,1	60,2	42,0	79,5	-11,2
V	1	4,7x10 ⁷	6,7	4,1	50,7	43,7	73,4	-
	2	8,6x10 ⁹	58,7	10,9	25,2	74,0	30,5	-58,4
	3	1,9x10 ⁵	6,3	3,7	52,2	35,3	77,4	+5,5

Preparo do inóculo de bactérias - A partir de cultura pura, o contaminante escolhido era semeado em erlemeyer de 250ml contendo 50ml de meio ágar-melão inclinado e, a seguir, incubado a 30°C durante 48 a 72h.

O material era raspado com auxílio de uma alça metálica e suspenso em 20ml de água destilada esterilizada.

Inóculo de levedura - Foi utilizado fermento prensado (fabricado pelos Produtos Alimentícios Fleischmann Royal Ltda.) na concentração de 50g de fermento úmido por litro de mosto.

Preparo do mosto de fermentação - Era feito no instante do uso, diluindo-se melão com água potável de modo a se obter concentrações iniciais de 150g a 180g de ART/l. Os mostos eram suplementados com 1,0g de sulfato de amônio por litro e o pH inicial acertado entre 4,5 e 5,0 com H₂SO₄.

Solução de penicilina V-ácida - A penicilina era dissolvida em água destilada na concentração de 125.000UI/l.

Fermentações - Os ensaios de fermentação foram realizados em cilindros de 250ml, contendo cada um deles: cilindro nº1: mosto + inóculo de levedura (50g/l); cilindro nº2: mosto + inóculo de levedura (50g/l) + bactéria contaminante (10⁷ a 10⁸ cel./ml); cilindro nº3: mosto + inóculo de levedura (50g/l) + bactéria contaminante (10⁷ a 10⁸ cel./ml) + penicilina V-ácida (500UI/l).

As fermentações eram acompanhadas através das medidas periódicas de densidade relativa e determinações iniciais e finais de: acidez e pH (5), concentração de açúcares redutores totais (9), concentração de etanol (6), porcentagem de leveduras mortas (10) e número de bactérias, através da formação de colônias.

No final de cada ensaio fermentativo, o conteúdo dos cilindros era centrifugado a 3000xg por 15 minutos sendo as células recuperadas e usadas como inóculos dos ensaios subsequentes.

Os seguintes cálculos foram feitos no final de cada fermentação:
a) Cálculo do rendimento em etanol:

$$\eta(\%) = \frac{E_p}{E_t} \times 100$$

onde, E_p = Etanol produzido (g/l); E_t = Etanol teórico (açúcar inicial x 0,511)

b) Cálculo da redução percentual do rendimento

$$\Delta\eta(\%) = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} \times 100$$

onde, η = rendimento do cilindro que está sendo testado; η_0 = rendimento da prova em branco.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos nos ensaios de fermentação alcoólica com mostos inoculados com bacilo gram-positivo, isolado na microdestilaria de Petrolina, encontram-se na Tabela 1 e nas Figuras 1B e 2B.

Os valores resultantes dos ensaios feitos com mostos inoculados com o coco gram-positivo, isolado da microdestilaria de Goiânia, são apresentados na Tabela 2 e nas Figuras 1A e 2A.

A escolha destes dois microrganismos foi baseada na frequência de aparecimento, bem como no elevado número encontrado nas várias coletas realizadas.

Examinando as duas Tabelas e a Figura 1, chegamos à conclusão que os dois contaminantes estudados interferem na fermentação alcoólica, provocando quedas significativas nos valores dos rendimentos do processo, em comparação com os da prova teste-munha.

As possíveis causas da queda do rendimento são: produção de substâncias tóxicas pela bactéria contaminante; transformações do álcool formado em outro produto e competição do contaminante com a levedura por algum(ns) dos componentes disponíveis no meio.

A elevada acidez do vinho e os ensaios preliminares de cromatografia apontam em direção à produção de substâncias tóxicas, em particular os ácido acético e láctico.

Quanto à eficiência da penicilina V-ácida, na concentração de 500UI/ μ , também podemos chegar às seguintes conclusões, nos casos estudados:

a) A penicilina controlou eficazmente o desenvolvimento do coco isolado na microdestilaria de Goiânia, mantendo a população em nível baixo a ponto de não interferir no rendimento do processo fermentativo. Por outro lado, quando o antibiótico não foi adicionado, verificou-se acentuada queda no rendimento e aumento de acidez no vinho. Amorim & Oliveira (1) já haviam feito estas constata-

Figura 1 - Fermentações alcoólicas sucessivas em mostos de melaço de cana-de-açúcar contaminados com um coco gram-positivo (1A) e com um bacilo gram-positivo (1B). Efeito indireto da penicilina V-ácida no rendimento

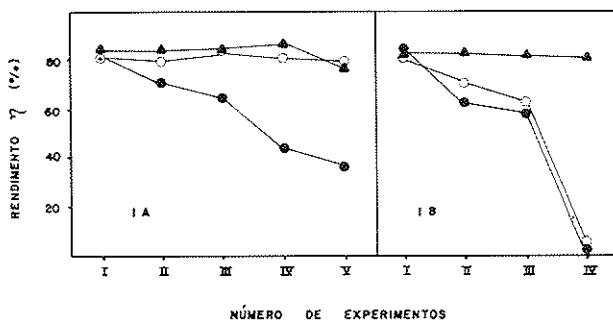
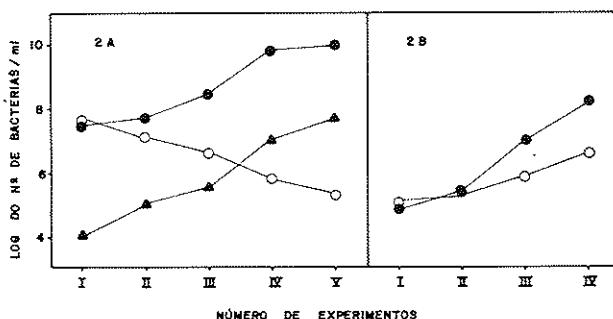


Figura 2 - Fermentações alcoólicas sucessivas em mostos de melaço de cana de açúcar contaminados com um coco gram-positivo (2A) e com um bacilo gram-positivo (2B). Efeito direto da penicilina V-ácida no número de contaminantes. Símbolos: ▲ = Cilindro testemunha (sem adição de bactérias); ● = cilindro sem adição de penicilina (com adição de bactérias); ○ = cilindro com adição de penicilina (com adição de bactérias)



gões, porém baseadas em análises acumuladas ao longo de uma safra, em várias usinas produtoras de etanol.

b) A penicilina, embora tenha efeito sobre o número de células do bacilo isolado na microdestilaria de Petrolina, não impediu quedas de até $\approx 90\%$ no rendimento e elevação da acidez.

Embora não tenhamos feito testes para avaliar a produção de penicilinase, é sabido que alguns bacilos gram-positivos são produtores desta enzima (7) o que explica os resultados obtidos.

O trabalho evidencia a necessidade de coletar, selecionar e identificar as bactérias contaminantes que são responsáveis por perdas consideráveis no rendimento de um processo fermentativo. Além disso, deixa claro que a penicilina não deve ser usada indiscriminadamente, podendo haver casos de absoluta ineficácia deste antibiótico.

Agradecimentos

Agradecemos à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) através do seu Programa Nacional de Energia pelo apoio financeiro.

Referências Bibliográficas

1. Amorim, H.V. & Oliveira, A.J. - Infecção na fermentação: como evitá-la. Álcool & Açúcar, 2:12-18, 1982.
2. Aquarone, E. - Influência de antibióticos na fermentação alcoólica de mosto de melaço de cana de açúcar. São Paulo, Faculdade de Farmácia e Odontologia da USP, 1959. (Tese de Doutorado).
3. Borzani, W. - O emprego de penicilina como desinfetante em fermentação alcoólica de mosto de milho. Bol. Dep. Quím. EPUSP, 7:9-12, 1957.
4. Borzani, W. & Aquarone, E. - Fermentação de mosto de melaço: emprego de penicilina como desinfetante. Engenharia, 183:311-314, 1958.
5. Gomez, E.I.V. - Influência da concentração inicial de levedura e do tempo de fermentação alcoólica de mosto de melaço de cana de açúcar. São Paulo, Escola Politécnica da USP, 1983. (Tese de Mestrado).
6. Joslyn, M.A. - Methods in food analysis. 2.ed. New York, Academic Press, 1970.
7. Kurylowicz, W. - Antibióticos: uma revisão crítica. Pernambuco, Ed. Universitária, 1981.
8. Menezes, T.J.B. - Etanol, o combustível do Brasil. São Paulo, Ed. Agronômica Ceres, 1980.
9. Somogyi, M. - Notes on sugar determination. J. Biol. Chem., 195:19-23, 1952.
10. Vairo, M.L.R. - Methylene blue solutions for staining dead yeast cells. Stain, 36:329-330, 1961.

PRODUCTION OF ALCOHOL FROM THE SOYBEAN SEED COAT: A PRELIMINARY STUDY

Kailash Chandra Srivastava*

Deptº de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos
 Centro de Ciências Agrárias
 Fundação Universidade Estadual de Londrina
 Caixa Postal 6001
 86100 Londrina PR, Brasil

Summary

On dry weight basis, the soybean seed coat was composed of 35% carbohydrates and 32% proteins. Aqueous extracts prepared by shaking the seed coat in distilled water at pH 8.0 for 12 to 96 hours at intervals of 12 hours each, had 3.8% to 6.3% reducing sugars, 29.96% to 39.93% proteins, 4.18% to 5.15% lipids, 0.13% to 0.14% calcium, 0.20% to 0.35% magnesium and 0.25% to 0.337% phosphorus. Extracts were fermented with a flocculant yeast strain suplemented (w/v) with or without glucose 1.5% peptone 0.20% to 0.75%, and yeast extract 0.1% to 0.2%. Mineral salts were added in the final concentration of (g/l) NaNO₃, 2.0%; KCl, 0.5%; MgSO₄, 0.05%; KH₂PO₄, 1.5%; (NH₄)₂SO₄, 2%; and Tween 80,2 to the above media. Under these conditions the amounts of alcohol obtained were: 1.89% to 3.983% (18.9 - 39.83 g/l), yields ranged between 0.10% to 0.95% and the process efficiency from 0.78 g l⁻¹ h⁻¹ to 1.65 g l⁻¹ h⁻¹.

Resumo

Produção de álcool a partir de casca de soja: um estudo preliminar

A casca de soja apresenta, como principais compostos químicos (em peso seco), 35% de carboidratos e 32% de proteínas. Extratos aquosos, preparados por agitação de casca de soja, com água destilada, a pH 8,0, em intervalos de 12h cada um, durante 12 a 96hs, tinham 3,8% a 6,3% de açúcares redutores totais, 0,13% a 0,14% de cálcio; 0,257% a 0,337% de fósforo; 4,180% a 5,150% de lipídios; 0,200% a 0,350% de magnesio e 29,960% a 39,930% de proteínas. Uma parte dos extratos, assim obtidos, foi individualmente suplementada com (p/v) extrato de levedura 0,15 a 0,2%; glicose 1,5% e peptona, 0,2% a 0,75%. Foram adicionados, para todos os extratos (suplementados com glicose, peptona e extrato de levedura ou não), os seguintes minerais, nas concentrações finais (em g/l) indicadas para cada um: NaNO₃, 2.0; KCl, 0,5; MgSO₄, 0,5; KH₂PO₄, 1,5; (NH₄)₂SO₄, 2; e Tween 80-2. O meio de cultura (mosto) foi fermentado com 10% de volume de uma levedura flocculante. Nestas condições experimentais, os teores de etanol obtidos foram de 1,89% a 3,983% (18,9 - 39,83 g/l), o rendimento de etanol variou entre 0,101 a 0,950 e a eficiência de processo de 0,78 a 1,65 g l⁻¹ h⁻¹.

* Presently at Forest Products Laboratory, P.O.Box 5130, Madison, WI 53705, USA.

Introduction

With the scarcity of fossil energy sources and continuing increase in the price of the crude petroleum over the recent years, the most hard hit were the countries of so called "Industrial World" and the ones which were not the producers of petroleum. Amongst these, Brazil is the pioneer in seeking alternative to petroleum. The country has its goal towards complete self sufficiency in energy by 1987 with a total production of 10.1 billion litres of ethanol (27, 44). Presently any new alcohol distillery projects are not being accepted because of the existing 384, in the 1981/82 sugar cane season, 373 have produced a total of 5.18×10^9 litres of alcohol (27).

Other developed and developing nations have also joined Brazil in this quest of alternatives to energy with a view of avoiding the disastrous consequences of depleting fossil energy sources (54, 55). All the studies very clearly indicate that at the moment, the only alternatives to be counted upon are the renewable energy resources, which have continuously been and are being sought since 1920 (27, 44, 54, 55). Recent surveys indicate 12 to 20 biomass feedstock for ethanol production (45, 55). These include five principal group of carbohydrates - viz. cellulose, hemicellulose, lignin, starch, and sucrose (27, 43, 54). Majority of the biomass exists as cellulose, hemicellulose, and lignin in the ratio of 4:3:2. Out of the 1.841×10^9 t yr^{-1} of the biomass produced in the world, 100×10^9 t yr^{-1} is cellulosic (49) in the form of agricultural and industrial residue like husks and brans (45).

Not only is the Brazil pioneer in attempting to become self sufficient in energy, it is the second largest world producer of soybean (56). Other than exporting major parts of its grain soy, it also exports as much as 6×10^6 t yr^{-1} of crude soy flour (56). For producing these flours, and other products of soybean, the first step is the dehulling of the grain (56). Thus produced abundant seed coat is either used as fertilizer, boiler feed or thrown away as effluent (56).

If Brazil has to continue with its highest target of energy alcohol production, keeping up concomitantly self-reliance on food, the vast land and energy presently used in cultivation of sugar cane, sweet sorghum and cassava, the three major crops used as ethanol producing feedstocks (30, 31, 32), will have to be used for the food and feed. Thus all the agricultural and industrial residues become economically replenishable, energy rich, transportable key feed stocks for the production of ethanol, once hydrolyzed into a fermentable mono or disaccharide.

Review of literature has shown that the grain soybean has about 30% of its dry weight as carbohydrate. Other soy products range in zero to 34.2% of their dry weight as carbohydrates (18, 19). Although the conditions like pH, temperature, time and mode of extraction have their respective influence on the amounts of extracted oligosaccharides (Tables 1 and 2), the principle carbohydrates isolated from the soybean include, the disaccharide sucrose, trisaccharide raffinose and tetrasaccharide stachyose (Table 2) constituting about 15% of soybean grain (43). Applying gas chromatography, the oligosaccharide composition of sixty soybean varieties was demonstrated by Hymowitz & col. (15) to contain 2.5-8.2% sucrose, 0.1-0.9% raffinose and 1.4 to 4.1% stachyose (Table 2). In lipid free extracts of soybean cotyledons, 1.5% glucose, 0.023% verbascose and 0.19% of arabinose have been reported by Kawamura & Tada (24). Glucose (0.1%), manintriose (0.1%), galactose (0.4%), and melibiose (0.5%) have also been obtained from the defatted soybean flour (7). More recently (5), other than varying composition of raffinose, stachyose and sucrose, 63.4% D-glucose, 36.6% galactose, have also been reported (Table 2). According to another recent publication (16), the flatulence causing carbohydrates of soybean were composed primarily of raffinose, sucrose and stachyose. This conclusion was derived because isolates and concentrates of soybean protein, which contain lesser degrees of these carbohydrates (Table 2) caused low flatulence.

Amongst the many methods used for the extraction of oligosaccharides from grains and other soy products, coccion seems to be most effective. While Ku & col. (26) could get maximum yields of 58.5% to 59.7% of oligosaccharides with the increase in the pH of the coccion liquid from 4.3 to 8.0, the time from 10 to 60 min, and

liquid: solid ratio of 3:1 - 10:1; Havel & col. (13) observed that doubling the coaction time (30 min → 60 min) increased the amount of extracted stachyose of textured soy protein (TSP) from 75% to 81.3%. However, when the same was rehydrated for 16hr at the ambient temperature, upto 97% of the stachyose could be extracted (34). A progress in this direction has been made by the use of ultrafiltration (Table 2). Through hydration of the soybean grains at 4°C overnight in a solid liquid proportion of 1:3, decantation, then rinsing followed by heating at 90°C for 3 min in a solid liquid proportion of 1:9, and posteriorly soaking for 5 min in hot water, followed by filtering the paste through filter press, washing the residue with hot water and finally ultrafiltering the liquid, Omosaiye & col. (34) could extract upto 89% oligosaccharides. The residue was left with less than 1% oligosaccharides.

Wang & col. (52) on the other hand, have obtained extraction of fructose (26.9%), raffinose (47.5%), stachyose (32.9%), and sucrose (41.8%) by hydration of soy grains in solid liquid ratio of 1:5 for 18hr at 25°C (Table 2). But Ida & col. (16, 17) obtained <10% oligosaccharides from cotyledons with 8hr of hydration at solid liquid ratio of 1:5 and 27.5 min of heating at 90°C (Table 2).

All the reports mentioned in preceding paragraphs lead to only one conclusion that although the exact carbohydrate composition of soybean seed coat may vary from variety to variety, upon conditions and employed process of extraction (Tables 1 and 2); the quantity obtained is large enough that one could use it as a feedstock for the production of alcohol. At the same time using the enzyme and/or acid hydrolysis, the cellulose fraction of the seed coat could also be used.

Utilizing soybean milling residue, we have obtained some success (46). Reported here are the results obtained on the carbohydrate composition of soybean seed coat, and on alcohol production from it.

Material and Methods

Preparation of soybean seed coat extract - Using a rotary shaker, 10g samples of soybean seed coat contained in a 500ml Erlenmyer flask were shaken at 28°C ± 0.1°C and 250rpm for different periods of time ranging from 12hr to 96hr. The shaking medium was sterile distilled water preadjusted to pH 8.0 with 0.5% NaHCO₃ following recommendations of Ku & col. (26). After the designated period, the contents of the flask were filtered, and pH of filtrate adjusted to 4.6. Then the filtrate was heated in a water bath at 90°C for 20 min to precipitate proteins. The liquid was cooled and filtered. A portion of thus prepared soybean seed coat water extract (SWE) was analysed chemically and another used to prepare culture media as shown in Table 3.

Product	Ingredients (%)			
	Carbohydrate	Fibres	Lipids	Proteins
Seed Grain ¹	30.0	5.0	20.0	40.0
Flours				
defatted	34.2	3.2	1.5	50.5
low fat	34.0	3.0	6.5	46.0
promo	19.0	5.0	22.0	49.0
whole	25.2	2.8	20.5	41.0
Soy protein isolate	0.3	0.1	0.1	96.0
Defatted soy protein concentrate	17.5	1.0	4.5	72.0
Textured soy protein	⁴ NA	3.0	20.28	44.1
Bean cotyledon ²	³ 27.96		24.00	43.33
Soy protein concentrate ²				
Water extract	³ 19.95		26.40	48.31
Ultrafiltered	³ 7.34		32.55	56.68
Reultrafiltered	³ 3.48		34.17	59.50
Diafiltered	³ 4.75		33.56	58.26

Table 1 - Proximate chemical composition of soybean grain and its major products.

Symbols: 1 = Average of all cultivars of soybean; 2 = Samples prepared by ultrafiltration; 3 = Amounts obtained by adding the total oligosaccharides and other carbohydrates including fibers. The oligosaccharides (in %) were 13.22, 16.29, 3.47, 0.64 and 0.77 respectively in each of the items. 4 = NA (not available)

Table 5 - Effect of the medium composition on the alcohol production, and pH of the spent medium by *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 366 in media prepared from the extracts of soybean seed coat

Medium	Total reducing sugars (g l^{-1})		Alcohol		Efficiency of the process ($\text{g l}^{-1} \text{h}^{-1}$)	pH of the spent medium
	Before fermentation	After fermentation	mm	g l^{-1}		
M 12 A	43	32	719	33.12	0.589	1.38
	B	28	719	35.12	0.432	1.38
	C	35	771	35.53	0.869	1.48
	D	20	771	35.53	0.330	1.48
	E	18	864	39.83	0.312	1.65
	F	12	801	36.92	0.233	1.54
M 24 A	52	43	411	18.92	0.411	0.78
	B	30	454	20.93	0.186	0.87
	C	25	411	18.92	0.137	0.78
	D	31	411	18.92	0.176	0.78
	E	26	219	33.12	0.249	1.38
	F	25	577	26.57	0.193	1.10
M 36 A	38	30	411	18.92	0.463	0.78
	B	20	454	20.93	0.227	0.87
	C	34	454	20.93	0.102	0.87
	D	27	411	18.92	0.336	0.78
	E	23	577	26.57	0.347	1.10
	F	17	454	20.93	0.273	0.87
M 48 A	60	50	411	18.92	0.370	0.78
	B	51	454	20.93	0.455	0.87
	C	55	516	23.75	0.929	0.99
	D	37	411	18.92	0.161	0.78
	E	29	651	30.00	0.189	1.25
	F	14	577	26.57	0.110	1.10
M 72 A	59	36	411	18.92	0.161	0.78
	B	27	454	20.93	0.128	0.87
	C	53	516	23.75	0.774	0.99
	D	20	411	18.92	0.950	0.78
	E	18	458	21.14	0.101	0.88
	F	10	516	23.75	0.094	0.99
M 96 A	63	38	651	30.00	0.235	1.25
	B	43	687	31.54	0.310	1.32
	C	61	577	26.57	0.205	1.10
	D	61	719	33.12	0.324	1.38
	E	44	825	38.02	0.392	1.58
	F	44	801	36.92	0.380	1.54

The aqueous extracts of soybean seed coat on the other hand were similar to those obtained by previous authors in as much as the carbohydrate composition was concerned. Those on proteins and lipids, however; were much lower (Table 1). The reducing sugar contents, nevertheless were very low, but contents of macro nutrients like calcium, magnesium, and phosphorus were much higher.

Table 5, shows the amounts of alcohol obtained, (in g/l), its yield and the efficiency of the process. Data show better amounts of alcohol in the media prepared from the extracts obtained by shaking the seed coat for either 12 or 96hr. Highest amounts of alcohol were obtained in the media (12E through 96E) prepared by supplementing 0.1% yeast extract and 0.2% peptone to the soybean seed coat water extract (SWE) obtained following trituration of the seed coat for 12 and 96 hours (Table 3). The second highest amounts were in the media that were not supplemented with either glucose or peptone or still yeast extract (F, Table 3). These were also the most efficient media (12E, 96E, 12F, and 96F; Tables 3 and 5). Nevertheless, the best yield of alcohol was obtained in the medium that was supplemented with the highest amount (0.75%) of peptone prepared by shaking the seed coat for 72hrs (72D, Tables 3 and 5). The next best yielders of alcohol were the media prepared from soybean seed coat extracts supplemented with 1.5% glucose, 0.2% peptone and 0.1% yeast extract (media M12C and M48C). The poorest yield was in the medium (96E, Table 3) which gave the second highest amount of alcohol in g l^{-1} (96E, Table 5). Regardless of the supplementation, in general extracts prepared by shaking the soybean seed coat for 12 and 96hr gave the best but the ones shaken for 72hr the poorest efficiency of the process (Table 5). Results, similar to these were obtained under similar conditions from the soybean milling residue (46).

Although data of Table 5 indicate that process efficiency in several of the media surpassed the stoichiometric value of ethanol from hexoses, one should not forget that these were not the only fermentative sugar in the must used. Sugars other than glucose, including xylose (17%) comprise as much as $\approx 50\%$ of total carbohydrate

composition of soybean residue (18). At the same time some *S. cerevisiae* strains have the capacity of fermenting the pentulose xylulose (an intermediate of xylose metabolism) to ethanol (28); Chiang & col., 1981; Suihko & Poutamen, 1984 (19); Detroyn, 1981 (47). Moreover, Barnett (2, 3) has described as many as 238 yeasts that assimilate xylose (2, 3). Furthermore, presence of glucose has been shown to stimulate higher yield of ethanol from xylose fermentation in acid hydrolysate of red oak (20). Thus the higher than stoichiometric yield of ethanol in the present investigation can be explained as the total ethanol yield from all the fermentable sugars—principally glucose and xylose—that comprise the carbohydrate composition of soybean seed coat.

As compared to the amounts of alcohol, its yield and the efficiency of the process reported by earlier authors, working with other raw materials like molasses (6, 21, 39) and apple pomace (11), herein presented data indicate a very low yield of alcohol. The maximum amount of ethanol obtained was 39.83g/l in medium 12E which amounts to only 3.983%. The amounts, yields and process efficiency obtained can be explained by carefully examining the data presented in Table 4.

In general the proteins of the soybean seed coat water extracts (SWE) were higher, the carbohydrates acceptable and reducing sugars low. It has been proven beyond doubt that the higher nitrogen contents inhibit the better yield of alcohol (21). Data obtained in present work support this observation of Jones & col. (21), except in one case (medium 72D, Table 5) where higher yield of ethanol was obtained with the highest supplementation of peptone.

Lower yields of alcohol in media prepared by supplementing glucose to the SWE obtained by shaking the seed coat for periods other than 12, 48, and 72hr and for all other media may be accounted for, by carefully examining the ethanol tolerance capacity of the yeast and the micronutrient composition of the soybean seed coat water extract presented in Table 4, especially those of calcium, magnesium and phosphorus. Higher ethanol concentration produced during fermentation, have been known to inhibit the growth and higher production of ethanol by the yeast used (14, 33, 51). It may also reduce the transport and accumulation of the solute molecules including micronutrients. Also, concentration, accumulation and transport (influx, efflux) of ions like calcium, magnesium, phosphorus and potassium across the plasma membrane of yeast can lead to the inhibition or blockage of the amphiphilic molecules with the plasma membrane thereby having detrimental effects on the amount of ethanol produced (36, 37, 38, 41, 42). Foregoing can be supported by the data in Table 4, explaining thereby the lower yield of alcohol. It is also possible that the coccion process used might have increased the binding of Mg^{++} and Ca^{++} , which could explain the higher concentrations of these cations in the extract as compared to the seed coat. Another reason for the low alcohol yield could be the presence of soybean phytic acid which has been shown to be inhibitory to the microbial metabolism (1). A recent report (4) shows that while binding of ions like Ca^{++} , Mg^{++} , Zn^{++} , and Fe^{++} were increased by boiling or toasting, the phytic acid contents were not altered. Herein presented results (Table 4) thus indirectly support the view of above authors (data on yeast growth not presented).

In these media, the lower yields of alcohol can in no way be attributed to the phenomenon of catabolite repression (40) caused due to the total reducing sugar composition. Even with the supplementation of 1.5% glucose the initial total reducing sugars present in each of the extracts (Table 1) could not have exceeded the limit of 14 - 22° brix concentration, at which the yeasts are known to produce ethanol (21, 39). The low yields, may, however be attributed to the presence of other reducing sugars which could not be fermented by the yeast in question because of its metabolic mode (2, 3) or genetic make up (47). This must have occurred as was evidenced by the amounts of residual total reducing sugars obtained in the post fermentation must (Table 5).

Although the pH of the spent media did not present any specific pattern, they were higher than those of the prefermentation must. It was interesting to note that the highest post fermentation pH was of the media that were prepared by supplementing 0.2% peptone + 0.1% yeast extract to the SWE (media M12E through M96E). This increase in pH could be due to the production of fusel oils at lower concentrations (10). These data also support the hypothesis of the blockage of the

solute transport across the yeast plasma membrane due to higher concentrations of Ca^{++} and Mg^{++} , as the higher binding of these ions has been demonstrated at pH 6.5 than at 5.0; the original pH of the medium (4), which might also have led to the inhibition of alcohol production due to the accumulation of higher amount of Ca^{++} and Mg^{++} along with the efflux of K^+ (36, 38, 41).

In conclusion, even though the data presented herein do not indicate the ideal conditions for the utilization of soybean seed coat as the raw material for the alcohol production, based on its carbohydrate concentration, especially those of oligosaccharides, it can certainly prove to be one of the most economical abundantly available agricultural residue which can be fully harnessed as a commercial feed stock for the fuel ethanol production. In this manner, within the Brazilian context, the problem of competition of the fertile agricultural land for the food production with that used for the renewable feed stocks currently employed can easily be solved. In addition, the utilization of soybean seed coat, bran etc., will also facilitate overcoming social humiliation caused due to flatulence.

Acknowledgements

Sincere thanks to Messers Roberto Kanno, Ms. Maria Alice Carlos and Mrs. Irene de Souza for the technical assistance and to Messers Jorge Yiji Koike and Antonio Grosso for typing of the manuscript. To Prof. Gil Mário Macedo Grassi, Coordenador of (CPG) Coordenadoria de Pós-Graduação e Pesquisa of UEL special indebtedness is expressed, for without his continued collaboration this work conducted through the research grant number 44-679/78 of CPG would not have been possible.

References

1. Aguamah, G.E.; Langcake, P.; Leworthy, D.P.; Page, J.A.; Pryce, R.J. & Strange, R.N. - Two novel stilbene phytoalexins from *Arachis hypogaea*. *Phytochemistry*, 20:1381-1383, 1981.
2. Barnett, J.A. - The utilization of sugars by yeasts. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 34:125-234, 1976.
3. Barnett, J.A. - The utilization of disaccharides and some other sugars by yeasts. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 39:347-404, 1981.
4. Clydesdale, F.M. & Camire, A.L. - Effect of pH and heat on the binding of iron, calcium, magnesium, and zinc and the loss of phytic acid in soy flour. *J. Food Sci.*, 48:1272-1283, 1983.
5. Conkerton, E.J.; Parrish, F.W.; Chapital, D.C. & Ory, R.L. - Isolation of a stachyose-sucrose complex from soybeans and peanuts. *J. Food Sci.*, 48:1269-1271, 1983.
6. Cordenunsi, B.R. - Modelagem matemática da fermentação alcoólica. Londrina, Univ. Estadual de Londrina, 1983. (Dissertação de Mestrado).
7. Delente, J. & Landensburg, K. - Quantitative determination of the oligosaccharides in defatted soybean meal by gasliquid chromatography. *J. Food Sci.*, 37:372-374, 1972.
8. Eldridge, A.C.; Black, L.T. & Wolf, W.J. - Carbohydrate composition of soybean flours, protein concentrates and isolates. *J. Agric. Food Chem.*, 27:779-802, 1979.
9. Gornall, A.G.; Bardawill, C.J. & David, M.M. - Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, 177:751-766, 1949.
10. Goswell, R.W. & Kunkee, R.E. - Table wines. In: - Rose, A.H., ed. - *Alcoholic beverages*. New York, Academic Press, Economic Microbiology Series, 1:315-386, 1977.
11. Hang, Y.D.; Lee, C.Y.; Woodams, E.E. & Cooley, H.J. - Production of alcohol from apple pomace. *Appl. Environ. Microbiol.*, 42:1128-1129, 1981.
12. Hart, F.L. & Fisher, H.J. - *Modern food analysis*. New York, Springer Verlag, 1971.

13. Havel, E.; Tweenten, T.N.; Seib, P.A.; Wetzel, D.L.; Liang, Y.T. & Smith, O.B. - Oligosaccharides released during hydration of textured soy as determined by high performance liquid chromatography. *J. Food Sci.*, 42:666-668, 1977.
14. Kossack, J.A. & Rose, A.H. - Fragility of plasma membranes in *Saccharomyces cerevisiae* enriched with different sterols. *J. Bacteriol.*, 127:67-75, 1976.
15. Hymowitz, T.; Collins, F.I.; Panzner, J. & Walker, W.M. - Relationship between the content of oil, protein and sugar of soybean seed. *Agronomy Journal*, 64:613-616, 1972.
16. Ida, E.I.; da Silva, R.S.S.F. & Rao, C.S. - Oligosacarídos da soja: problemas e soluções. *Arq. Biol. Tecnol.*, 24:461-467, 1981.
17. Ida, E.I.; da Silva, R.S.S.F.; Fabre-Sanches, S.; Perre da Silva, M.A. & Rao, C.S. - Aplicação da metodologia da superfície de resposta na caracterização de farinha de soja integral de baixo teor de oligosacarídos. *Cienc. Tecnol. Alim.*, 3:90-107, 1983.
18. Jeffries, T.W. - Utilization of xylose by bacteria, yeasts, and fungi. *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.*, 27:1-32, 1983.
19. Jeffries, T.W. - Comparison of alternatives for the fermentation of pentoses to ethanol. *Proc. Nat. Meeting Biomass R&D for Energy Appl.* Washington, D.C., 1984.
20. Jeffries, T.W.; Fady, J.H. & Lightfoot, E.N. - Effect of glucose supplements on the fermentation of xylose by *Pachysolen tannophilus*. *Biotech. Bioeng.*, 27, 1985.
21. Jones, R.P.; Pamment, N. & Greenfield, P.F. - Alcohol fermentation by yeasts: the effect of environmental and other variables. *Process Biochem.*, 16:42-49, 1981.
22. Kawamura, S. - Isolation and determination of sugars, from the cotyledons, hull and hypocotyl of soybeans of selected varieties. *Techn. Bull. Fac. Agr. Kagawa Univ. (Japan)*, 15:117-137, 1967.
23. Kawamura, S. - Studies on soybean carbohydrates. 4 - Determination of oligosaccharides in soybeans. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, 28:851-853, 1954.
24. Kawamura, S. & Tada, M. - Isolation and determination of sugars from the cotyledons, hull and hypocotyl of soybeans by carbon column chromatography. *Tec. Bull. Fac. Agr. Kagawa Univ. (Japan)*, 18:138-141, 1967.
25. Kawamura, S.; Tada, M. & Narasaki, T. - Sugars of the cotyledon, hull and hypocotyl of soybeans. *J. Jap. Soc. Food & Nutri.*, 19:268, 1966.
26. Ku, S.; Wei, L.S.; Steinberg, M.P.; Nelson, A.I. & Hymowitz, T. - Extraction of oligosaccharides during cooking of whole soybeans. *J. Food Sci.*, 41:361-364, 1976.
27. Lyons, T.P. - Ethanol production in developing countries. *Process Biochem.*, 18:18-25, 1983.
28. Maiorella, B.L.; Blanch, H.W. & Wilke, C.R. - Economic evaluation of alternative ethanol fermentation processes. *Biotechnol. Bioeng.*, 26:1003-1025, 1984.
29. Martelli, H.L. & Panek, A.D. - Bioquímica experimental: dosagem de glicídios redutores pelo ácido 3,5, dinitro salicílico. Rio de Janeiro, Ao Livro Técnico, 1968.
30. Menezes, T.J.B. - Avanços tecnológicos na produção de álcool de cereais. *Bol. SBCTA (Campinas)*, 15:135-145, 1981.
31. Menezes, T.J.B. - As seis alternativas para o etanol. *Química e Derivados*, 16:80-84, 1981.
32. Menezes, T.J.B. - Starchy materials for alcohol fuel production. *Process Biochem.*, 17:32-35, 1982.
33. Novak, M.; Strehaino, P.; Moreno, M. & Goma, G. - Alcoholic fermentation: on the inhibitory effect of ethanol. *Biotech. Bioeng.*, 23:201-211, 1981.
34. Omosaiye, O.; Cheryan, M. & Matthews, M.E. - Removal of oligosaccharides from soybean water products extracts by ultrafiltration. *J. Food Sci.*, 43:354-360, 1978.
35. Pearson, D. - The chemical analysis of foods. New York, Churchill Livingston, 1976.

36. Peña, A. - Effect of ethidium bromide on Ca^{++} uptake by yeast. *J. Membrane Biol.*, 42:199-213, 1978.
37. Peña, A. & Ramirez, G. - Interaction of ethidium bromide with the transport system for monovalent cations in yeast. *J. Membrane Biol.*, 22:369-384, 1975.
38. Peña, A.; Cinco, G.; García, A.; Gómez-Puyou, A. & Tuena, M. - Effects of externally added sodium and potassium ions on the glycolytic sequence of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Acta*, 148:673-682, 1967.
39. Pimentel, L.S. - The Brazilian ethanol programme. *Biotechnol. Bioeng.*, 22:1989-2012, 1980.
40. Rose, A.H. - History and scientific basis of alcoholic beverage production. In: - Rose, A.H., ed. - *Alcoholic beverages*. New York, Academic Press, Economic Microbiology Series, 1:1-41, 1977.
41. Rothstein, A. & Enns, H. - The relationship of potassium to carbohydrate metabolism in bakers yeast. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 28:231-252, 1946.
42. Rothstein, A. Hayes, A.; Jennings, D. & Hooper, D. - The active transport of Mg^{++} and Mn^{++} into the yeast cell. *J. Gen. Physiol.*, 41:585-594, 1958.
43. Smith, A.K. & Circle, S.J. - *Soybeans: chemistry and technology*. Westport Avi Publishing, V.1, 1978.
44. Solar Energy Research Institute - A guide to commercial scale ethanol production and financing. Denver Co., 1980.
45. Srivastava, K.C. - A critical study on the use of agricultural by products for the manufacture of alcohol. *Anais IIº Seminário sobre Uso de Biomassa em Indústria*, FIJAN IDEG, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 1982.
46. Srivastava, K.C.; Popper, I.O.P. & Wosiacki, G. - Preliminary studies on the utilization of soybean milling residue for the production of alcohol. *Proc. IVth. Int. Symp. Alcohol Fuel Technol.*, Guarujá, SP., Brazil, 1980.
47. Stewart, G.G. & Russell, I. - Aspects of the biochemistry and genetics of sugar and carbohydrate uptake by yeasts. In:- Spencer, J.F.T.; Spencer, D.M. & Smith, D.R.W., eds. - *Yeast genetics: fundamental and applied aspects*. New York, Springer Verlag, 1983.
48. Tanaka, M.; Thananunkul, D.; Lee, T.C. & Chichester, A. - Simplified method for the quantitative determination of sucrose, raffinose and stachiose in legume seeds. *J. Food Sci.*, 40:1087-1088, 1975.
49. Tangnai, S.K. - Process development for ethanol production based on enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. *Process Biochem.*, 17:36-49, 1982.
50. Tanusi, S.; Kasai, T. & Kawamura, S. - Determination of oligosaccharides in some edible legume seeds. *J. Jap. Soc. Food Nutr.*, 25:251, 1972.
51. Thomas, S.D. & Rose, A.H. - Inhibitory effect of ethanol on growth and solute accumulation by *Saccharomyces cerevisiae* as effected by plasma-membrane lipid composition. *Arch. Microbiol.*, 122:49-55, 1979.
52. Wang, H.C.; Swain, T.W.; Hesseltine, C.W. & Heat, H.A. - Hydration of whole soybeans: effects on solid losses and cooking quality. *J. Food Sci.*, 44:1510-1513, 1979.
53. Wolf, W.J. & Cowan, J.C. - *Soybeans as a food source*. Cleveland, CRC Press, 1975.
54. World Bank - Alcohol production from the biomass in the developing countries. Washington, D.C., 1980.
55. World Bank - Renewable energy resources in the developing countries. Washington, D.C., 1981.
56. Zanglemi, A.C.B.; Tagliolatto, M.A.; Dias, E.L. & Lange, D.A. - Produtos de soja: leite, farinha e outros. São Paulo, Coordenadoria da Indústria e Comércio da Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia. Serie Tecnologia Agroindustrial, 10:157, 1982.
57. Zimmerman, H.W. - Studies on the dichromate method of alcohol determination. Apud: - Josilyn, M.A. - *Alcoholometry*. In: - *Methods in food analysis: physical, chemical and instrumental methods of analysis*. 2.ed. New York, Academic Press, p. 457-458, 1970.

INFORMAÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA SBM

Acesso a bancos de dados internacionais

Torna-se cada vez mais necessária a aquisição de informações mais abrangentes e atualizadas, sobre todos os tipos de temas, com maior velocidade de processamento e análise de conteúdo. Nesse contexto, os bancos de dados constituem grandes sistemas de processamento eletrônico de dados, com todos os recursos gerados pelos recentes avanços da informática e computação.

O serviço de comunicação de dados tem real importância, na medida que supre as necessidades de atualização e tomadas de decisão, nos setores governamental, industrial, comercial e de serviços.

Os bancos de dados são sistemas de armazenamento e de recuperação de informações, que se caracterizam pela adequação entre um sistema administrativo coordenador de atualização de informações e um software específico para a recuperação de dados. São constituídos por várias bases de dados, com características distintas, de acordo com o tipo de fornecedor de informação, temática, metodologia e constituição.

Podemos verificar duas grandes categorias de bancos de dados, conforme a recomendação da Comissão Técnica da International Organization for Standardisation, U.S.A.:

1) Bancos de dados de informação primária (Source Data Base), que dão acesso direto às informações, sendo eles mesmos geradores que organizam, sintetizam, indexam e tornam disponíveis os dados aos usuários. Podem ser constituídos pelas seguintes bases de dados:

- . Bases de dados de textos completos (Full-Text Databases), que contêm os textos ou partes fundamentais dos documentos, podendo fornecer cópias, que também podem ser denominados de informação não formatada, isto é, textos correntes, discursivos.
- . Bases de dados numéricos (Numerical Databases), que apresentam informação formatada, sob a maneira de tabelas, gráficos e outros recursos de síntese e de intercorrelação.
- . Bases de dados numérico-textuais (Numerical-Textual Databases), que contêm dados formatados, em uma combinação de informação alfa-numérica.
- . Bases de dados de características (Properties Databases), que apresentam dados reagrupados, sobre determinado material característico, processo ou fenômeno (físico, químico ou biológico), que geralmente se apresentam sob a forma numérica, textual ou mesmo numérico-textual.

2) Bancos de dados de informação secundária (Reference Database), que atuam junto à fonte informativa, reprocessando dados e tornando-os disponíveis ao usuário. Para esse tipo de banco de dados, identificam-se duas possibilidades:

- . Bases de dados bibliográficas (Bibliographic Databases), onde são obtidas descrições bibliográficas, referências e resumos de artigos e periódicos técnico-científicos, documentos, livros, material publicitário e patentes; relações de entidades, instituições e empresas; outras publicações de interesse dos setores anteriormente mencionados.
- . Bases de dados indicativas (Referral Databases), que contêm sumários descritivos de informações inéditas, em geral referentes a organizações, projetos e programas.

Para as áreas econômica, financeira e comercial, as bases de dados de maior importância, contém informações formatadas, sendo os dados fornecidos em tabelas, gráficos e histogramas, onde o tempo de atualização é extremamente curto. Dados sobre mercados, cotações, taxas, previsões e outros valores, com variação em função de negociações, têm sua atualização muitas vezes em tempo real, inclusive durante o acesso do usuário.

Para todas as áreas de planejamento e pesquisa, em particular em ciência e tecnologia, há maior interesse nas bases de dados de informação não formatada, que possibilitam o acompanhamento de novos estudos e resultados que surgem em texto corrente. Nesse caso, o tempo de atualização é mais lento, podendo variar de um dia a dois anos.

As bases de dados bibliográficos fornecem diferentes formatos de descrição dos textos correntes. Pela extensão das informações e a possível recuperação de documentos físicos, convém obter cópias impressas ou fotocópias, de maneira "off-line", por solicitação direta ao fornecedor da base de dados, através de comandos acionados no terminal, sendo remetidos, por via aérea ou marítima. Este procedimento tende a reduzir o custo final da informação, pela redução do tempo de conexão "on-line", isto é, em tempo real.

Cerca de 300 bases de dados, que se tornam disponíveis, pelos bancos de dados DIALOG, ORBIT e QUESTEL, localizando-se nos Estados Unidos e França, incorporaram os mais variados campos do conhecimento e fornecem recursos para estudos, projetos e trabalhos em ciência e tecnologia. O banco de dados DIALOG fornece dados em: medicina e bociências (ciências biológicas, química, engenharia genética); energia e ambiente (recursos energéticos convencionais e alternativos, poluição, oceanografia); ciência e tecnologia (engenharia, geologia, meteorologia, matemática, computação, física); ciência dos materiais (metais ferrosos e não ferrosos, tecnologia têxtil, papel e celulose); agricultura e nutrição (ciência da alimentação e recursos agrícolas e naturais); química (registros, formulações, patentes, indústrias, projetos); e patentes, entre outros.

O acesso aos bancos de dados internacionais vêm sendo amplamente estimulado no Brasil, pelo Serviço Internacional de Comunicação de Dados - Sistema INTERDATA, promovido pela Empresa Brasileira de Telecomunicações S.A. - EMBRATEL. O sistema se constitui num canal preferencial de comunicação de dados, por redes públicas de telefonia ou telex que, conectadas aos telefones, ligados a simples terminais ou microcomputadores e máquinas de telex, viabilizam a conexão com grandes computadores, armazenadores de informações mundiais. A conexão é efetuada por um computador TP 4050 no Nô Internacional da EMBRATEL, localizado no Rio de Janeiro, que analisa, autoriza e retransmite dados, por via satélite, até as grandes redes de comunicação de dados, como a TELENET e a TYMENET, nos Estados Unidos. O canal físico se dá por redes públicas, tanto nacionais como internacionais, de comunicação de dados, ligando o terminal do usuário ao computador na central do banco de dados, através de comandos definidos de identificação do usuário, de chamada da rede nacional e do endereço determinado do banco de dados desejado.

Para efeito de pesquisa bibliográfica ou obtenção de documentos físicos já recuperados em linha, pode-se evidenciar dois procedimentos básicos:

- se o usuário tiver de posse de um terminal ou máquina de telex há a possibilidade de solicitar, junto a EMBRATEL, seu código de acesso com tarifa de registro e contrato com o representante autorizado do banco de dados no país. Dessa maneira, o usuário realizaria, diretamente, suas pesquisas em linha, recebendo ao final de cada mês, uma fatura em cruzeiros, emitida pela EMBRATEL, na qual são tarifados o tempo de utilização e o volume de informação requeridos.
- se o usuário desejar apenas levantamentos eventuais e não dispuser ou não tiver interesse em munir-se de equipamentos ou contratos com os bancos de dados, poderia solicitar, junto ao representante autorizado, uma prestação de serviços, através de entrevista personalizada ou com o Instituto Brasileiro de Informação em Ciência e Tecnologia - IBICT, por meio de formulário, que localizaria objetivamente, à área de interesse e definiria quais os resultados a serem alcançados, quer sejam referências bibliográficas, artigos ou patentes.

Referências Bibliográficas

1. Bases de Dados Internacionais - Guia de serviços de consulta. Rio de Janeiro, Embratel, 63p., 1983.
2. INTERDATA - A informação está mais próxima de você. Rio de Janeiro, Embratel, 4p., 1983.
3. INTERDATA - Serviço Internacional de Comunicações de Dados. Rio de Janeiro, Embratel, 10p. 1983.
4. Guida alle banche dati. Milano, Arnaldo Mondadori Editore, 143p., 1983.
5. Ministère de la Recherche et de L' Industrie - Les PMI et les banques de données: programme national d'innovation. Paris, La Documentation Française Steff, 136p., 1982.

6. TRANSDATA - A comunicação de dados direta e exclusiva. Rio de Janeiro, Embratel, 4p., 1983.

William Antonio Cerantola
 & Miguel Fazanella Filho
 Embrabio - Empresa Brasileira de Biotecnologia
 Rua Apinagés, 1081
 05017 São Paulo SP

Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. Part I - DNA tumor viruses. Part II - RNA tumor viruses. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1305p., 1980.

O Simpósio de Cold Spring Harbor famoso há 5 décadas reúne anualmente, num agradável recanto de Long Island NY, cientistas, os mais representativos da comunidade, que de uma maneira extremamente informal, discutem os resultados de suas pesquisas. Desta vez o assunto escolhido - vírus oncogênicos contou com a participação de 372 autores e com uma audiência de 4110 pessoas registradas. Os 138 trabalhos apresentados foram publicados em dois volumes: DNA tumor viruses e RNA tumor viruses.

No prefácio, James Watson cita algumas das dificuldades que a pesquisa sobre vírus oncogênicos encontrou em sua fase inicial. "O trabalho com animais exigia meses, senão anos, para a realização de uma experiência". Apenas na década de 60 é que estas dificuldades foram contornadas pela introdução, em uso mais frequente, das técnicas de cultura de células animais, dando início a uma era, em crescimento até hoje, que é a biologia molecular dos vírus animais. Foi também necessário um conhecimento básico sobre a caracterização molecular e o mecanismo de replicação destes vírus, antes de se iniciar propriamente o estudo sobre as transformações que estes vírus induzem nas células. Convém salientar a importância que as pesquisas com o vírus SV40 tiveram nos conhecimentos básicos sobre os mecanismos de replicação dos vírus oncogênicos. Esta fase foi precedida de importantes descobertas, tais como a transcriptase reversa nos retrovírus das enzimas de restrição bem como do aprimoramento das técnicas de síntese de proteína e RNA em sistemas "in vitro" que vieram contribuir, de maneira acentuada, para o progresso desta especialidade.

Além dos artigos apresentados, nestes dois volumes constam 3 revisões: "Viral oncogenes" (H.M. Temin), "Transforming genes of DNA tumor viruses" (L.V. Crawford) e "Transforming genes of retroviruses" (P.H. Onesberg) e um sumário "Molecular biology of viral oncogenes" no qual P.A. Sharp consegue descrever, de uma maneira didática e agradável, os principais resultados e experiências apresentadas neste simpósio.

Sharp faz um interessante comentário sobre uma afirmação de Baltimore em 1974 por ocasião do simpósio sobre "Tumor viruses" também realizado em Cold Spring Harbor. Nesta ocasião, Baltimore teria dito que os conhecimentos fundamentais sobre a biologia molecular, dos vírus animais estariam concluídos, o que possibilitava então o início de estudos mais avançados sobre o mecanismo de transformação celular. Na verdade, segundo Sharp, o simpósio de 1979 "Viral oncogenes" se caracterizou por uma quantidade enorme de trabalhos contendo novamente uma informação maciça sobre a biologia molecular dos vírus.

Temin, fazendo uma apreciação sobre os vírus oncogênicos e câncer em humanos cita uma estatística realizada recentemente a qual indica que a mortalidade por câncer nos Estados Unidos é decorrente principalmente de carcinomas de pulmão, seio e próstata. Um outro dado importante nesta lista é a importância dada aos agentes químicos agindo ou diretamente (fumo) ou indiretamente (dieta) na carcinogênese. Nota-se nesta estatística que os vírus não são mencionados, apesar de não se poder descartar totalmente a relação de alguns vírus com o câncer em humanos, tais como o Epstein-Barr no linfoma de Burkitt e no carcinoma nasofaringeano e o vírus hepatite B no carcinoma hepatocelular.

A metodologia empregada no estudo da oncogênese viral nos parece apresentar algumas limitações difíceis de serem contornadas, ponto este, aliás, de concordância entre diversos pesquisadores presentes nesta reunião. Temin comenta esta questão da seguinte maneira: 1) a maioria das experiências realizadas para se investigar a on-

cogênese viral são realizadas com células ou animais de espécies diferentes daquelas das quais os vírus são inicialmente isolados. Como exemplo, temos o vírus SV40 isolado de macaco porém demonstrando uma maior facilidade em transformar células de cobaio e rato. A maioria destas experiências são realizadas com células animais cultivadas em laboratório em meio nutritivo artificial contendo soro bovino enquanto que, no animal, as células se encontram permanentemente em contato com ultrafiltrado de plasma. Esta diferença na metodologia empregada no estudo dos mecanismos de transformação "in vivo" e "in vitro" pode ser a responsável pelas diferenças encontradas entre a transformação em cultura de células, daquela observada na neoplasia em animais; 2) as linhagens celulares utilizadas nestes estudos não são as células onde os vírus normalmente se replicam. Estas células frequentemente são derivadas de linhagens permanentes de células (Cell lines) apresentando diferentes tipos histológicos e exigindo diversos fatores ambientais e nutritivos para a sua proliferação. Os vírus utilizados frequentemente só conseguem ser propagados no laboratório com um enorme auxílio técnico dos cientistas. Nas experiências com animais utilizam-se geralmente os recém-nascidos, geneticamente puros e muitas vezes mantidos com drogas imuno supressoras. Finalmente, a maioria dos vírus oncogênicos causam leucemias e sarcomas enquanto que a grande maioria dos tumores humanos são carcinomas.

Uma comparação entre o mecanismo de carcinogênese induzido por vírus, por substâncias químicas e por radiações foi motivo de diversas opiniões. Temin no seu artigo principal faz diversos comentários a este respeito.

Os vírus agem adicionando informação ao genoma da célula. Estas evidências são apresentadas detalhadamente por Crawford & Duesberg para os vírus dos grupos papova, adeno e retro. A informação viral adicionada ao genoma viral seria dominante e específica. Este conceito foi pela primeira vez indicado na década de 60, após o isolamento de mutantes do vírus do sarcoma de Roux (RSV) que controlam diferentes aspectos morfológicos ("focus") induzidos pelos vírus. Outro conceito não menos importante é o de que o estado de diferenciação da célula exerce influência na transformação celular. O vírus leucemiogênico de Abelson (Ab-MuLV) em roedores transforma fibroblastos em cultura de células mas não causa sarcoma em animais.

Dentro destes conceitos, a carcinogênese viral parece divergir amplamente da carcinogênese induzida por substâncias químicas ou por radiação. A carcinogênese viral, como foi dito acima, envolve a adição de uma informação de caráter específico e dominante ao genoma celular enquanto que a química e radiação envolve uma mudança genética ao acaso que pode ser neutralizada ou inativada sendo normalmente de caráter recessivo. Foi questionado então se a pesquisa com vírus oncogênicos é relevante com relação ao câncer não viral. Temin, pessoalmente não acredita que a virologia possa ajudar a responder perguntas importantes sobre câncer humano.

Parece-nos importante levantar aqui as seguintes perguntas: Quais as mudanças bioquímicas da célula cancerosa? Qual é a natureza genética das modificações consideradas importantes, na célula cancerosa? Qual é o produto primário responsável pela transformação celular? Este produto primário será o mesmo em todos os tipos de câncer?

Dos trabalhos apresentados neste simpósio uma grande ênfase foi dada às diversas tentativas feitas pelos pesquisadores na caracterização de produtos virais (antígenos, proteínas, enzimas e fatores) ou celulares e sua possível participação no processo de transformação celular. A oncogênese viral foi definida como o estudo dos fatores que controlam a manutenção e a transformação do fenótipo da célula por gêns virais.

Dentre os vírus do tipo DNA foram apresentados resultados de experiências realizadas com o vírus poliomídia, SV40, adenovírus, herpes simples e Epstein-Barr. Entre os vírus do tipo RNA destacamos o sarcoma de aves, sarcoma de mamíferos (sarcoma de Kirsten, sarcoma de Harvey e o sarcoma de felinos) o vírus da leucemia aguda defectiva, o vírus do complexo Friend, os vírus do tumor de mama de camundongos (MMTVS) e o retrovírus não defectivo.

Finalizando, gostaríamos de dizer que nos parece razoável afirmar que o estudo sobre a oncogênese viral se encontra ainda numa fase inicial. A grande contribuição deste simpósio foi na caracterização e purificação parcial de alguns polipeptídeos que correspondem aos produtos dos gêns oncogênicos e os mecanismos responsáveis pe-

la sua integração ao genoma celular. Acreditamos que estes conhecimentos serão de capital importância na compreensão, num futuro próximo, dos fenômenos de transformação celular.

Moacyr Alcoforado Rebello
Instituto de Biofísica UFRJ
Bloco G - Ilha do Fundão
21941 Rio de Janeiro RJ

Davis, R.W.; Botstein, D. & Roth, J.R. - *A manual for genetic engineering: advanced bacterial genetics*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1980.

Este útil manual pode ser visto como uma continuação do famoso texto de J.H. Miller "Experiments in molecular genetics" publicado também pelo Cold Spring Harbor Laboratory em 1972. Ele vem apresentar uma coleção de protocolos de experimentos que visam apresentar ao geneticista as técnicas e conceitos fundamentais que permitiram a revolução que levou à novas fronteiras a genética molecular: os métodos de isolamento e manipulação de genes e o uso dos transposons bacterianos. O manual é organizado em três seções. Na primeira há uma relação de 13 experimentos representativos utilizando em geral a bactéria *Salmonella typhimurium*. Usando o transponson Tn10, que confere resistência à tetraciclina, os experimentos incluem isolamento de mutantes auxotróficos por inserção, inserções localizadas, mutantes por deleção gerados por Tn10 e mutagênese local. Há uma série de experimentos com o fago lambda como hibridação molecular em placas de lise ou em gel de agarose, microscopia eletrônica do DNA e sub-clonagem do DNA do fago lambda para um vetor plasmidial. A segunda seção apresenta os protocolos de laboratório para 29 procedimentos básicos em genética molecular, desde a purificação de estoques de bacteriófago ou fago transdutor (P22) passando pelo isolamento de DNA bacteriano, viral ou plasmidial, até "in vitro packaging" de lambda e técnicas eletroforéticas, "nick translation" e preparação de enzimas. Os protocolos técnicos são apresentados e, em anexo, há uma pequena discussão que explica os por quês das diferentes manipulações informando adequadamente o pesquisador iniciante.

Na terceira seção há descrições dos meios de cultivo utilizados e informações sobre a manutenção de estoques de microrganismos, bacteriófagos e DNAs. Há também informações sobre o preparo de tampões e demais soluções, e condições para uso de endonucleares de restrição, assim como os mapas físicos de lambda e pBR322.

Em resumo, creio que este manual é de utilização diária no laboratório de genética molecular e encontra-se literalmente repleto de informações e sugestões úteis para o cientista praticante.

Francisco Gorgônio da Nóbrega
Instituto de Química USP
Caixa Postal 20780
01000 São Paulo SP

FAENQUIL - Cursos de Especialização e Gerência de Produção de Usinas Alcooleiras.

A FAENQUIL - Faculdade de Engenharia Química de Lorena vem oferecendo Cursos de Especialização em Operação e Gerência de Produção de Usinas Alcooleiras, desde 1982, sob o patrocínio da STI/MIC - Secretaria de Tecnologia Industrial do Ministério da Indústria e Comércio, da CEANAL - Comissão Executiva Nacional do Álcool e do CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Os cursos tem a finalidade de criar competência profissional que possibilite a incessante inovação tecnológica no setor sucro-alcooleiro, atendendo assim às metas fixadas pelo Governo Federal, através do Pró-álcool.

Em 1984, a FAENQUIL programou o III Curso de Especialização, ministrando a 30 técnicos (engenheiros químicos e agrônomos, bioquímicos e químicos), vindos de várias regiões do país. Os técnicos receberam formação especializada, a nível de pós-graduação, com carga horária de 1300 horas/aula, além de atividades paralelas, abrangendo as seguintes disciplinas: bioquímica; microbiologia industrial; culturas

energéticas e noção geral de usina; tecnologia agrícola; matérias primas sacarídeas, celulósicas e amiláceas; preparo do mosto; fermentação; manutenção de equipamentos e noções de instalações elétricas; destilação; noções de tecnologia do açúcar; operação e controle de processos; balanço energético e utilidades industriais; controle de qualidade do produto; poluição e resíduos; materiais e corrosão; segurança industrial; administração e aspectos econômicos; estudo de projeto de destilaria.

O corpo docente é formado por especialistas oriundos de diversas instituições, entre elas a FTI/FAENQUIL-Fundação de Tecnologia Industrial, a ESALQ/USP-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", a Universidade Federal de São Carlos, PLANSUCAR/IAA, UNESP/Jaboticabal, COMBRAS, UFRJ e algumas usinas e empresas privadas.

Cláudia Avanzi
SPM
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
Cidade Universitária USP
05508 São Paulo SP

Hendrix, R.W.; Roberts, J.W.; Stahl, F.W. & Weisberg, R.A., eds. - Lambda II. New York, Cold Spring Harbor, Monograph 13, 694p., 1983. US\$ 93.60.

Este livro, publicado 12 anos depois da edição do primeiro livro sobre o bactériofago lambda (λ) "The bacteriophage lambda", representa um compêndio bastante atualizado dos conhecimentos atuais relativos aos diferentes aspectos das pesquisas em torno do fago λ . Certamente preencherá um vazio pois consegue, num único volume, reunir os dados relevantes para os pesquisadores que trabalham com λ .

O livro consiste de 19 capítulos, cada um escrito na forma de uma revisão sobre um tópico diferente; sobre, desta maneira, toda pesquisa realizada com λ , separada em itens diferentes. Há 2 capítulos introdutórios, sendo que o primeiro, de Hershey & Dove, foi reeditado a partir de "The Bacteriophage Lambda", pois representa uma excelente introdução ao assunto. Já o segundo capítulo, "Progress since 1970", mostra resumidamente os progressos realizados nos últimos 13 anos. Além disso, há no capítulo 17 "A beginner's guide to lambda biology", uma boa descrição dos experimentos clássicos feitos com λ . O último capítulo "Experimental methods for use with lambda", representa um excelente manual de métodos experimentais com λ . Os demais 15 capítulos abordam, numa ordem lógica, as seguintes temas:

Desenvolvimento lítico de λ ; estabelecimento da síntese do repressor de λ ; controle genético da integração e excisão; estrutura, função e papel na lisogenização do repressor de λ e do produto do gene cro; indução lisogênica; replicação do DNA de λ ; recombinação generalizada; recombinação sítio-específica no fago λ ; genes acessórios do fago λ ; formação das cabeças dos fagos lambdoídes; empacotamento e corte do DNA; formação da cauda e injeção; o antirepressor do fago lambdoíde P22 e seu controle; evolução dos fagos lambdoídes e clonagem molecular com o fago λ .

Finalmente, há 3 apêndices contendo dados sobre: mapa molecular de λ ; a sequência completa do genoma do fago λ e vetores λ .

Todos estes capítulos, sendo revisões de um tópico, escritos pelos diversos especialistas da respectiva área, podem ser usados separadamente. De maneira geral, todos são bastante acessíveis, pois contêm uma pequena introdução e, às vezes, um resumo das conclusões obtidas e perspectivas para pesquisas futuras. Ocorrem, porém, redundâncias entre alguns capítulos, inevitáveis num livro deste tipo. Por outro lado, é notável que a publicação da sequência completa do genoma de λ , no apêndice 2, ocupa 141 páginas, ou seja: mais de 20% do livro, sendo seguramente desproporcional ao restante do conteúdo.

No meu entender, o livro "Lambda II" é excelente na sua área e certamente é um "must" para todo lambdologista e fagologista. Porém, excetuando-se os referidos capítulos introdutórios, o seu uso como livro-texto é restrito àqueles estudantes com uma base prévia em genética microbiana e molecular, especialmente na área dos fagos.

Jan Dirk van Elsas
Inst. Microbiologia UFRJ
Bloco I - Ilha do Fundão
21944 Rio de Janeiro RJ

MIC/STI - Biogás: guia de informações e bibliografia básica. Brasília, STI/CIT, vol.I E II, 710p., 1983.

É uma publicação que, a exemplo dos trabalhos apresentados anteriormente, aborda aspectos do vinhotto, um subproduto da fabricação do álcool em dois volumes, editados em português, inglês e francês. Fornece informações referentes ao Brasil e alguns países do exterior.

O volume I contém: instituições brasileiras cooperantes e endereços para solicitação de documentos; instituições estrangeiras cooperantes e endereço para solicitação de documentos; referências bibliográficas biogás; índice de assuntos; índice de autores e índice de autores corporativos.

No volume II, encontram-se: patentes; eventos em biogás; periódicos que publicam informações sobre biogás; fontes consultadas; cadastro de entidades brasileiras que desenvolvem atividades em biogás; índice de entidades brasileiras que desenvolvem atividades em biogás e relação de entidades estrangeiras que desenvolvem atividades em biogás.

O trabalho visa difundir e incrementar o uso da tecnologia de geração de biogás.

Marcelo de Camargo Furtado
SBM
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
Cidade Universitária USP
05508 São Paulo SP

Protocolo de Intenções Sociedade Brasileira de Microbiologia e Associação Chilena de Microbiologia

Em 1984, a Sociedade Brasileira de Microbiologia, durante a gestão anterior, através de sua antiga Diretoria representada por seu Presidente Dr. João Salvador Furtado, assinou com a Associação Chilena de Microbiologia, Protocolo de Intenções, de cooperação mútua, proporcionando a promoção de pesquisa e desenvolvimento nas diversas áreas da microbiologia. O objetivo de tal Protocolo, é traçar diretrizes gerais e específicas, para o desenvolvimento das atividades propostas; planejar e organizar grupos de trabalho, para o desenvolvimento de tais atividades; delinear a programação a ser desenvolvida, visando a implantação de tais atividades; formular propostas de planos, programas e projetos, visando maior participação e intercâmbio de profissionais latinoamericanos, através de relações pessoais e institucionais, a fim de gerar conhecimentos inovadores em pesquisa científica e tecnológica; apoiar grupos de pesquisa já existentes ou em desenvolvimento, e a articulação entre os mesmos ou com os demais; criar mecanismos de acompanhamento e avaliação das atividades propostas; desenvolver gestões junto a organizações dos setores públicos e privados, em seus respectivos países e com organizações internacionais, visando a obtenção de recursos e apoio para atividades em microbiologia.

O desenvolvimento das atividades será efetuado através de: cursos básicos, especializados ou de pós-graduação; consultoria nacional e internacional; cooperação institucional e participação em eventos, sob a execução de Maria Therezinha Martins, do Instituto de Ciências Biomédicas USP.

Leila Vasconcellos
SBM
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
Cidade Universitária
05508 São Paulo SP

I Reunião Brasileira sobre Micorrizas. Lavras, MG, 11 a 13 de novembro de 1985.

Sucedendo ao I Encontro sobre Micorrizas realizado em São Paulo e ao II a ser realizado em Brasília em abril próximo, a I Reunião Brasileira Sobre Micorrizas realizar-se-á no Campus da Escola Superior de Agricultura de Lavras, situada no Sul de Minas Gerais.

A reunião objetiva aferir os conhecimentos sobre esta simbiose, discutir sobre pesquisas concluídas ou em andamento no país, traçar metas a serem atingidas e proporcionar a oportunidade para celebrarmos a efetivação deste segmento multidisciplinar das ciências biológicas no Brasil, ao qual um grande número de pesquisadores e estudantes têm dedicado grande parte de seu tempo e que sonham vê-lo como uma tecnologia a serviço das atividades agropastoris aqui desenvolvidas.

A reunião constará de palestras, seguidas de apresentação oral de trabalhos voluntários relacionados com micorrizas, fungos micorrízicos, seus efeitos, importância ecológica e potencial para exploração em larga escala na agricultura brasileira.

Solicitamos sugestões dos colegas.

Informações: Reunião Brasileira Sobre Micorrizas, ESAL, Caixa Postal 37, 37.200 Lavras MG, Fone: (035) 821-3700 (ramal 328)

Comissão Organizadora

Sasson, A. - Las biotecnologias: desafíos y promesas. Paris, Unesco, 338p., 1984.

Este livro constitui-se num excelente apanhado do estágio atual da biotecnologia e vai além quando explora as perspectivas desta "nossa biologia". Os capítulos estão assim divididos: natureza e variedade dos processos biotecnológicos; recombiнаções genéticas e campos de aplicação; híbridos; as biotecnologias e o aumento da produtividade dos vegetais; produções de substâncias úteis por meio de microrganismos - microbiologia industrial; conversão de rejeitos e subprodutos agrícolas e industriais pelos microrganismos; produção de energia pelos microrganismos a partir da biomassa-bioenergia; desenvolvimento da bioindústria e novas perspectivas e novos problemas. Cada um destes capítulos por sua vez é sub-dividido e o autor apresenta os exemplos mais conhecidos e ao mesmo tempo os mais promissores.

O livro é repleto de histórias dos projetos que deram origem a biotecnologia e como foi difícil e lenta a aproximação entre as universidades e as grandes indústrias. Foi necessário um reconhecimento mútuo de limites entre estes dois segmentos que permitiu à biotecnologia alcançar a fase logarítmica de desenvolvimento, que se encontra atualmente pelo menos na América do Norte, Europa e alguns países do Oriente.

Histórias como o desenvolvimento da produção de insulina por *E. coli*, desde as idéias iniciais de transferência de material genético entre seres completamente diferentes, a expressão destes genes por microrganismos para os quais esta substância não tem a menor utilidade, o transporte ou a saída destes produtos das células bacterianas; produtos nunca obtidos na natureza surgiram a partir de cultivos de células vegetais como por exemplo, cardiotônicos, alcaloides, anti-leucêmicos, anti-inflamatórios, etc., abrindo uma ampla perspectiva às indústrias farmacêuticas, são alguns dos aspectos que tornam o livro fascinante para aqueles que acreditam em

ficação científica acontecendo na terra. Esta obra sintética, elaborada de uma maneira clara e didática destina-se a um público com as mais variadas deformações profissionais (biólogos, engenheiros, químicos, médicos, farmacêuticos, agrônomos, etc.) e serve como uma introdução e apresentação das potencialidades da biotecnologia.

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

Sinskey, A.J. - The effects of development in biotechnology on the third world: current status, transfer of technology, future of biotechnology. In: - Seminar/Workshop on Technology Transfer, Management and Development and the Implications of Newly - Emerging Advanced Technologies-UNIDO ID/WG 412/4, January 1984.

O trabalho é dividido em três partes: O estado atual da biotecnologia, transferência de biotecnologia para países do terceiro mundo e biotecnologia e o futuro. Foi apresentado por Dr. Anthony J. Sinskey, professor de microbiologia aplicada, do Department of Nutrition and Food Science, Massachusetts Institute of Technology (MA, USA). Biotecnologia é definida como sendo "a conversão de matérias primas ou substratos, via transformação biológica em biorreatores, para elaboração de produtos". Três importantes considerações, para o desenvolvimento da biotecnologia em países do terceiro mundo, são tecidas. A primeira e mais importante é o capital intelectual, seguindo-se do enfoque em produtos e processos comercialmente relevantes e finalmente a mão de obra, gerenciamento e infraestrutura necessária. Dois desenvolvimentos proveram o "capital" intelectual para a biotecnologia, a tecnologia de rDNA e os anticorpos monoclonais. O autor apresenta os recentes desenvolvimentos ocorridos e discute pontos críticos, como a necessidade de se enfocar a biotecnologia de forma realista, pois ela pode induzir o desenvolvimento de solução de alto custo para problemas triviais.

Segue discutindo sobre aproveitamento de matérias primas (oportunidades para países do terceiro mundo, nas áreas de energia, alimento e indústria química); biotransformação ("o coração de qualquer processo biotecnológico é a biotransformação"). Assim, a escolha do catalizador ideal é importante e depende do produto em questão, do substrato a ser utilizado, dos requerimentos de cofatores e da necessidade ou não de modificações posteriores no produto; biorreatores (necessidade do desenvolvimento de instrumentação e processos de controle adequados para determinação de parâmetros); recuperação e distribuição de produtos (tecnologias novas e mais efetivas são requeridas para o isolamento de compostos orgânicos, de fermentadores).

Os efeitos da biotecnologia no terceiro mundo são caracterizados, destacando-se o papel de gerentes e planejadores capacitados para minimizar os pontos negativos.

Para vencer as barreiras, algumas operações de relevância são necessárias, destacando-se programas de treinamento e programas de pesquisa conjuntos, por exemplo, o Advance Technology Alert System (ATAS) da ONU.

É essencial a formação de massa crítica de cientistas, trabalhando em laboratórios bem equipados, com capacitação para integrar e avaliar oportunidades em diferentes áreas.

O texto é finalizado, com opinião do autor sobre futuros desenvolvimentos na área, divididos em quatro fases. No momento, atravessamos a segunda, com o desenvolvimento de sistemas genéticos, com finalidades industriais. A terceira é caracterizada pelo estabelecimento de sistemas produtores de outras macromoléculas, como polissacarídeos e a quarta pelo desenvolvimento de processos de controle que permitem a regulação efetiva dos sistemas desenvolvidos, em nível industrial.

Roberto Silva Waack
Embrabio - Empresa Brasileira de Biotecnologia
Rua Apinagés, 1081
05017 São Paulo SP

UNDP/WORLD BANK/WHO - Sixth programme report: July 1st, 1981 - December 31, 1982.
Geneva, UNDP/WORLD BANK/WHO, 444p., 1983.

O sexto relato do Programa Especial de Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais inclui: a) uma análise geral, com ênfase nas atividades e progressos obtidos durante o período, e b) capítulos dedicados às atividades e avanços dos grupos de trabalho. Estes capítulos estão muito detalhados e são os seguintes: Tripanosomiases africanas, doença de chagas, lepra, ciências biomédicas, pesquisa social e econômica, e capacidade de força de pesquisa.

Este programa, iniciado pela Organização Mundial da Saúde (WHO) e co-patrocinado pelo Programa de Desenvolvimento das Nações Unidas (UNDP) e pelo Banco Mundial, tem como objetivo intensificar as pesquisas no campo das principais doenças parasitárias tropicais, com a finalidade de melhorar a saúde e o desenvolvimento socio-econômico em países localizados em zonas tropicais e sub-tropicais. O programa tem os seguintes objetivos inter-relacionados: a) pesquisa e desenvolvimento de novos instrumentos e melhorados para controlar malária, esquistossomose, filariose, tripanosomiase, leishmaniose e lepra, e b) fortalecimento de instituições nacionais incluindo treinamento, para aumentar a capacidade de pesquisa de países tropicais afetados por estas doenças.

O relato inclui referências de 800 publicações resultantes do programa e refletem o progresso obtido por cientistas e instituições que colaboram com o programa. Até o momento um total de 1655 projetos foram auxiliados em 88 países; 1125 relacionados com pesquisa e desenvolvimento e 480 para treinamento e fortalecimento de instituições. Um total de 2850 cientistas de 126 países estão participando de projetos, reuniões, consultas e conferências organizadas pelo programa.

Um papel importante do Programa é garantir coordenação entre cientistas e instituições interessadas a encontrar as prioridades estabelecidas pelo programa. Exemplos incluem: padronização de protocolos, estabelecimento de redes de laboratórios para a triagem de agentes quimioterápicos potenciais, fornecimento de reagentes biológicos, estabelecimento de bancos de referência de reagentes biológicos, avaliação multi-centro de testes diagnósticos, inquéritos epidemiológicos internacionais, promoção de interações entre programas de controle e instituições de ensino e pesquisa.

Pesquisa e desenvolvimento sob o Programa especial envolve uma faixa ampla de atividades, de pesquisa aplicada ao campo a estudos básicos de laboratório, tudo idealizado no sentido de melhorias no controle das doenças. Neste sentido, estudos epidemiológicos estão fornecendo: a) melhor conhecimento de prevalência e distribuição das doenças, fornecendo informações úteis no redirecionamento de medidas de controle, b) melhor utilização dos medicamentos existentes, c) progresso quanto a novos agentes terapêuticos, vacinas e medida de controle de vetores, d) colaboração com a indústria, particularmente a farmacêutica, mas sempre cuidando de proteger os interesses do setor público, e) patentes, f) pesquisa de campo - embora numa escala global os resultados nesta área ainda são fracos, estão confiantes que através de vários mecanismos, como o encorajamento de programas nacionais para controle das doenças ou o fortalecimento de unidades de pesquisa, g) esforços no sentido de que os resultados da pesquisa serão aplicados em países tropicais. Vários mecanismos estão sendo adotados para promover a rápida disseminação das novas informações aos cientistas e às autoridades nacionais em saúde pública, através de vários mecanismos (Comitês de Peritos do WHO, grupos científicos, publicações científicas, seminários, etc).

Os avanços alcançados pelo Programa em relação a malária, esquistossomose, filariose, tripanosomiase americana, doença de Chagas, leishmaniose, lepra, são descritos e comentados.

O fortalecimento da capacidade de pesquisa de países tropicais teve continuidade, sendo que a cooperação técnica entre países em desenvolvimento, em pesquisa e treinamento em doenças tropicais também aumentou significativamente, sendo que aproximadamente um terço das publicações do período relatado pertencem a cientistas de países em desenvolvimento.

No momento, a escassez de fundos constitui causa importante de preocupação. Embora vários contribuintes tenham aparecido em 1981 e 1982, entre os quais se inclui o

Brasil, houve uma queda nas contribuições de ordem de 8%, havendo uma esperança que esta tendência reverterá e que fundos suficientes estarão disponíveis para permitir a aplicação prática com sucesso, dos frutos obtidos pelo Programa a nível dos laboratórios.

Paulo Pinto Gontijo Filho
Instituto de Microbiologia UFRJ
Centro de Ciências da Saúde
Bloco I - Ilha do Fundão
21941 Rio de Janeiro RJ

Varmus, H. & Levine, A.J., eds. - Readings in tumor virology. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 113p., 1983.

Trata-se de mais uma fantástica publicação do "Cold Spring Harbor Laboratory", segundo os autores, um companheiro das duas publicações anteriores em vírus tumorais. Destina-se a pós-graduandos e pós-doutorados empenhados no entendimento da biologia molecular dos vírus tumorais. Assim, "Book that helps teachers to teach, students to learn, and practitioners of our art of reminisce productively upon it".

É constituído por 11 capítulos perfazendo o total incrível de 903 páginas, abordando os diferentes aspectos da biologia molecular dos vírus tumorais, tanto de natureza RNA como DNA. Cada capítulo traz uma síntese com o desenvolvimento cronológico da matéria e nas páginas subsequentes as cópias completas dos trabalhos pioneiros, que nem sempre são facilmente disponíveis ao leitor. No final do capítulo há uma relação de referências que datam dos últimos 5-8 anos, estes publicados em revistas disponíveis nas bibliotecas da maioria dos laboratórios.

Trata-se de uma obra que simplifica extraordinariamente o trabalho do pesquisador, embora deva ter sido altamente laborioso para os editores. Porem, em se tratando de personalidades do porte de Levine & Varmus dinâmicos, vibrantes, de inteligência e vivacidade privilegiados seria de se esperar uma publicação da mais elevada categoria tal qual se apresenta.

Cap. 1 - "Origens da virologia de tumores - DNA" - A origem viral de tumores foi descrita por Rous em 1911, que demonstrou a presença de agente filtrável em sarcomas de galinhas. Em 1932, Shope isolou de coelhos um vírus capaz de induzir tumor fibromatoso em coelhos. Durante muitas décadas nenhum agente infeccioso foi isolado de carcinomas de animais domésticos. Os estudos de papilomas de coelhos foram estendidos aos humanos e as informações obtidas são devidas a recentes metodologias de clonagem molecular. A primeira demonstração de que vírus humanos poderia induzir tumores em animais se deve a Trentin & col. (1962). A associação de vírus com câncer fez vislumbrar a possibilidade de imunizar indivíduos contra o câncer, porem, até hoje, somente, se conseguiu proteger as galinhas contra a doença de Marek.

Cap. 2 - "Replicação do vírus de macacos - SV40" - Os vírus SV40 foram isolados de cultura de células de rim de macaco utilizadas na produção de vacinas anti-pólio. Os vírus são constituídos somente por DNA e proteínas, a codificação das proteínas estruturais é devida aos genes localizados na metade do cromossoma e a outra porção codifica os抗ígenos T e t. Uma série de funções importantes são atribuídas ao antígeno T, tais como a iniciação de replicação do DNA, estímulo da síntese do DNA da célula infectada, síntese de enzimas etc. O ciclo produtivo do vírus é discutido em detalhes.

Cap. 3 - "Replicação de adenovírus" - Foram inicialmente isolados de tecidos adenoides, são conhecidos cerca de 31 serótipos humanos, divididos em 5 subgrupos dependendo da homologia de DNA, composição química, propriedades imunológicas e biológicas. Os adeno-grupos 8 são considerados oncogênicos. Os genomas possuem regiões de transcrição precoce e tardia. Acredita-se que o estudo da estrutura do genoma e processamento do mRNA possam constituir um modelo de organização dos genes de eucariotos.

Cap. 4 - "Transformação" - Ao contrário do que se observa usualmente, nestas circunstâncias quanto mais agentes com potencial tumorigênico vêm sendo descritos, está se tornando mais complexo o conhecimento dos eventos que levam a indução de tu-

mor. Os vírus DNA crescem em hospedeiros diferentes daquele em que foram isolados, isto é, são xenotrópicos. As células transformadas contêm DNA viral integrado, porém somente uma porção é transcrita. O problema da regulação é amplamente discutido no sistema de SV40 e polioma.

Cap. 5 - "Herpesvírus" - São conhecidas cinco espécies, herpes simples (HSV 1); HSV (2); Epstein Barr (EBV), citomegalovírus (CMV) e varicela-zoster (VZV). Os vírus HSV 1 e 2 mesmo inativados são capazes de transformar células em cultura. O EBV tem limitações de crescimento "in vitro", dificultando seu entendimento. Aparentemente, o EBV isoladamente é incapaz de causar linfoma ou carcinoma nasofaringeano, necessitando de fatores adicionais como exposição à imunosupressores, predisposição genética e fatores físico-químicos.

Cap. 6 - "Descoberta e crescimento dos retrovírus" - Relata a observação de um agente filtrável por Rous em 1910, isolados de tumores de galinha de uma granja em Plymouth Rock, o fato permaneceu no esquecimento por meio século. Gross (1951) por seleção de camundongos (C3H) obteve transmissão de tumores por inoculação de extratos de células leucêmicas. A descrição de vírus associados com neoplasias em diferentes espécies estimulou o interesse e a especulação da presença de vírus oncogênicos no homem. Poiez & col. (1980), Gallo & col. (1982, 1983) descreveram vírus em células de pacientes humanos com linfoma de célula T e leucemia. Aparentemente, os vírus observados em pacientes leucêmicos no Japão são altamente relacionados (Hiruma & col., 1981). Há consideração acerca dos tipos de ensaio e especificidade de hospedeiro.

Cap. 7 - "Genoma dos retrovírus e genética" - Trata-se de um dos capítulos em que as informações fundamentais datam de 1974 em diante. Salienta que o genoma é um complexo de duas cadeias de RNA, em que as subunidades variam em tamanho de 4-9 kb dependendo da espécie viral. Os retrovírus exibem alterações genéticas com alta frequência; as mutações particularmente as deleções aparecem regularmente em culturas. O grande poliploidismo é analisado. Informações acumuladas permitem propor a existência de quatro tipos de domínios codificando os componentes estruturais - gag - para os抗igenos do cerne; pol - para transcriptase reversa; env - para glicoproteínas do envelope e onc - para as funções oncogênicas. Os genes gag, pol, env, assumem as mesmas posições relativas em todos os membros da família Retroviridae enquanto que a posição do gene onc varia dramaticamente.

Cap. 8 - "Replicação dos retrovírus" - A abordagem é dividida em três partes: a hipótese do protovírus; síntese, integração do provírus e expressão dos genes virais. A proposição de que os vírus RNA replicariam através de intermediários DNA foi da autoria de Temin em 1963, baseado nas propriedades das células infectadas e resposta dos organismos aos inibidores metabólicos específicos (actinomicina D). Foi somente em 1970 que Temin & Baltimore simultaneamente demonstraram a formação de um híbrido intermediário RNA-DNA ou seja, provocaram o impacto da transcriptase reversa - DNA polimerase RNA dependente. A organização genômica é na realidade mais complexa, existem regiões LTR, U e PB tanto na terminal 5' e 3', que não são traduzidas mas são participantes no processo da replicação viral.

Cap. 9 - "Retrovírus endógenos" - Cita a possibilidade de se evidenciar os "endógenos" na forma de provírus em determinados membros de uma espécie, definir sua estrutura, potencial genético, podendo representar 0,1% do genoma de mamíferos. São colocadas várias perguntas, tais como: seriam os endógenos originários dos genes de células normais; qual o mecanismo de inserção nas linhagens germinativas; há benefícios ou desvantagens num organismo carreando provírus?

Cap. 10 - "Patogênese e genes transformantes" - Apresenta uma tabela altamente ilustrativa contendo 17 oncogenes virais identificados de diferentes espécies altamente tumorigênicas, relacionando com as propriedades dos produtos. Amplia discussão da atividade de proteína kinase das proteínas virais é apresentada. Além disso, considera as relações estruturais e funcionais dos genes V-onc e C-onc.

Cap. 11 - "Vírus de hepatite B" - Os vírus de hepatite B (HBV) de genoma DNA são mais comumente transmitidos por inoculação com instrumental contaminado ou transfusão sanguínea. O vírus HBV tem o maior genoma e o mais compacto até hoje descrito. A sua inclusão entre os vírus oncogênicos se deve a relação epidemiológica entre a infecção crônica com HBV e carcinoma hepático; encontro de DNA de HBV integrado nas células dos indivíduos. Os experimentos esbarram com a dificuldade de se propagar os vírus em cultura.

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

Virologistas e tecnologistas para o diagnóstico de AIDS

O Governo dos Estados Unidos, através do US Public Health Service, estabeleceu restrições para a concessão de licença - com pagamento de "royalties" - para o uso da patente de propriedade do National Cancer Institute, para os testes de análise e propagação do vírus linfotrófico III da célula T de humanos (HTLV-III) e que foi relacionado à causa de AIDS (Genetic Engineering News, July/Aug. 1984).

As restrições envolvem o acesso limitado ao estoque de vírus mantido pelas agências governamentais, obrigatoriedade de fornecimento de cepas, para o depósito sob controle governamental e competência científica e tecnológica em três grandes áreas: experiência em manipular retrovírus; (ii) capacitação para "scale up" (mudança de escala em produção do vírus) e distribuição e (iii) experiência em tecnologia de DNA-recombinante. Foram 10, os critérios formalmente estabelecidos pelo Public Health Service: 1) experiência em isolamento, purificação e caracterização de retrovírus; 2) habilidade em cultivo celular em grande massa para produção de vírus e experiência com crescimento de células linfóides; 3) disponibilidade de instalações laboratoriais do nível P-3, para produção de vírus e抗ígenos virais; 4) capacitação das instalações para concentração e inativação de vírus produzidos e manutenção de controle de qualidade sobre o processo de inativação; 5) experiência prévia em ELISA (Enzyme Linked ImmunoAbsorbent Assay), ou em radioimunoensaio, para ampla produção e distribuição de produtos em escala comercial; 6) habilidade para envazamento (embalagem); 7) experiência em avaliação e monitoramento de resultados de ensaios biológicos sob controle do Investigational New Drug Permit do National Cancer Institute; 8) cooperação com o Public Health Service para a coleta, avaliação e manutenção de dados dos testes biológicos; 9) habilidade para produzir material suficiente para testes em escala comercial e 10) competência em tecnologia de DNA-recombinante, com vetores de expressão para a glicoproteína e/ou experiência no desenvolvimento de anticorpos peptídio-específicos.

Nota-se, portanto, que a produção de recursos para diagnóstico de AIDS implicará na existência de considerável competência do ponto de vista físico (instalações, equipamentos), financeiro (para sustentação continuada e sem qualquer tipo de empréstimo, nem justificativas) e, acima de tudo, de recursos humanos altamente qualificados em biologia molecular, bioquímica, fisiologia, imunogenética, engenharia bioquímica, instrumentação (particularmente eletrônica) - orientados para dois tipos de sistemas biológicos: células linfóides e retrovírus.

Quem quiser entrar na corrida ou julgar que deve se envolver no desenvolvimento de produtos, com tecnologia própria, para geração de kit para diagnóstico, poderá valer-se dos critérios estabelecidos pelo US Public Health Service, o que será um bom começo.

João Salvador Furtado
Dept. de Microbiologia
Inst. Ciências Biomédicas USP
Cidade Universitária
05508 São Paulo SP

PRODUÇÃO DE BIOGÁS A PARTIR DE RESÍDUOS ORGÂNICOS

De 6 a 17 de dezembro de 1982, a SBM - Sociedade Brasileira de Microbiologia e o CLAMA - Comitê Latino Americano de Microbiologia Ambiental realizaram o I Simpósio Latino Americano de Produção de Biogás. Durante o evento, foram apresentadas conferências e comunicações a respeito de programas mantidos por agências governamentais e empresas atuantes na área de energia.

Com as dificuldades encontradas para editar textos, relativos às apresentações durante o evento, a SBM iniciou a divulgação de informações fornecidas pelos autores, através da Revista de Microbiologia.

Os artigos não foram submetidos à revisão editorial, na forma adotada para as contribuições regularmente submetidas para publicação na Revista. Por razões operacionais, as matrizes não foram revistas pelos respectivos autores. Consequentemente, a editoração da Revista de Microbiologia antecipa o pedido de desculpas aos autores, pelos erros que vierem a ser introduzidos, inadvertidamente.

PRODUÇÃO DE METANO A PARTIR DE VINHAÇA

Américo Martins Craveiro

Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S.A. - IPT
Caixa Postal 7141
01000 São Paulo SP, Brasil

Introdução

A vinhaça é o efluente gerado pelas destilarias ao se separar o etanol do mosto fermentado. A natureza do mosto empregado, além de diversos outros fatores, determinará a composição da vinhaça, conforme pode ser observado, para vinhaças de processamento de cana-de-açúcar, na Tabela 1.

A produção de vinhaça é de cerca de 12 litros por cada litro de álcool. O aumento previsto da produção de etanol está levando à geração de quantidades enormes e crescentes de vinhaça.

Neste contexto, dois aspectos mais relevantes devem ser analisados:

Poluição - A elevada DBO da vinhaça (da ordem de 20.000mg/l) implica em que uma destilaria de 120.000l de álcool por dia é potencialmente tão poluidora, considerando apenas a vinhaça, quanto os esgotos domésticos de uma cidade de cerca de 270.000 habitantes.

Aproveitamento econômico - Face à grande disponibilidade desse resíduo, deve-se procurar alternativas de seu aproveitamento econômico. Entre elas podemos considerar (3): recuperação de potássio; fertirrigação da cana-de-açúcar com vinhaça in natura ou concentrada; produção de proteína unicelular; produção de biogás.

Atualmente apenas a fertirrigação é praticada no Brasil, especialmente no Estado de São Paulo, no momento quase exclusivamente com vinhaça in natura.

A digestão anaeróbia é um processo que simultaneamente trata a vinhaça e produz biogás.

Os resultados experimentais já alcançados e as vantagens do processo de digestão anaeróbia indicam que este processo poderá ter um papel relevante na solução do problema de disposição e aproveitamento desse resíduo.

Tabela 1 - Características de vinhaças resultantes de mostos de melaço, caldo de cana e mostos de caldo e melaço

Parâmetro	Vinhaça de melaço (g/l)	Vinhaça mista (g/l)	Vinhaça de caldo (g/l)
Nitrogênio (N)	1,18	0,70	0,28
Fósforo (P_2O_5)	0,15	0,11	0,13
Potássio (K_2O)	7,83	4,57	1,22
Cálcio (CaO)	3,64	1,72	0,69
Magnésio (MgO)	0,99	0,66	0,21
Sulfato (SO_4)	6,40	3,73	0,62
Materia Orgânica	63,40	38,00	19,50
ref. 1			
pH	4,2-5,0	4,4-4,6	3,7-4,6
DBO	25	19,8	6-16,5
DQO	65	45	15-33
ref. 2			

Tabela 2 - Resultados obtidos em 1981, no biodigestor de fluxo ascendente para vinhaça instalado na Paisa (jan./abr.)

Composição média da vinhaça		Características do efluente (Dia 93; TRH = 3,1 dias)	
pH	3,80	pH	7,1
Sólidos totais (g/l)	15,6	Sólidos totais (g/l)	8,6
Sólidos voláteis (g/l)	11,6	Sólidos voláteis (g/l)	3,7
Ácidos voláteis (mg/l)	3.116	Ácidos voláteis (mg/l)	100
DQO (mg/l)	19.300	DQO (mg/l)	4.600
DBO (mg/l)	8.575	DBO (mg/l)	370
Nitrogênio (mgN/l)	189	Sulfeto total (mg/l)	50
Fósforo (mg/l)	60	Sulfeto solúvel (mg/l)	0
Potássio (mg/l)	1.026		
Sulfato (mg/l)	813		
Redução de DQO	Total: 76%	Redução de DBO	Total: 96%
	Sobren: 88%		Sobren: 98%
Tempo de Retenç. Hidr. Mínimo:	2,5 dias		
Carga Orgânica Máxima:	7,72KgDQO m ³ dia		
Produção de gás média:	9,2l/ ² vinhaça		
Conversão:	0,48gás/gDQO ad.		
Teor de metano:	55-58%		

As vinhaças de cana-de-açúcar enquanto substratos para a digestão

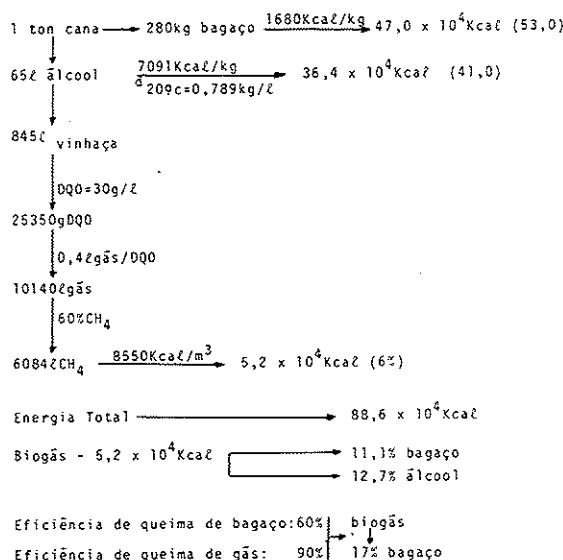
Como se verifica pela Tabela 1, a concentração de matéria orgânica, expressa como DBO ou DQO, varia bastante dependendo do tipo de vinhaça. Isso significa que se um determinado biodigestor operar com uma carga máxima (digamos para exemplificar 15KgDQO/m³ x dia), o tempo de retenção hidráulico mínimo será diferente para os 3 tipos de vinhaça (segundo os dados da Tabela 1, teríamos de 1,0 a 2,2 dias para mista e 4,3 para de melaço).

Outro aspecto a considerar é o teor de sulfato presente. Parte desse sulfato pode ser convertido, no biodigestor, por bactérias redutoras de sulfato, a sulfeto. Quando se atinge dentro do biodigestor concentrações de sulfeto solúvel superiores a 200mg/l, podem ocorrer sérios problemas de inibição do processo, acarretando acúmulo de ácidos voláteis e decréscimo do fator de conversão. Assim, a biodigestão de vinhaças mistas e principalmente de melaço pode ser dificultada por essas elevadas concentrações de sulfato.

O potássio, também presente em concentrações elevadas em vinhaças mistas e mais ainda nas de melaço, pode causar algum problema de inibição.

A matéria orgânica contida nas vinhaças de cana-de-açúcar, apresenta-se predominantemente (da ordem de 90%) na forma solúvel, o que facilita a conversão pelos microrganismos, apesar do baixo pH dessas vinhaças.

Figura 1 - Aumento da produção de energia a partir da cana-de-açúcar com a produção de biogás da vinhaça



O IPT vem realizando diversos estudos de laboratório, com vinhagens mistas, estudando por exemplo a influência da adição de nutrientes (nitrogênio e fósforo), influência de concentrações elevadas de potássio, etc.

Digestão anaeróbia de vinhaça em escala piloto

A viabilidade econômica da biodigestão de vinhaça e de diversos outros efluentes industriais, sempre foi comprometida pela necessidade de elevados tempos de retenção hidráulica, superiores a 15 dias, necessários na operação de biodigestores convencionais.

Todavia com o desenvolvimento de novos tipos de biodigestores de elevada eficiência, esse problema está sendo equacionado.

O biodigestor de fluxo ascendente com leito de lodo é um desses sistemas de grande eficiência, tendo sido aplicado em inúmeros casos com bons resultados.

Este biodigestor tem um decantador interno que decanta os "pellets" de lodo que se formam ao longo do tempo, de forma que não se perde bactérias com o efluente que deixa o sistema.

Forma-se gradativamente um leito de lodo de alta concentração em bactérias na região do fundo do biodigestor, que pode transformar elevadas taxas de substrato, em baixos tempos de retenção hidráulico.

Um digestor deste tipo, com 11m³ de capacidade foi instalado na Penedo Agroindustrial S.A. (PAISA), situada em Penedo, Alagoas, num trabalho conjunto do IPT, IBRASA (BNDE) e PAISA.

Os trabalhos foram iniciados em janeiro de 1981, prosseguindo até abril daquele ano. Ficou-se parado na entressafra, retomando-se a alimentação do biodigestor em janeiro de 1982, prosseguindo-se até maio deste ano.

O biodigestor recebeu inóculo, provindo de um biodigestor de esterco bovino, apenas na 1ª partida, em janeiro de 1981.

O biodigestor não tem sistema de aquecimento, mas é isolado termicamente, o que permite, devido à elevada temperatura ambiente, que o mesmo opere na faixa de 28 a 32°C.

As Tabelas 2 e 3 mostram alguns resultados obtidos nesse trabalho nos anos de 1981 e 1982, respectivamente.

Como se observa, já em 1981, com apenas cerca de 4 meses de operação, alcançou-se uma carga orgânica de quase 8KgDQO/m³.dia, baixando-se o tempo de retenção para cerca de 2,5 dias. Isto foi conseguido mantendo-se elevadas reduções de DQO e DBO.

Na retomada da alimentação, após 8 meses de inatividade, o crescimento da população bacteriana permitiu alcançar-se resultados ainda mais expressivos, elevando-se a carga a valores médios na faixa de 14KgDQO/m³.dia, com valor máximo de até 18,7KgDQO/m³.dia e tempo de retenção mínimo de 1,5 dias. Novamente isto foi alcançado mantendo-se elevadas reduções de DQO e DBO.

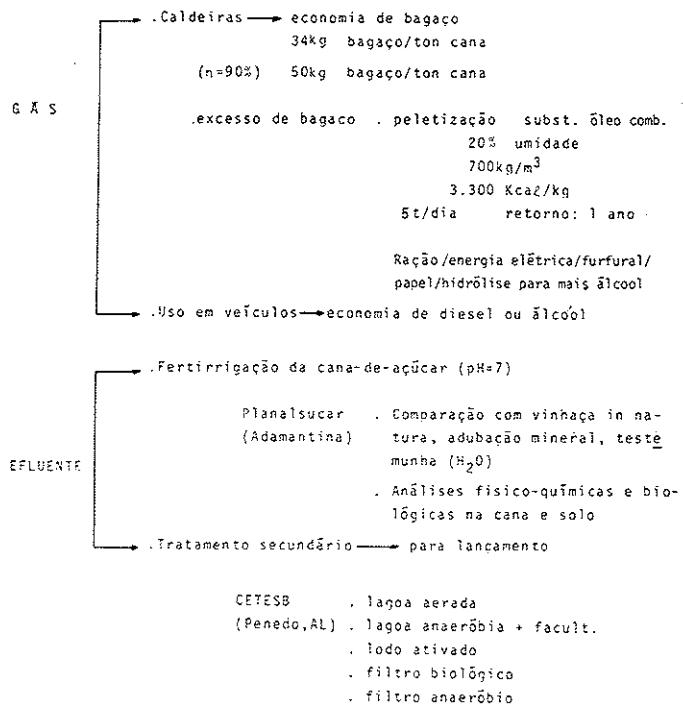
Significado energético e utilização do biogás e efluente do biodigestor

O biogás gerado da vinhaça representa, como mostra a Figura 1, um grande potencial energético.

Tabela 3 - Resultados obtidos em 1982 no biodigestor de fluxo ascendente para vinhaça instalado na Paisa (jan./mai.)

Composição média da vinhaça		Características médias efluente	
pH(a)	3,73	pH	7,3
Sólidos totais (g/l)	25,2	Sólidos totais (g/l)	10,9
Sólidos voláteis (g/l)	19,3	Sólidos voláteis (g/l)	5,2
DQO (mg/l)	31.350	DQO(b) (mg/l)	6.144
DBO (mg/l)	17.070	DBO(c) (mg/l)	918
Nitrogênio (mg/l)	412	Nitrogênio (mg/l)	343
Fósforo (mg/l)	109	Fósforo (mg/l)	108
Sulfato (mg/l)	897	Potássio (mg/l)	1.221
Potássio (mg/l)	1.473		
Redução de DQO Total:	80,5%	Redução de DBO Total:	94,6%
Sobren:	91,4%	Sobren:	95,1%
Tempo de Retenç. Hidr. Mínimo:	1,5 dias		
Carga Orgânica Máxima:	18,7KgDQO m ³ .dia		
Produção de gás média:	13,1% /vinhaça		
Conversão:	0,4gás/gDQOadic.		
Teor de metano:	60-65%		

Figura 2 - Utilização do biogás e do efluente do biodigestor



Como se vê, equivale a cerca de 11% do bagaço total produzido ou até 17%, se considerarmos as eficiências atuais de combustão.

Como mostra a Figura 2, o biogás pode ser usado nas caldeiras, liberando bagaços para outras aplicações ou pode ser usado como combustível em veículos, permitindo economizar diesel ou álcool.

Também na Figura 2 mostra-se algumas idéias em relação à utilização do efluente do biodigestor. Preferencialmente imagina-se seu uso para fertirrigação da cana-de-açúcar. Mas também pode haver situações em que interesse o tratamento secundário do efluente e seu posterior lançamento em cursos d'água ou melhor ainda, sua reutilização na destilaria, como água de lavagem de cana, por exemplo.

O teste agrícola do efluente será feito pelo Planalsucar na região de Adamantina, SP, onde se instalará um biodigestor de 100m³, para vinhaça de caldo de cana, que deve começar a operar em maio de 1983. Esse projeto é um trabalho conjunto IPT/Sopral/Santin e Adálcool.

Algumas alternativas de tratamento secundário serão feitas pela Cetesb num trabalho conjunto com IPT e Paisa. O trabalho será feito na Paisa, ondíc, a partir de dezembro de 1982, retomar-se à operação do biodigestor de 11m³, além de se iniciar a operação de 2 biodigestores de 25m³ cada um, funcionando com o mesmo princípio, agora alimentados com vinhaça mista.

A condução de todos estes trabalhos faz supor que a partir de 1984 já se poderá contar com biodigestores industriais de grande porte instalados no Brasil.

Referências Bibliográficas

- Craveiro, A.M. - Produção de biogás a partir de vinhaça. In: - Simpósio Nacional de Fermentação, 5, Viçosa, MG, 1982.
- Gloria, N.A. da; Santa Ana, A.G. & Biagi, E. - Composição dos resíduos de usinas de açúcar e destilarias. Brasil Açucareiro, 6:78-87, 1973.

3. Lettinga, G.; Velsen, A.F.M. von; Hobma, S.W.; Zeeum, W. de & Klapwijk, A. - Use of the upflow sludge blanket reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. Biotechnology and Bioengineering, 22:699-734, 1980.
4. Onde colocar todo o vinhotto do Proálcool. Química e Derivados, (dez):44-47, 1981.
5. Sheehan, G.J. & Greenfield, P.F. - Utilization, treatment and disposal of distillery wastewater. Water research, 14:257-277, 1980.

BIOGAS TECHNOLOGY IN THE UNITED STATES: AN OVERVIEW

F.G. Pohland

School of Civil Engineering
Georgia Institute of Technology
Atlanta, Georgia, USA

Introduction

One of the greatest challenges confronting the continued development of biogas technology in the United States (U.S.) is that of re-establishing the momentum previously provided by critical energy shortages consequenced by the 1973-74 oil embargo. This momentum was curtailed by ensuing petroleum surpluses, declining oil prices and associated competition between OPEC (the Organization of Petroleum Exporting Countries) members, and the acknowledged goal of the Reagan Administration to transfer much of the monetary support responsibility for further development and commercialization to the private sector. Hence, the future of biogas technology in the U.S. is uncertain and thereby vulnerable to the flow and ebb of energy supply and demand, government funding policies, and the associated enticements provided by the market place.

Historical perspective

During the 1970's, Americans were confronted with gasoline shortages, sharp increases in the price of all types of energy, and shifting government policies, all of which tended to promote developments of biogas technology as the search for alternative energy sources commenced. Overall energy use patterns shifted concomitantly with the greatest reversal noticed in petroleum consumption after the oil embargo (Figure 1). Indeed, the growing appetite for energy of all types tended to stabilize or decrease thereafter, leading to a similar stabilization in production.

Fortunately, the U.S. has always been endowed with large supplies of domestic energy and until 1974, it led the world in crude oil production. However, this production compared to consumption resulted in a shortfall of about 10% which prior to 1970 had been much less and then generally increased commensurate with demand. The impact and ensuing sensitivity to these shortages eventually catalyzed a search for alternative sources of energy and an emphasis on energy conservation which became most noticeable in the late 1970's.

As energy supply and demand changed, so did government attitudes toward influencing the availability, price and use of energy. A host of new government initiatives emerged, including legislation and an equivalent growth in the amount of budgeted resources devoted to energy conservation (Figure 2), research, and regulatory and information programs. Biogas development was one of the primary beneficiaries of these actions through the then (1977) new Department of Energy (DOE) and its Office of Renewable Technology with its Divisions of Geothermal and Hydropower, Energy from Municipal Wastes, and Biomass Energy Technology (14).

Unfortunately, much of the earlier initiative was abandoned, government funding has been drastically reduced, and the DOE focus on biogas development has changed to the point where funding for research and development in conservation and alternative energy sources is destined to decline by as much as 50%. Whether this change in policy (also impacting other agencies) will dramatically alter the gains in biogas technology in the U.S. remains to be seen, but it may be considered a primary causative factor for the present state of flux within the field. For the foreseeable future, already established programs will continue to function largely by their own inertia, with reduced support by government and increased involvement from the private sector.

Current status of biogas technology

Notwithstanding the somewhat repressive circumstances encumbering further development of biogas technology, some progress is being made in the municipal, industrial and agricultural sectors. To describe this progress, it is important to examine the technological options available in these three sectors. Among these, the municipal sector provides examples of both old and new technology ranging from the familiar anaerobic digesters used for sludge stabilization at wastewater treatment plants (Figure 3) to energy recovery systems at sanitary landfills. Indeed, a 1977 survey of 98 municipal wastewater treatment plants within the U.S. indicated that 75% used anaerobic digestion, often coupled with gas recovery and utilization as an energy source for heating the digestion process to either mesophilic or thermophilic process temperatures (18). Gas generation during anaerobic digestion ranges from 0.9 to 1.25 m³/kg of volatile solids biologically utilized with a methane content and heat value averaging from 60% to 75% and 26,000 kJ/m³, respectively. These rather traditional biogas systems are frequently taken for granted, yet they have often provided fundamental understanding for many of the more recent and innovative advances in biogas technology.

As a search for more process and energy efficient systems progressed, new anaerobic microbial process applications have been developed within both the municipal and industrial sectors. These newer anaerobic process applications generally include slurry, contact, packed bed (filter), fluidized bed and/or sludge blanket systems (Figure 4) either singularly or in combination as in the case of the two-phase system which advocates the physical separation of the acid and methane fermentation phases of anaerobic biological stabilization (Figure 5). Biogas recovery has been a major goal supportive of the development of each of these systems, the ultimate impact of which has not yet been realized except in certain industrial applications where energy conservation and recovery provide important economic incentives. Indeed,

Figure 1 - Energy production and consumption in the United States by source of fuel. Adapted from State of the Environment 1982 (19).

Symbols: P = Petroleum; N = Natural gas; C = Coal; ■ = Nuclear power; ▨ = Hydropower, geothermal and other; ▨▨ = Natural gas plant liquids

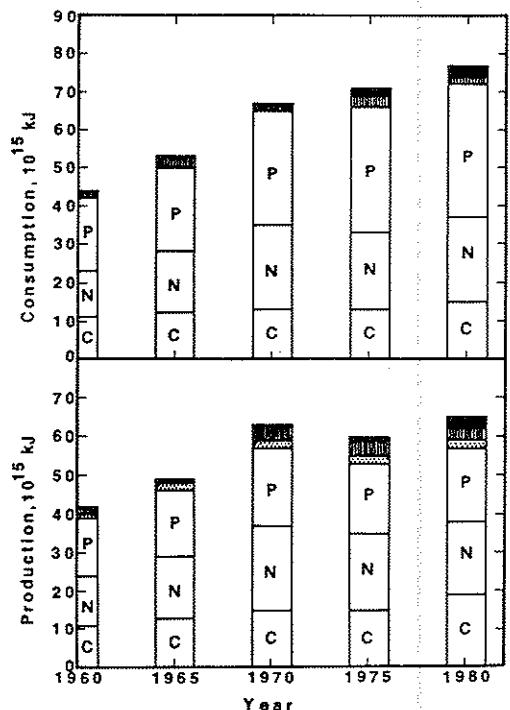
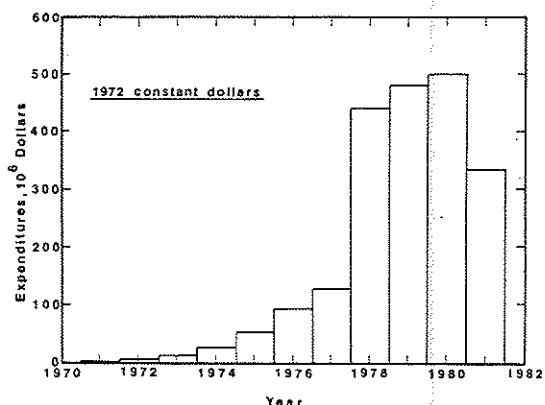


Figure 2 - United States energy conservation expenditures at the federal level. Adapted from State of the Environment 1982 (19)



commercially available systems are appearing and receiving general acceptance for treatment of a variety of industrial wastes (Table 1). In addition, several combination and/or hybrid systems are emerging, including integration of the two-phase concept (13) and coupling of anaerobic digestion (sludges, manure and municipal solid waste) with alcohol fermentation (2) and the production and utilization of electricity (23).

Figure 3 – Schematic diagram of municipal two-stage, high-rate anaerobic digestion

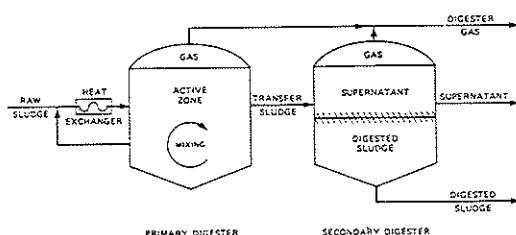


Figure 4 – Anaerobic digestion process modifications

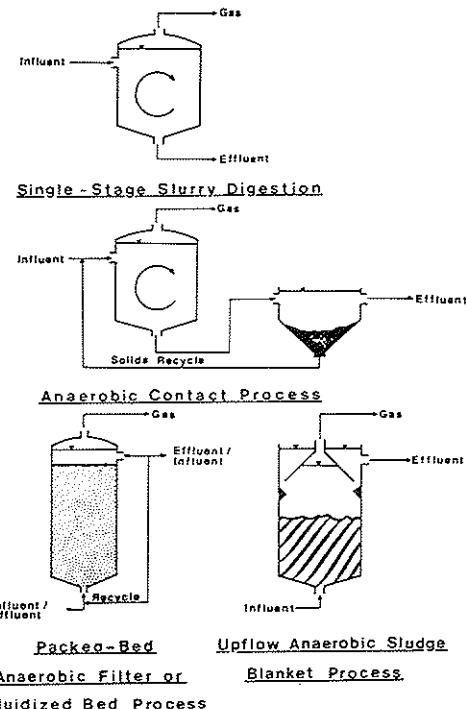
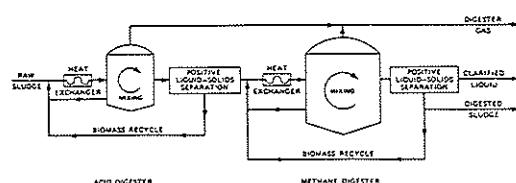


Figure 5 – Schematic diagram of two-phase anaerobic digestion process



In addition to the anaerobic treatment of liquid wastes and slurries, municipalities and industries have collaborated to extract biogas from solid wastes (refuse) after preconditioning and subsequent treatment in anaerobic digesters or after disposal in landfills. The 100-ton/day demonstration plant in Pompano Beach, Florida is still the only operation anaerobic digestion system for municipal solid wastes (MSW) and sewage sludge. Current operating data indicate gas yields of 0.37 to $0.53\text{m}^3/\text{kg}$ of volatile solids (0.19 to $0.27\text{m}^3\text{CH}_4/\text{kg}$) added per day at 10-day retention times (15).

Table 1 – Selected commercially available anaerobic biogas systems for treatment of industrial wastes.

Symbols: * = Commercialized in Europe; licensed in U.S.

System	Process description	Application/Reference
Anitron (Dorr-Oliver)	Upflow, fluidized bed	Grain processing and dairy wastes (4)
Biothane (Joseph Cat Corp.)	Upflow, sludge blanket	Beer, potato starch, potato processing wastes (5,6)
Bacardi Corp.	Downflow, fixed bed	Rum still bottoms (7)
Celrobiotic (Celanese Chemical Co.)	Upflow, fixed bed	Petrochemical wastes (6,8)
IGT-Vimac*	Two-phase, slurry and upflow fixed bed	Soft drink processing wastes (6,9)

Table 2 - Landfill biogas recovery projects. Adapted from Waste age (16). Low energy gas: $\leq 18,500 \text{ kJ/m}^3$; Medium energy gas: $18,500\text{-}28,000 \text{ kJ/m}^3$; High energy gas: $28,000\text{-}37,500 \text{ kJ/m}^3$

Location	Major Participants	Output/Utilization
CALIFORNIA		
Azusa	Azusa Land Reclamation Co.	Low energy gas.
Brea (Blinda Landfill)	Getty Synthetic Fuels, Inc.; Orange County	Gas to power 5300 kW generator; electricity sold to Southern California Edison.
Carson	Watson Biogas Systems; SCS Engineers, Inc.	Medium energy gas to power generators producing electricity for sale to Southern California Edison (1.7 MW).
Corona	Watson Biogas Systems; Lockman and Associates	Medium energy gas to power generators producing electricity for sale to Southern California Edison (5 MW).
Duarte	Watson Biogas Systems; Lockman and Associates	Medium energy gas to power generators producing electricity for sale to Southern California Edison (2.3 MW).
Industry	City of Industry (Industry Hills Convention Center); SCS Engineers, Inc.; National Engineering Co.	Medium energy gas for boiler fuel at Convention Center; ~ 14,000 m ³ gas/day.
Los Angeles	Genstar Gas Recovery Systems, Inc.	Medium energy gas used as supplemental fuel in steam generating plant by Los Angeles Department of Water and Power; ~ 68,000 m ³ gas/day.
Martinez	Getty Synthetic Fuels, Inc.; Acme Fill Corp.; Contra Costa County Sanitation District	Medium energy gas used as industrial fuel by Contra Costa Sanitation District; ~ 56,000 m ³ gas/day.
Monterey Park	Getty Synthetic Fuels, Inc.; Operating Industries, Inc.; Southern California Gas Co.	High energy gas for sale to Southern California Gas Co.; ~ 113,000 m ³ gas/day.
Mountain View (Demonstration Project)	City of Mountain View; EPA; Pacific Gas and Electric Co.; DOE; Gas Research Institute	High energy gas for use by Pacific Gas and Electric Co.; ~ 14,000 m ³ gas/day.
Palos Verdes	Getty Synthetic Fuels, Inc.; Los Angeles County Sanitation District; Southern California Gas Co.	High energy gas for sale to Southern California Gas Company; ~ 21,000 m ³ gas/day.
San Fernando	Getty Synthetic Fuels, Inc.; Browning-Ferris Industries; Newhall Refinery	Medium energy gas used by Newhall Refinery; ~ 28,000 m ³ gas/day.
San Leandro	Getty Synthetic Fuels, Inc.; Oakland Scavenger Co.; Domtar Gypsum America	Medium energy gas used by Domtar Gypsum America; ~ 85,000 m ³ gas/day.
Sun Valley (Sheilton-Arleta Landfill Gas Recovery Project)	City of Los Angeles Departments of Public Works and Water and Power	Low energy gas used as supplemental fuel by Los Angeles Department of Water and Power; ~ 80,000 m ³ gas/day.
Wilmington (Ascon Landfill)	Watson Biogas Systems; SCS Engineers, Inc.	Medium energy gas to power generators producing electricity; ~ 71,000 m ³ gas/day.
ILLINOIS		
Calumet City	Getty Synthetic Fuels, Inc.; Waste Management, Inc.; Natural Gas Pipeline Co. of America	High energy gas for sale to local utility; ~ 71,000 m ³ gas/day.
MICHIGAN		
Riverview	Watson Biogas Systems; SCS Engineers, Inc.	Medium energy gas for sale to industrial user; ~ 71,000 m ³ gas/day.
NEW JERSEY		
Cinnaminson	Sanitary Landfills, Inc.; Public Service Electric and Gas Co.; Hoeganaes Corp.	Medium energy gas for use by utility and Hoeganaes Corp.
NEW YORK		
Staten Island (Fresh Kills Landfill)	Getty Synthetic Fuels, Inc.; City of New York; Brooklyn Union Gas Co.	High energy gas for sale to Brooklyn Union Gas Company; ~ 140,000 m ³ gas/day.
NORTH CAROLINA		
Winston-Salem	City of Winston-Salem	Medium energy gas used as supplemental fuel in dual-fuel diesel engine to generate electricity for sewage treatment plant.
OREGON		
Oregon City	Rossman's Landfill; CH2M Hill Engineers	Low energy gas; ~ 74,000 m ³ gas/day (gas presently flared).

Figure 6 - Typical landfill methane recovery system. Adapted from NCRR Bulletin (7)

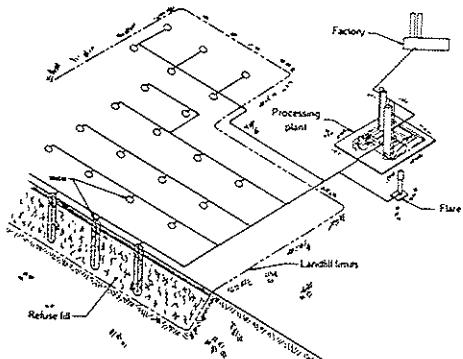
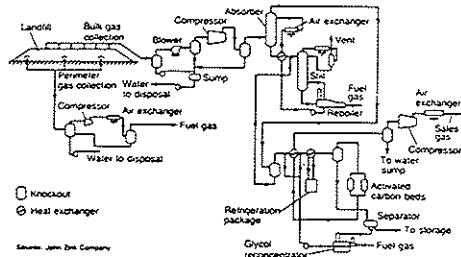


Figure 7 - Landfill gas recovery system. Adapted from Environmental Science and Technology (12)



In contrast to attempts to utilize MSW for energy recovery, there are presently (November 1982) 21 projects that recover biogas from municipal solid waste landfills (16). As indicated in Table 2, these are scattered throughout the continental U.S. with the greatest concentration in California where this technology had its initial applications. The recovery of biogas from landfills requires a system of extraction wells coupled with a processing plant for conversion to pipe-line quality gas and/or for converting the gas to electrical energy (Figure 6). Excess gas is often flared on-site to reduce hazards and eliminate odor problems. Modularized equipment (Figure 7) is becoming available for use at landfills to deliver salable medium energy and high energy gas for commercial use (12). More landfill biogas recovery projects are being planned, and it has been estimated that there are between 1000 and 10,000 landfills in the U.S. that are candidates for profitable gas recovery and utilization with a combined output approaching 6.0 billion cubic meters of methane per year (7). Landfills most likely to offer such recovery opportunities would tend to be large, located near high population centers, and in relatively wet climates where rainfall would encourage active anaerobic stabilization and biogas productivity.

Within the agricultural sector, there have been and continue to be a variety of opportunities for biogas development beyond the treatment of waste slurries and manures. An interesting long-range study, started in 1979 by the Gas Research Institute, is directed toward the technical and economic feasibility of an integrated system for producing, harvesting and converting land-based biomass to methane on a commercial scale. The biomass originally chosen are included in Table 3 and recent results indicate that methane yields of $0.3m^3/kg$ volatile solids added have been achieved from hybrid poplar, sycamore and red alder at long solids residence times which have been reduced by physical or chemical pretreatment (10). Similarly, other studies have concentrated on the anaerobic digestion of water hyacinth (4) and kelp (5) for biogas production with substrate pretreatment and post-treatment of the liquid and solid effluents.

Table 3 - Land-based biomass selected for anaerobic conversion to methane. Adapted from references 10, 11

Herbaceous	Woody
Bermuda grass	Hybrid poplar
Napier grass	Cottonwood
Smooth bromegrass	Sycamore
Johnson grass	Box alder
Kudzu	Loblolly pine
Cattails	Eucalyptus
Bamboo	Silver maple
Giant reed	Black alder

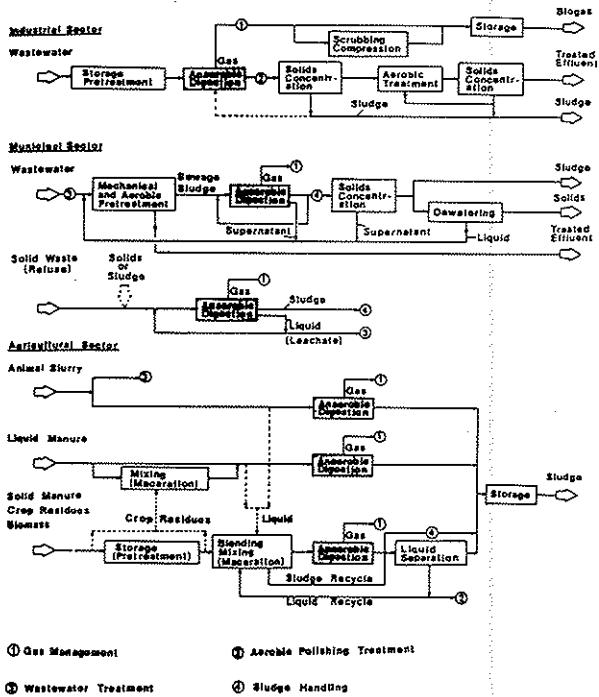


Figure 8 – Anaerobic process applications in the industrial, municipal and agricultural sectors. Adapted from Baader (1)

In comparison to the use of biomass for biogas production, anaerobic treatment of farm residues and manures has experienced only modest growth in the U.S. in the spite of the fact that manure, in particular, has received considerable attention as a logical substrate. On-site operational difficulties, coupled with the tradition of using other more reliable energy sources, have served to dampen enthusiasm for this type of development. For example, smallscale, advanced-design, plug-flow systems (Energy Harvest) have been installed in New York, Connecticut and Arkansas, but the expectations of 1981 for a potential market for 2000 to 4000 such systems (8) have not materialized. However, it was also reported that the largest manure-to-methane plant placed into operation in 1977 in Guymon, Oklahoma for production of $17 \times 10^6 \text{ m}^3/\text{yr}$ of pipeline quality gas and animal feed continues to operate, but with only internal use of the biogas as plant fuel. Another large plant also designed to convert cattle manure to about $28,000 \text{ m}^3/\text{day}$ of methane in Lamar, Colorado has been deferred because of gas delivery costs of four times the purchase costs for natural gas in the area. On the other hand, a confirmed cattle feedlot plant in Bartow, Florida, sized to process about $25,000 \text{ kg}(\text{dry})/\text{day}$ of manure, is reported to be capable of producing about $225 \times 10^6 \text{ kJ}/\text{day}$ of fuel gas (6, 11).

Summary and Conclusions

Regardless of the use sector, systems for biogas production have differing requirements and degrees of sophistication. Including the landfill systems previously described, anaerobic biogas systems appear to be firmly entrenched within the municipal, industrial and agricultural sectors of the U.S. economy. Certainly, the general process configurations are known (Figure 8) and are available for further development and implementation. Notwithstanding the apparent lull in governmental initiatives and/or incentives in the U.S., private enterprise has catalyzed a renewed interest in alternative energy sources which should presage a bright future for biogas technology.

Energy Source	Energy Consumption **, kJ x 10 ¹⁵			
	1975	1980	1981	1985
Petroleum ***	34.534	36.191	33.892	31.983
Natural Gas	21.047	21.624	21.329	18.776
Coal	13.530	16.487	16.997	19.547
Hydro	3.338	3.074	2.871	2.781
Nuclear	2.005	2.853	3.068	4.220
Biomass and Waste	1.848	2.725	2.808	3.658
Wood/Wood Wastes	(1.638)	(2.426)	(2.485)	(3.078)
Municipal/Industrial Solid Wastes	(0.137)	(0.197)	(0.209)	(0.425)
Sewage	(0.048)	(0.057)	(0.059)	(0.074)
Agricultural Wastes	(0.024)	(0.032)	(0.035)	(0.049)
Alcohol Fuels	-	(0.009)	(0.015)	(0.022)
Landfill Methane	(0.001)	(0.004)	(0.005)	(0.010)
Geothermal	0.085	0.128	0.146	0.222
Wind	0.087	0.003	0.004	0.013
Solar	0.001	0.012	0.016	0.054
Total	76.475	83.097	81.131	81.254
% Fossil	90.4	89.4	89.0	86.5
% Nuclear	2.6	3.4	3.8	5.2
% Hydro	4.4	3.7	3.5	3.4
% Biomass	2.4	3.3	3.5	4.5

Table 4 - Distribution of sources of energy for consumption in the United States*.

Symbols: * = Adapted from Resource and Technology Management Corp. (17); ** = Excludes cogeneration and waste heat recovery, purchased electric and steam and net electric imports; *** = Includes natural gas plant liquids and liquefied refinery gases.

Taken collectively, current estimates suggest that energy from biomass and wastes during the 1975-1985 decade will increase from 2.4% to 4.5% of the total energy consumption in the U.S. (17). Therefore, excluding wood and wood wastes, alcohol fuels, and municipal and industrial solid wastes, there exists a potential increase in biogas production from wastewaters, agricultural wastes, and landfills from about 0.1% in 1975 to about 0.16% in 1985. As indicated in Table 4, such contributions to the total energy consumption in the U.S. appear trivial, but when combined and compared to nuclear and hydro power, they are impressive and growing at the rate of about 50% every five years. Renewed energy shortages and concomitant increases in energy costs, coupled with increasing interest in both the public and private sectors, would again serve to stimulate biogas development and thereby make an even greater impact on total U.S. energy resources in the future.

References

1. Baader, W. - Design characteristics of anaerobic digestion systems. In: - Hughes, D.E. & col., eds. - Anaerobic digestion 1981. New York, Elsevier Press, p. 71-87, 1982.
2. Biogas/Alcohol Fuel Project, Illinois Energy, 1:1-2, January 1982.
3. Biothane Digest, 2(1), 1982.
4. Chynoweth, D.P.; Ghosh, S. & Henry, A.P. - Biogasification of blends of water hyacinth and domestic sludge. Proceedings International Gas Research Conference, Los Angeles, California, p.742-755, 1981.
5. Chynoweth, D.P.; Ghosh, S. & Klass, D.L. - Anaerobic digestion of kelp. In: - Sofer, S.S. & Zaborsky, O.R., eds. - Biomass conversion processes for energy and fuels. New York, Plenum Press, p.315-338, 1981.
6. Coe, W.B. & Davenport, A. - Design, construction, and start-up of a fuel gas production system at a large environmental feedlot. In: - Wise, D.L., ed. - Fuel gas production for biomass. Florida, CRC Press, p.173-182, 1981.
7. Eberhart, R.C. & Phillips, L.G. - Landfill methane utilization. NCRR Bulletin, p.89-91, 1981.

8. Energy: new processes harvest farm energy. Chemical Week, 129:41, 1981.
9. Ghosh, S. & Henry, M.P. - Stabilization and gasification of soft-drink waste by conventional and two-phase anaerobic digestion. Proceedings 36th Industrial Waste Conference, Ann Arbor Science, Ann Arbor, Michigan, p.292-300, 1982.
10. Jerger, D.E.; Dolenc, D.A. & Chynoweth, D.P. - Bioconversion of woody biomass as a renewable source of energy. Proceedings Fourth Symposium on Biotechnology in Energy Production and Conservation Biotechnology and Bioengineering Symposium, No. 12. New York, John Wiley & Son, 1982.
11. Klass, D.L. - Energy from biomass and wastes: 1981 update. Symposium Paper, Energy from Biomass and Wastes VI. Chicago, Illinois, Institute of Gas Technology, Chicago, p.1-61, 1982.
12. Landfill gas recovery. Environmental Science and Technology, 17:198A, 1983.
13. Li, A.; Sutton, P.M. & Corrado, J.J. - Energy recovery from pretreatment of industrial wastes in the anaerobic fluidized bed process: First International Conference on Fixed-Film Biological Processes, Kings Island, Ohio, April 1982.
14. Meridian Corporation/PRC Systems Services, Biomass Energy Technology Program Summary, DOE/ET/20647-1. Washington, D.C., U.S. Department of Energy, 1982.
15. Mooiji, H.P. & Streit, M. - A.S.E.F. solid waste to methane gas. Pompano Beach, Florida. Report to D.O.E., 1982.
16. Resource recovery activities. Methane recovery from landfills. Waste Age, 48-50-52, 1982.
17. Resource and technology management corporation. Alternative energy data summary for the United States, Vol. 3, 1981-1985. Near Term Projections, Energy Consumption by Sector, 1982.
18. Sludge handling and disposal practices at selected municipal wastewater treatment plants, MCD-36. Washington, D.C. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water Programs, 1977.
19. State of the Environment 1982. Washington, D.C. The Conservation Foundation, p.429, 1982.
20. Sutton, P.M. - Dorr-Oliver's fixed film and suspended growth anaerobic systems for industrial wastewater treatment and energy recovery. Proceedings 37th Industrial Waste Conference, Ann Arbor Science, Ann Arbor, Michigan, 1983.
21. Szendrey, L.M. - Bioconversion of strong organic waste streams to methane gas. The Bacardi Corp. Anaerobic Treatment Process. UNICA Workshop on Biogas as an Energy Alternative for the Caribbean, San Juan, Puerto Rico, April 28-29, 1982.
22. Technology for license: anaerobic wastewater process. Chemical and Engineering News, 59:38, 1981.
23. Waste-to-energy plant underway. Brown and Caldwell Quarterly, II:2, 1982.