

Revista de Microbiologia

Pregime



SBM

Sociedade
Brasileira de
Microbiologia

São Paulo — Brasil

Volume 16 Número 3 Jul.-Set. 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). Abreviações bioquímicas devem seguir, essencialmente, as regras de IUPAC-IUB (J. Biol. Chem., 241:527, 1966). Atividade enzimática deve ser expressa em termos de unidades internacionais (Enzyme Nomenclature, Elsevier Publ. Co., 1965). Para pesos e volumes, devem ser usados os prefixos nano (n) e pico (p), ao invés de 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 da espécie, é adotada e a nomenclatura apresentada no "Bergery'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 Bergery deverá ser mencionada entre parênteses, a primeira vez em que o nome figurar no texto e no resumo.

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

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

A página título deverá conter apenas e tão somente: (i) o título do artigo, usando-se letras maiúsculas somente quando obrigatórias, (ii) o(s) nome(s) do(s) autor(es) com maiúsculas e minúsculas normalmente usadas e (iii) afiliação.

O resumo não deverá ultrapassar 250 palavras. Os trabalhos redigidos em inglês devem ser acompanhados de um título e resumo em português; os redigidos em português e espanhol, de um título e resumo em inglês. O resumo na língua do trabalho e o título com resumo na outra língua devem ser datilografados em página separada do restante do texto.

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

Exemplo:

Weiser, O. L. & Emerson, J. S. — Selective screening for quantitative urine cultures.

Amer. J. clin. Path., 45:649-650, 1966.

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

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

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

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

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

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

Pertence à:

REVISTA DE MICROBIOLOGIA - SBM

Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
Cid. Universitária - USP
05508-900 — 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.

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.cjb.net

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA
VOLUME 16 JULHO-SETEMBRO 1985 NÚMERO 3
REV. MICROBIOL. (S. PAULO), 16(3)

	CONTEÚDO	CONTENTS
Ferraz, C.A.M.; Aquarone, E.; Florenzano, G.; Balloni, W. & Tredici, M.	179 Utilização de sub-produtos da indústria alcooleira na obtenção de biomassa de <i>Spirulina</i> <i>maxima</i> . Parte I - Emprego do anidrido carbônico	Utilization of by-products from alcoholic fermentation industry to biomass production of <i>Spirulina</i> <i>maxima</i> . Part I - Use of the alcoholic fermentation gas
Tauk, S.M	188 Efeito da adição de nitrogênio e fósforo no crescimento de <i>Candida</i> <i>utilis</i> em suco de polpa de café	Effect of the addition of nitrogen and phosphorus on the growth of <i>Candida</i> <i>utilis</i> in coffee pulp juice
Dianese, J.C. & Santos, L.T.P. dos	195 Atividade pectolítica das patovares de <i>Xanthomonas</i> <i>campestris</i> que afetam a mandioca	Pectolytic activity of two pathovars of <i>Xanthomonas campestris</i> affecting cassavae
Attia, R.M.; Gamal, R.F. & Ahmed, S.H.	203 Cinética da proteinase ácida de <i>Aspergillus</i> <i>niger</i>	Kinetic behaviour of acid proteinase from <i>Aspergillus niger</i>
Gomes, M. de F.F.F. & Furlanetto, S.M.P.	211 Salmonelas em amostras de fígado bovino e avaliação da eficiência de meios de enriquecimento seletivo, tempo e temperatura de incubação no seu isolamento	Isolation of <i>Salmonella</i> from beef liver and evaluation of enrichment broths, time and temperature of incubation
Bianco, M.; Costa, S.O.P. da & Bonato, M.C.M.	222 Excreção de protease (gelatinase) como um caráter genético instável em <i>Proteus vulgaris</i>	Protease (Gelatinase) excretion as an unstable character in <i>Proteus</i> <i>vulgaris</i>
Serafim, M.B.; Colli, I.A.G. & Castro, A.F.P. de	224 Avaliação do teste de ELEK modificado, no preparo de espécimes, para detecção de enterotoxina termoestável (STa) de <i>Escherichia coli</i>	Evaluation of the modified ELEK test in the preparation of specimens for the detection of thermostable enterotoxins (STa) from <i>Escherichia</i> <i>coli</i>
Prieto, G.; Martínez, A.; Cepeda, I. de & Urribarri, L. de	226 Frecuencia etiológica de la shigelosis por especie y serotipo en Venezuela	Etiological frequency for species and serotypes of <i>Shigella</i> in Venezuela

Almeida, A.M.P. de; Brasil, D.P.; Melo, M.E.B. de; Leal, C.L. & Almeida, C.R. de	232	Detecção da peste no Estado da Bahia, Brasil	<i>Observations on plague foci in Bahia State, Brazil</i>
Giugliano, L.G. & Giugliano, R.	234	Etiologia das diarréias agudas em Manaus: observações ambulatoriais e na comunidade	<i>Etiology of acute diarrhoea in Manaus: comparison between outpatients and community cases</i>
Watanabe, D.S.A.; Lopes, C.A. de M.; Decarlis, R.M.S.T.; Michelin, L.A. & Montelli, A.C.	240	Sorogrupos de <i>Escherichia coli</i> envolvidos em infecção urinária, em Botucatu SP <i>J</i>	<i>Escherichia coli serogroups involved in urinary-tract infection in Botucatu SP</i>
Pereira, J.A.A.; Cotrim, P.B.S.R. & Suassuna, I.	245	Resistência a antibióticos e íons inorgânicos em <i>Klebsiella pneumoniae</i> de pacientes hospitalizados e não hospitalizados	<i>Resistance of <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolated from hospitalized and non-hospitalized patients to antibiotics and inorganic ions</i>

Informação
Técnico-Científica SBM

247

**UTILIZAÇÃO DE SUB-PRODUTOS DA INDÚSTRIA ALCOOLEIRA NA
OBTEÇÃO DE BIOMASSA DE SPIRULINA MAXIMA. PARTE I - EMPREGO
DO ANIDRIDO CARBÔNICO***

Carlos Augusto Montenegro Ferraz
Eugenio Aquarone

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

Gino Florenzano
Waldemaro Balloni
& Mario Tredici

Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi del CNR
Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica
Università di Firenze
Piazzale delle Cascine, 27
Firenze Italia

Resumo

O uso de gás resultante da fermentação alcoólica, como fonte de carbono para cultivos de *Spirulina maxima*, revelou produtividade média de $0,74\text{gm}^{-2}\text{hora}^{-1}$, significativamente maior que o valor de $0,56\text{gm}^{-2}\text{hora}^{-1}$, observado quando anidrido carbônico puro é usado. Os teores proteicos, em biomassa obtida em 700h de crescimento, foram de 68,1-58,6%, portanto superiores e mais homogêneos do que os 67,9-43,9%, quando a fonte é anidrido carbônico puro. Não houve alteração nas concentrações de lipídios e cinzas, quando os dois tipos de fonte são comparados, mas ocorreu aumento de até 32,2% no conteúdo de carbohidratos, nos controles alimentados com anidrido carbônico puro.

Summary

Utilization of by-products from alcoholic fermentation industry to biomass production of Spirulina maxima. Part I - Use of the alcoholic fermentation gas

The utilization of alcoholic fermentation gas (formed mainly by carbon dioxide) as carbon source to *Spirulina maxima* cultures was studied. The productivity of the cultures that received the analysed gas was $0.74\text{gm}^{-2}\text{hour}^{-1}$, higher than the control cultures, these showed $0.56\text{gm}^{-2}\text{hour}^{-1}$. The protein content of the biomass obtained from alcoholic fermentation gas was higher and more homogeneous than the control (respectively 68.1 to 58.6% and 67.9 to 43.9%). There was an increase in the carbohydrates content in control cultures, until 31.2% but the ash and lipids tenors did not changed significantly during 700 hours of growth.

* Trabalho efetuado dentro do Convênio CNPq (Coordenador Prof. E. Aquarone) e CNR (Coordenador Prof. G. Florenzano).

Introdução

Atualmente, o Brasil é um dos maiores produtores mundiais de álcool etílico, oriundo da cana-de-açúcar. O Proálcool (Programa Nacional do Álcool) tem como objetivo substituir, ao menos em parte, a importação de petróleo, que tem elevada participação na dívida externa brasileira. Após 1977, o álcool produzido começou a ser utilizado em automóveis como combustível. Atualmente, cerca de 80% dos automóveis novos comercializados são feitos para utilizar álcool. Naturalmente este tipo de projeto apresenta dimensões gigantescas. A safra de cana-de-açúcar em 1982/1983 foi 171×10^6 ton, que forneceu $9,5 \times 10^6$ ton de açúcar e 5×10^9 litros de álcool etílico (1).

No processo fermentativo dessa safra ocorreu produção de 4×10^9 kg de anidrido carbônico e $6,0 \times 10^{10}$ litros de vinhaça, o resíduo da destilação do mosto fermentado. Este material é altamente poluente, mostrando elevados valores de DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) e DQO (Demanda Química de Oxigênio) se comparado aos valores obtidos a partir de materiais amiláceos (2, 7).

O anidrido carbônico é liberado na atmosfera, não sendo recuperado pela indústria, por razões econômicas. O emprego do anidrido carbônico (CO_2), uma fonte de carbono, utilizável por microrganismos fotossintéticos representaria a recuperação de um subproduto e a obtenção de biomassa de elevado valor nutritivo tanto para animais quanto para o homem (6, 11). Cada grama de biomassa fotossintética produzida necessita de 1,8g de anidrido carbônico (5). Além disto a recuperação do álcool, que é normalmente arrastado pelo CO_2 ($\approx 1\%$ do total produzido) aumentaria a rentabilidade do processo.

O CO_2 obtido seria então utilizado em culturas de cianobactérias do gênero *Spirulina*, que apresentam as seguintes vantagens:

1) o teor proteico é alto e de boa qualidade, apresentando elevado valor nutritivo e boa digestibilidade (4, 10); 2) as espécies de *Spirulina*, empregadas em cultivos de larga escala (*S. maxima* e *S. platensis*), originárias, respectivamente da África Central e do México, apresentam um ótimo de temperatura de 30°-35°C, encontrado em diversas regiões brasileiras praticamente o ano inteiro; 3) crescimento em elevada alcalinidade, facilitando a solubilização do CO_2 ; 4) dimensões elevadas ($10\mu\text{m}$) e forma espiralada do microrganismo, simplificando o cultivo e separação.

Baseado nos dados expostos, este trabalho tem como objetivo o emprego direto do CO_2 como fonte de carbono, produzido pela atividade fermentativa para o cultivo de *S. maxima*.

Figura 1 - Crescimento de *Spirulina maxima* com anidrido carbônico (A) e com a adição do gás da fermentação alcoólica (B) (ambos em quantidade suficiente para manter pH 10,0)

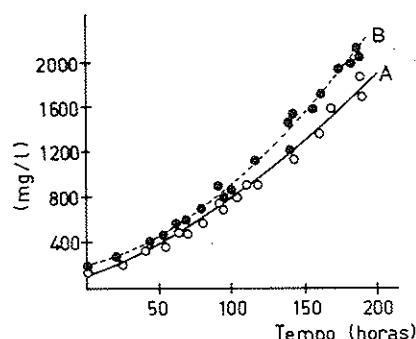
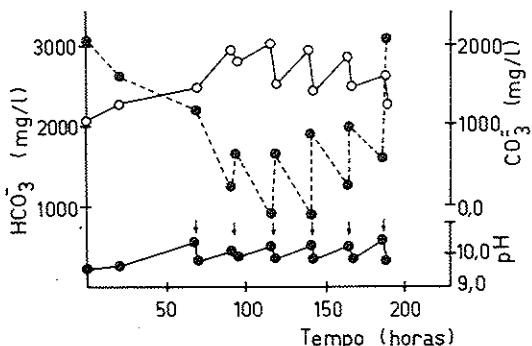


Figura 2 - Concentrações de carbonato e bicarbonato durante o crescimento de *Spirulina maxima* com correção do pH pela adição de gás carbônico (A).

Símbolos: — = CO_3^{2-} ; --- = HCO_3^- ; + = CO_2 adição



Material e Métodos

Microrganismos - *Spirulina maxima* 4mX da coleção do "Centro di Studi dei Microrganismi Autotrofi" (Figura 7) e *Saccharomyces cerevisiae* cepa 20 do "Istituto di Microbiologia Agrária della Università di Firenze", ambas instituições localizadas em Florença, Itália.

Condições de cultivo - (a) Para a cultura de *S. maxima* foram usados tanques abertos ("miniponds") de cloreto de polivinila (PVC), apresentando 0,13m² de superfície e 6,5 litros de capacidade útil (Figura 8). O nível da cultura foi mantido a 5cm pela adição de água destilada, repondo-se as perdas devidas à evaporação.

A movimentação da cultura foi executada por pás rotativas, na frequência de 15 ciclos por minuto. O sistema foi mantido em laboratório, sob iluminação constante (lâmpadas incandescentes de 1000w) que fornecia, na superfície, cerca de 100 μ E.S-1.m⁻² PAR (radiação fotossinteticamente ativa). O sistema foi mantido a 28 ± 1°C; (b) Para a fermentação alcoólica utilizou-se um pequeno fermentador com capacidade de 2 litros, mantido a 30 ± 1°C. O meio de cultura, para *Saccharomyces cerevisiae*, era fornecido de modo semi-contínuo, suficiente para produzir, diariamente, cerca de 12 litros de gás de fermentação.

O gás, predominantemente constituído por CO₂, era mantido em reservatório e injetado na cultura de *S. maxima*, de modo a manter o pH em torno de 10,0 (tanque "B"). Em outro tanque, como referência de comparação, utilizou-se anidrido carbônico de pureza analítica (tanque "A").

Meios de cultura - (a) Para *Spirulina maxima*, utilizou-se meio mineral próprio (9) apresentando meio base (g l⁻¹): KNO₃, 2,5; K₂SO₄, 1,9; MgSO₄.7H₂O, 0,25; CaCl₂.2H₂O, 0,05; K₂HPO₄, 0,5; NaHCO₃, 15,15; Na₂CO₃, 8,9; NaCl, 0,92; microelementos (mg l⁻¹): H₃BO₃, 2,86; MnCl₂.4H₂O, 1,81; ZnSO₄.7H₂O, 0,22; Na₂MoO₄.2H₂O, 0,39; CuSO₄.5H₂O, 0,079; Co(NO₃)₂.6H₂O, 0,049; Fe-EDTA (Fe-EDTA (g l⁻¹: EDTA - Na₂, 29,8; FeSO₄.7H₂O, 24,9 e água destilada q.s.p. 1000ml) 1,0ml.l⁻¹, H₂O q.s.p. 1000ml).

Para se obter resposta mais rápida, sobre a influência do gás de fermentação no meio de cultura, foi importante reduzir a elevada concentração de carbono inorgânico (HCO₃⁻). Para isto, o meio mineral foi modificado, inicialmente, substituindo-se parte do carbono pelo equivalente iônico, em NaCl. Entretanto, ocorreram problemas de precipitação e floculação. Acreditou-se que a relação, entre os diferentes componentes, era muito importante para a estabilidade do meio, daí a redução de todos os componentes a 1/3 de sua concentração original. Este meio mineral, próprio para *S. maxima*, reduzido a 1/3 de seus componentes, foi então utilizado nos experimentos; (b) Para a fermentação alcoólica, com *Saccharomyces cerevisiae*, utilizou-se o seguinte meio (g l⁻¹): extrato de malte, 3,0; extrato de levedura, 3,0; peptona, 5,0 e sacarose, 50,0 (pH=5,0).

Figura 3 - Concentrações de carbonato e bicarbonato durante o crescimento de *Spirulina maxima* com correção do pH pela adição de gás da fermentação alcoólica (B).

Símbolos: — = CO₃²⁻; --- = HCO₃⁻; + = CO₂ adição

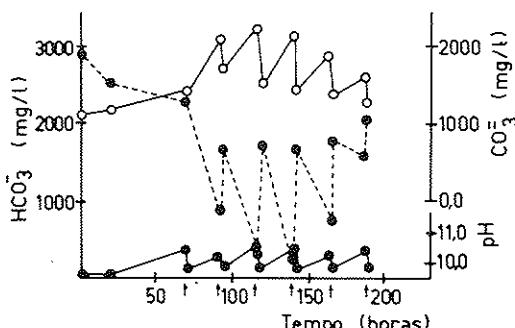
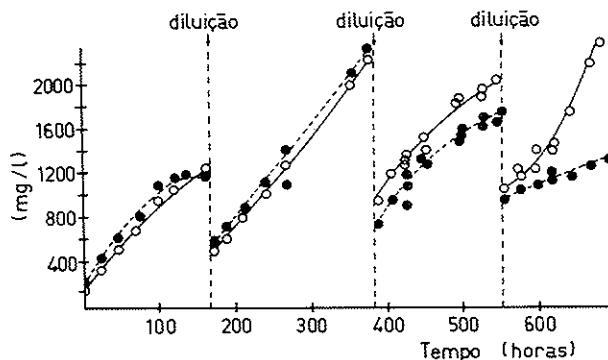


Figura 4 – Crescimento de *Spirulina maxima* com correção do pH pela adição da fermentação alcoólica (B2) e pela adição de ácido clorídrico (A2)

Símbolos: \circ = gás da fermentação alcoólica; \bullet = HCl

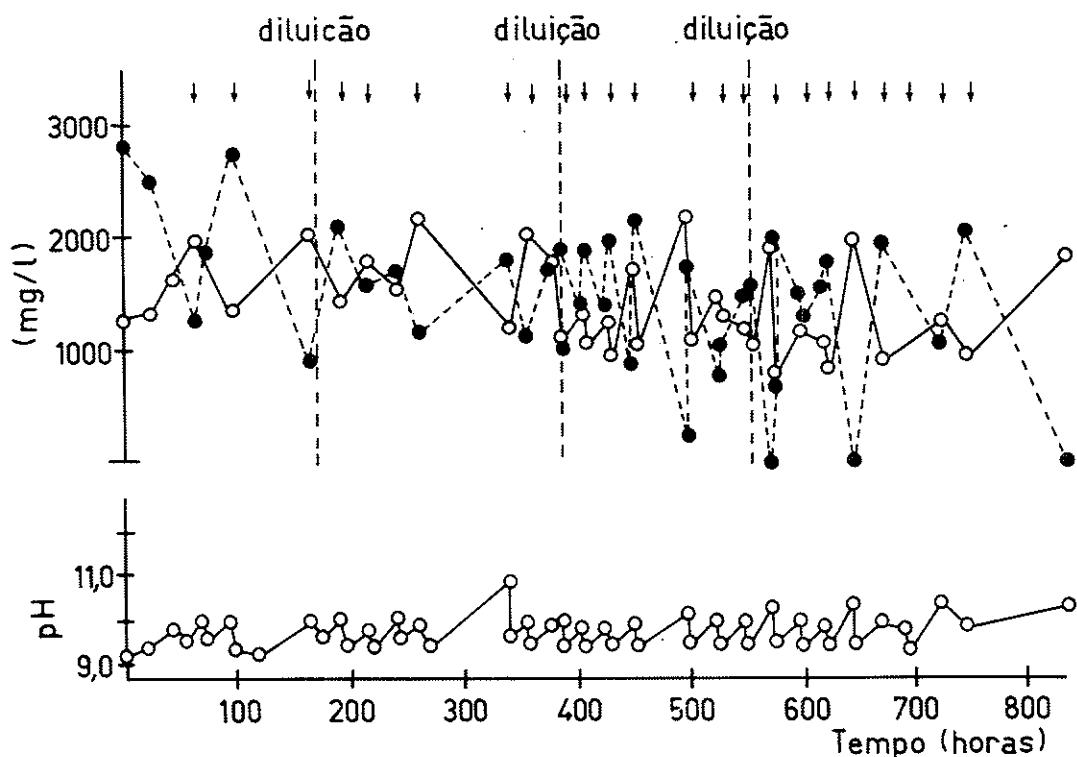


Determinação de carbonato e bicarbonato - Para acompanhar o consumo e reposição das fontes de carbono no meio de cultivo, foi feita a determinação pelo método volumétrico (3).

Avaliação do crescimento - Amostras das culturas de *S. maxima* eram coletadas e filtradas em membranas de nitrato de celulose (8mm de porosidade, Sartorius^R), lavadas duas vezes com solução de cloreto de sódio (2,5%) e, finalmente, com água deionizada, para remoção de sais. As amostras eram então secas, até peso constante, a 105°C.

Figura 5 – Concentrações de carbonato e bicarbonato em culturas de *Spirulina maxima* com adição de gás da fermentação alcoólica (B2).

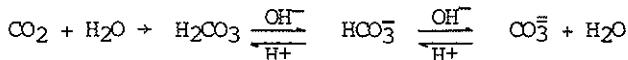
Símbolos: (—) = $\text{CO}_3^{=}$; (---) = HCO_3^- ; + = CO_2



Composição da biomassa - Proteínas totais, lipídios, carboidratos e cinzas foram determinadas por métodos da AOAC (8).

Resultados e Discussão

O meio de cultura para *S. maxima* apresenta, como fonte de carbono, um tampão carbonato-bicarbonato que se desloca, no sentido deste ou daquele íon, em função do pH do meio, como pode ver a seguir.



Depois do anidrido carbônico, bicarbonato é a fonte de carbono preferencialmente assimilada por *S. maxima*. A predominância deste íon assegura o maior crescimento final, com pH entre 9,5 e pH 10,0 (5). Com o desenvolvimento da cultura, a concentração de íons carbonato aumenta e, consequentemente, o pH também. Daí a necessidade de restabelecer-se a reserva de íons bicarbonato, o que pode ser feito pelo fornecimento de anidrido carbônico, repondo o estoque de carbono inorgânico ou pelo simples acréscimo de ácido mineral, corrigindo o pH, sem reposição da fonte de carbono.

A influência de componentes, presentes no gás de fermentação alcoólica, no crescimento de *S. maxima* é vista na Figura 1. A cultura que recebeu apenas CO₂ sintético apresentou uma produtividade total de biomassa significativamente inferior àquela demonstrada pela cultura que recebeu o gás de fermentação. A partir de 100 horas de cultivo, até o término, a cultura "B" de *Spirulina maxima*, alimentada com CO₂ de fermentação, mostrou produtividade média de 0,7g m⁻² hora⁻¹, contra 0,56g m⁻² hora⁻¹ da cultura "A", alimentada com CO₂ puro. Isso mostra que o gás, formado na fermentação alcoólica, representa fonte de carbono inorgânico bem utilizada por *Spirulina*.

Figura 6 - Concentrações de carbonato e bicarbonato em culturas de *Spirulina maxima* com adição de ácido clorídrico (A2).

Símbolos: (—) = CO₃²⁻; (---) = HCO₃⁻; + = HCl

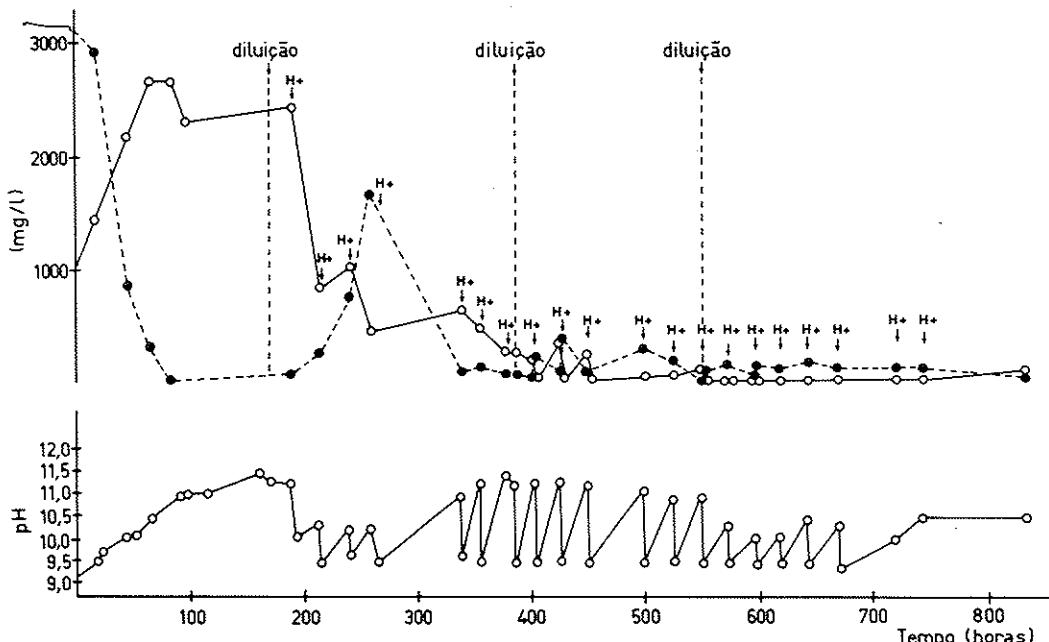
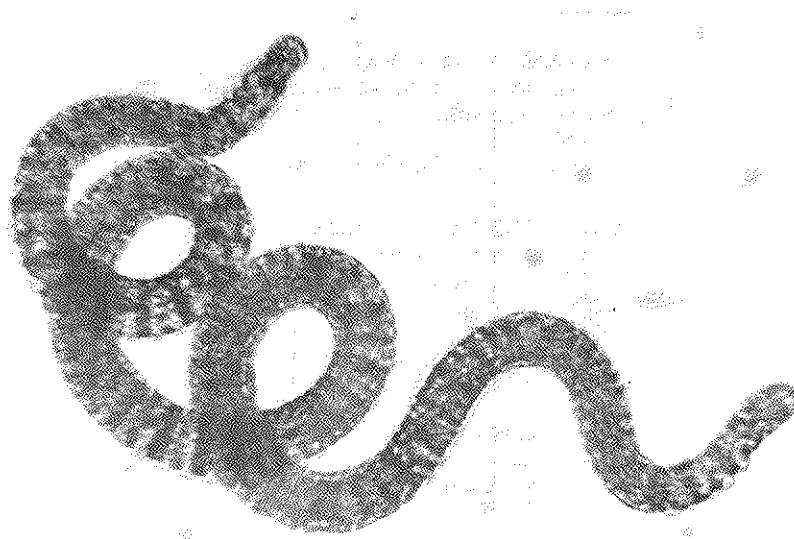


Figura 7 - Microfotografia de *Spirulina maxima* da coleção do Centro di Studi dei Microrganismi Autotrofi



Os níveis de carbonato e bicarbonato nas culturas "A" e "B" são vistos nas Figuras 2 e 3. Não demonstram diferenças significativas, ou seja, a eficiência de correção do pH é similar nos dois casos, indicando que a presença de outros componentes, além do CO₂, no gás da fermentação, não interfere na assimilação do anidrido carbônico.

Nos experimentos, foi comparado o crescimento de culturas de *S. maxima*, recebendo o gás de fermentação alcoólica ou apenas a adição de ácido mineral (HCl), sendo, respectivamente denominados por cultura B2 e A2. O objetivo foi verificar por quanto tempo os nutrientes, presentes no meio, seriam suficientes para sustentar o crescimento de *S. maxima*, sem reposição da fonte de carbono. O único substrato limitante seria a fonte de carbono, pois a cada diluição da cultura, procedimento necessário para se evitar diminuição da disponibilidade de luz para as células, os demais nutrientes eram reintegrados ao meio de cultivo. Em outras palavras, o meio de cultura filtrado era recolocado no tanque de origem e o nitrogênio e fósforo retirados na forma de biomassa eram repostos, através de seus sais solúveis (KNO₃ e K₂HPO₄). Adotou-se, para tais correções, que as porcentagens de nitrogênio e fósforo na biomassa eram, respectivamente, de 10% e 1% (M/M). Os dados do experimento estão nas Figuras 4, 5 e 6.

Nas primeiras 100h de cultivo, tempo necessário para a produção de cerca de 1,0gl⁻¹ de biomassa, embora o tanque A2 não tivesse recebido adição de ácido, o crescimento foi equivalente ao da cultura B2, que recebeu o gás da fermentação alcoólica. Entretanto, decorridas outras 50h a cultura A2 diminuiu a produtividade, devido ao acúmulo de carbonato, tendo atingido pH 11,5. Foi feita então a primeira diluição da cultura, recolhendo-se a biomassa em tela de nylon (malha 30µm) e retornando o filtrado, após as reintegrações de nitrogênio e fósforo. A partir de então iniciou-se a correção do pH, em ambas as culturas. Com isto, os níveis de bicarbonato mantiveram-se equivalentes e o crescimento foi proporcional, em A2 e B2, até 380h de cultivo, momento em que se procedeu à segunda diluição.

A cultura A2 produziu, em 380h, cerca de 2,3gl⁻¹ de biomassa, apenas com correção de pH. As concentrações iniciais de bicarbonato de sódio e carbonato de sódio, eram, respectivamente, 5,05gl⁻¹ e 2,97gl⁻¹. Existia, assim, uma disponibilidade de, aproximadamente, 1,6gl⁻¹ de carbono total. Como o carbono constitui 48% a 53% da

biomassa cianobacteriana, seria possível a obtenção de cerca de $3,2\text{g l}^{-1}$ de *S. maxima*, sem suplementação de carbono. De fato, após 450h de cultivo, A2 passou a apresentar diminuição na produtividade, se comparada a B2. Embora tivesse havido correção do pH, o nível de bicarbonato tornara-se extremamente baixo e, portanto, limitante (Figura 6). Além disto, embora o pH do meio fosse nitidamente alcalino, a quantidade de CO_2 atmosférico dissolvido era reduzida, não recompondo os níveis esperados de bicarbonato.

Após 550h de cultivo procedeu-se à terceira diluição, depois da qual as culturas A2 e B2 apresentaram nítida redução na produtividade. A perda de condições ótimas para o desenvolvimento de *S. maxima*, inclusive na cultura B2 deve ser encarada como consequência do acúmulo de metabólitos orgânicos, lançados no meio, mais que de carências nutricionais. Embora a cada diluição ocorresse reintegração de nutrientes, o meio não foi renovado nas 700h de cultivo (aproximadamente 1 mês). Nota-se que não existiam diferenças significativas, entre as culturas A2 e B2, até a segunda diluição, quanto à composição da biomassa (Tabela 1). Os dados tabelados mostram que o teor em proteína da biomassa de *Spirulina*, é maior na cultura em que o pH foi corrigido com CO_2 de fermentação. Este comportamento é confirmado, também, no decorrer da cultura, durante a qual se verifica a redução do conteúdo proteico em ambas, com efeitos sempre mais marcados para as culturas que receberam CO_2 de fermentação. Lipídios e cinzas mantiveram seus teores praticamente inalterados, durante todo o experimento. Conclui-se, portanto, que a carência da fonte de carbono gera um desvio metabólico, no sentido do acúmulo de carboidratos.

Quando não ocorria limitação da fonte de carbono, a produtividade, para as culturas tratadas com CO_2 de fermentação, foi de aproximadamente $200\text{mg l}^{-1}/12$ horas luz. Como os tanques apresentavam $0,13\text{m}^2$ de superfície e 5cm de profundidade, a produtividade, expressa em termos de superfície, foi de $10\text{gm}^{-2}/12$ horas de luz. No caso das culturas tratadas com CO_2 puro, os rendimentos, em termos de unidade de superfície iluminada, foi de cerca 8g.m^{-2} em 12 horas de luz. Tais valores correspondem a produtividades médias de, respectivamente, $0,74\text{gm}^{-2}\text{hora}^{-1}$ e $0,56\text{gm}^{-2}\text{hora}^{-1}$. Este dado é menor que os obtidos em culturas ao aberto ($12\text{-}15\text{gm}^{-2}\text{dia}^{-1}$). Embora a iluminação tivesse sido constante, reduzindo as perdas ocasionadas pela respiração noturna, a intensidade luminosa era cerca de 10 vezes menor que a natural (≈ 100 Klux).

Figura 8 - Tanques de cloreto de polivinila com $0,13\text{m}^2$ de superfície e 6,5 litros de capacidade útil para a cultura de *Spirulina*

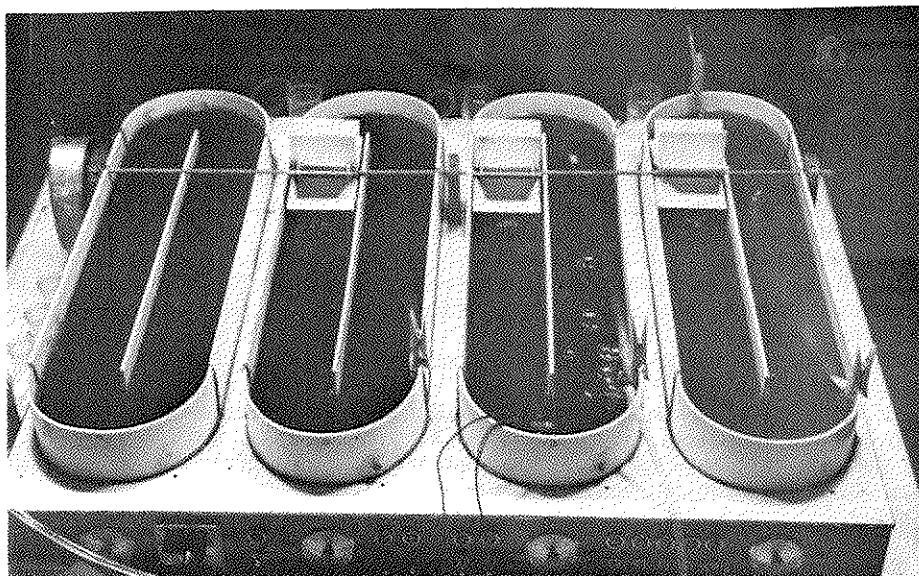


Tabela 1 - Composição da biomassa de *Spirulina maxima* nos diferentes períodos de cultivo.

Símbolos: A₂ = Cultura com correção de pH pelo acréscimo de ácido clorídrico; B₂ = Cultura com correção de pH pela adição do gás da fermentação alcoólica

Componentes	Tempo de cultivo		(0 - 164h)		(164-384h)		(384-554h)		(554-700h)	
	A ₂	B ₂	A ₂	B ₂	A ₂	B ₂	A ₂	B ₂	A ₂	B ₂
Proteína (N x 6,25)	67,9	68,1	65,2	65,9	51,9	62,1	43,9	58,6		
Lipídios	12,3	12,1	12,6	12,8	13,8	13,1	14,0	13,2		
Carboídratos	10,5	10,6	11,3	10,6	19,7	11,0	31,2	14,0		
Cinzas	6,5	6,5	7,0	7,2	7,4	7,5	7,6	7,4		
Total	97,2	97,3	96,1	96,5	92,3	93,7	96,7	93,2		

Conclusões

Spirulina maxima utiliza, preferencialmente, como fonte de carbono, o íon bicarbonato, sendo, portanto, necessária a manutenção do pH 9,5-10,0 que favorece sua formação. Isto pode ser assegurado pela introdução do gás da fermentação alcoólica, contendo, principalmente, anidrido carbônico.

As culturas que receberam o gás de fermentação alcoólica apresentaram crescimento superior ao obtido com a utilização de anidrido carbônico de pureza analítica. O comportamento verificado é devido, ao que parece, à melhor utilização, por parte da *Spirulina*, do anidrido carbônico em estado nascente, típico deste gás da fermentação alcoólica.

Atualmente o maior produtor mundial de *Spirulina* é o México, através da Companhia Sosa Texcoco, que a extraí em condições semi-naturais, de lago alcalino, situado próximo à Cidade do México. A produção anual é de cerca de 700ton/ano, vendida, principalmente, para os USA, Japão e Canadá. Se apenas 0,1% do anidrido carbônico, produzido pela indústria alcooleira brasileira, na safra 1982/1983 (4×10^3 ton), fosse utilizado para a produção de biomassa (a relação é de cerca de 2:1 CO₂/biomassa), seriam obtidas 2×10^3 ton de biomassa, de elevado valor nutricional e econômico, representando quase três vezes mais que a produção mexicana. Isto é, toda a produção de anidrido carbônico atual, através das destilarias brasileiras, pode levar à produção de 2×10^6 toneladas da biomassa mencionada.

O programa de pesquisa conjunta prevê a verificação, a nível de instalação piloto no Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da USP, nas condições naturais de luz e temperatura.

Referências Bibliográficas

1. Anônimo - Cana: a força verde. In: - Brasil 83. Rio de Janeiro, Manchete Edição Especial, Bloch Editora, p.46, 1983.
2. Akiba, T.; Fukinbara, T. & Have, E. - Algal treatment of molasses alcohol distillate waste. J. Ferment. Technol., 45:637-642, 1967.
3. American Public Health Association - Alcalinity. In: - Standard methods for the examination of water and waste-water. Springfield, 1976.
4. Balloni, W.; Tomaselli, L.; Giovannetti, L. & Margheri, M.C. - Biologia fondamentale del genere *Spirulina*. In: - Atti del Convegno prospettive della coltura di *Spirulina* in Italia. Firenze, 1980.
5. Balloni, W.; Materassi, R.; Filpi, C.; Sili, C.; Vicenzini, M.; Ena, A. & Florenzano, G. - In: - Il metodo di trattamento a batteri fotosintetici delle acque di scarico. Serie di quaderni monografici AQ/2/21 del Consiglio Nazionale delle Ricerche, 1982.
6. Florenzano, G. - Le proteine delle microalghe a destinazione alimentare. Rev. It. Sost. Grasse, 52:11, 1975.
7. Monteiro, C.E. - Brazilian experience with the disposal of waste water from the sugar cane alcohol industry. Process Biochemistry, Nov:33-41, 1975.
8. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry. 12.ed. Washington, William Horwitz, 1980.
9. Paoletti, C.; Pushparaj, B. & Tomaselli, L. - Ricerche sulla nutrizione minerale di *Spirulina platensis*. Atti XVII Congr. Naz. Soc. Ital. Microbiol., Padova, 1975.

10. Paoletti, C.; Vincenzini, M.; Bocci, F. & Materassi, R. - Composizione biochimica generale della biomassa di *Spirulina platensis* e *Spirulina maxima*. In: - Atti del Convegno prospettive della coltura di *Spirulina* in Italia. Firenze, 1980.
11. Richmond, A. & Preiss, K. - The biotechnology of algal culture: interdisciplinary sciences reviews. Heyden & Son, v. 5, n°1, 1980.

EFEITO DA ADIÇÃO DE NITROGÉNIO E FÓSFORO NO CRESCIMENTO DE CANDIDA UTILIS EM SUCO DE POLPA DE CAFÉ

Sânia Maria Tauk

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

Resumo

Com a utilização da polpa de café prensada como composto para adubação orgânica do solo, resulta um filtrado da prensagem e rico em açúcar e nitrogênio. Esse suco de polpa foi utilizado como meio de cultura para *Candida utilis*, inicialmente contendo concentrações constantes de açúcar (5g/l), pH 4,5 e diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo suplementados com adição ao meio de substâncias como sulfato de amônia e ácido fosfórico, respectivamente. Os diferentes cultivos foram realizados em fermentadores de 7l mantidos em condições ambientais constantes de temperatura a 30°C; aeração 1ppv e agitação de 250rpm. O inóculo utilizado foi de 15% do volume final da cultura no fermentador. Nestas condições, no meio de suco de polpa a relação ótima de açúcar: N:P obtida foi de 40:1:0,1 (para melhor crescimento da levedura).

Summary

Effect of the addition of nitrogen and phosphorus on the growth of Candida utilis in coffee pulp juice

A liquid rich in sugars and nitrogen is derived from residuals after coffee pulp is pressed and composted for use as an organic fertilizer. The liquid from coffee pulp was used as a culture medium for *Candida utilis*. Characteristics: 5g/l of sugar; pH of 4,5. Nutrients were provided by the addition of ammonium sulfate as a nitrogen source, and phosphoric acid as a phosphorus source. These cultures were performed under constant conditions: temperature of 30°C; aeration of 1ppv; agitation at 250rpm and innoculation at 15%. In these conditions, the best growth of yeast in coffee pulp juice was at a relation from total sugar: N:P of 40:1:0,1.

Introdução

Este trabalho foi realizado na cidade de Guatemala, Guatemala C.A., constituindo parte de um projeto mais amplo sobre o estudo de aproveitamento da polpa de café, na tentativa de minimizar os problemas de poluição ambiental decorrentes do acúmulo deste resíduo durante o beneficiamento do café.

Uma das alternativas de utilização da polpa de café é transformá-lo em composto para aplicação no solo como adubo orgânico. A polpa contém alto teor de potássio, elemento de grande importância para o solo, porém, a maior dificuldade de aplicação

desse resíduo está baseada em seu alto teor de água (2). Então surge a necessidade de diminuir este teor, utilizando-se para isto uma prensa hidráulica, resultando a polpa prensada e um suco de polpa cuja composição em base ao peso seco consiste em: açúcar total, 77,0%; N Kjeldahl; 2,6%; polifenóis, 3,4% e cafeína 1,2%, sendo que um tratamento prévio enzimático, utilizando enzimas pecticas comerciais produz aumento do teor de açúcar total e de N no suco (14).

Tem sido proposta a utilização da polpa de café ou de seu suco na produção de proteína microbiana (3, 9, 15, 19). Entretanto, estes estudos, não foram realizados com suco de polpa obtido em prensa hidráulica ou para o uso deste na produção de proteína de levedura.

A composição de leveduras produz características especiais aos alimentos que as contêm. Podem ser usadas para melhorar o valor nutritivo, a textura e o sabor, utilizando-se hidrolisados e autolisados (18).

Entre as leveduras, *Candida utilis* tem sido a mais estudada e portanto já foram definidos diversos parâmetros de seu crescimento a partir de diferentes substratos (5, 6, 21, 22, 23). Alguns substratos foram citados, quanto à produção de *C. utilis* seca, suas características e o potencial em nível industrial (5); economia de produção, sua qualidade, custo e aceitabilidade (14) e da análise econômica dessa aplicação (7).

A partir dos resultados citados na literatura, procurou-se verificar a possibilidade de crescimento e rendimento de *C. utilis* em suco de polpa de café, como uma das alternativas de utilização desse substrato, que constitui um dos problemas do beneficiamento do café por via úmida, não usual no Brasil.

A necessidade de suplementação de N e P, para o crescimento da levedura, em diferentes meios de cultura, foi verificada (8, 16). Consequentemente, o objetivo foi determinar as concentrações ótimas dos elementos como fatores nutricionais suplementares para o aproveitamento da polpa com vistas à produção de proteína microbiana, por *C. utilis*.

Figura 1 - Cultivo de *Candida utilis* em suco de polpa de café com 5g/l de carboidrato, pH inicial de 4,5, agitação de 250rpm, aeração de 1ppv, em temperatura de 30°C e composição de nutrientes de 20:1,0:0,1, respectivamente de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e H_3PO_4 . Fermentador 1.
Símbolos: — = Biomassa; --- = pH; -.- = Açúcar total; ... = N total

Material e Métodos

Utilizou-se linhagem de *C. utilis* mantida, na Divisão de Microbiologia do ICAITI, Guatemala, C.A., em meio de malte a 40°C.

Os meios utilizados foram pasteurizados a 85°C, por 15 minutos e rapidamente refrigerados, até temperatura ambiente. O controle de contaminantes realizou-se através de exames microscópicos no plaqueamento de amostras, em meio de ágar nutriente. O filtro de ar dos fermentadores e os acessórios do sistema de refluxo do meio foram esterilizados a 120°C, a 1 atm por 20 minutos.

As condições de cultivo foram mantidas constantes, para os diferentes experimentos: temperatura 30°C, pH inicial do meio 4,5; aeração de 1ppv; agitação de 250rpm e inóculo de 15%.

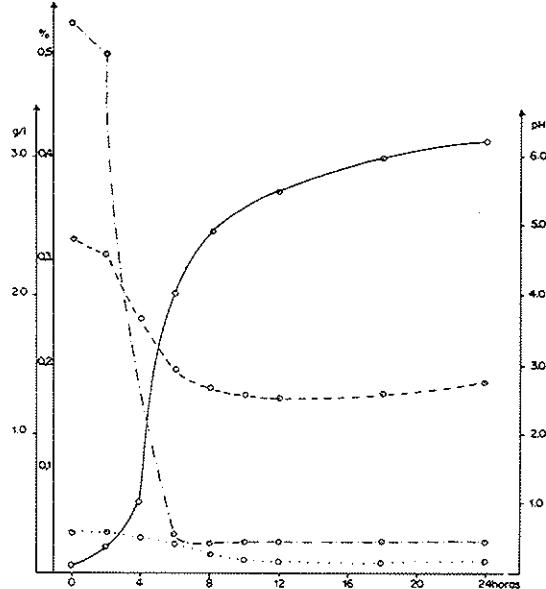


Tabela 1 - Determinação da velocidade específica de crescimento (μ) e do rendimento (Y) de produção de *C. utilis* em meio de suco de polpa de café com 5g/l de açúcar total e com diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo, suplementados, respectivamente, com sulfato de amônia e ácido fosfórico

Proporção de açúcar total:N:P	Rendimento (Y)	Velocidade específica de crescimento μ (h^{-1})
20:1:0,1	0,54	0,428
40:1:0,1	0,50	0,381
60:1:0,1	0,40	0,225
80:1:0,1	0,37	0,164

Considerando que na literatura encontra-se que a melhor fonte de N e P, para crescimento de *C. utilis* consiste respectivamente no sulfato de amônia e ácido fosfórico (17), essas substâncias foram utilizadas para a suplementação dos elementos, no meio de suco de polpa. Essa suplementação foi realizada de tal modo que as proporções entre açúcar total:N:P mantiveram-se nas seguintes relações: 20:1:0,1; 40:1:0,1; 60:1:0,1 e 80:10,1.

Considerando-se que a concentração de açúcar total sempre foi constante, isto é, 5g/l de meio, os estudos foram realizados com concentrações descendentes de N e P.

As amostras de 100ml foram coletadas em tempos de 0, 2, 4, 5, 8, 10, 12, 18, e 24 horas de cultivo, sendo as de 0 hora com as seguintes composições: meio de cultura sem inóculo; cultivo do erlenmeyer e meio de cultura com inóculo. No final de cada cultivo, os meios foram concentrados em evaporador de líquidos, para testes futuros de alimentação animal.

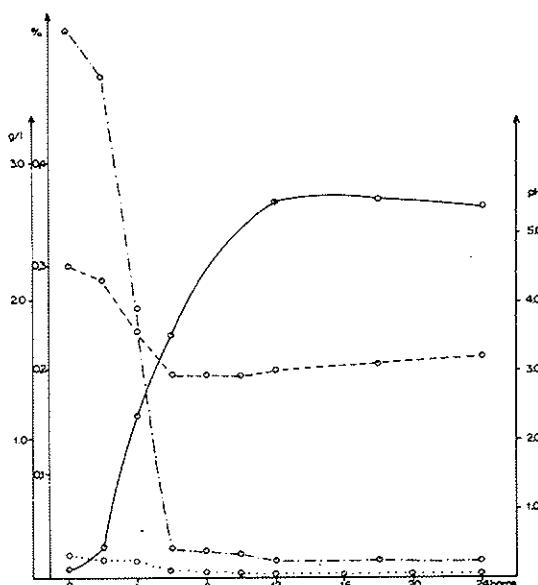
Determinaram-se as biomassas de *C. utilis*, produzidas nos diferentes meios de cultura, centrifugando-se as amostras em centrifuga refrigerada, a 8000rpm e a 50C. As células resultantes foram lavadas com água destilada e novamente centrifugadas, nas mesmas condições anteriores. Obteve-se o peso seco da biomassa, colocando-se o material em estufa a vácuo, mantida a 60°C e, através do resultados, determinou-se a velocidade específica de crescimento (μ) e o rendimento (Y).

O sobrenadante livre de células foi analisado quanto aos teores de açúcar total, N total e pH (1). Em algumas amostras determinaram-se, qualitativa e quantitativamente, açúcares presentes no suco de polpa, por cromatógrafo a gás (1). Nas amostras de 24 horas, dos diferentes cultivos, determinou-se o teor de etanol, em cromatógrafo de gás (1).

Para os testes estatísticos, utilizou-se o teste F, análise de variança e o teste LSD (20) para comparar se as médias foram estatisticamente diferentes ao nível de $\alpha = 0,05$.

Figura 2 - Cultivo de *Candida utilis* em suco de polpa de café com 5g/l de carboidrato, pH inicial de 4,5, agitação de 250rpm, aeração de 1ppv, em temperatura de 30°C e composição de nutrientes de 40:1,0:0,1, respectivamente de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e H_3PO_4 . Fermentador 1.

Símbolos: — = Biomassa; --- = pH; -.- = Açúcar total; ... = N total



Resultados

Os resultados obtidos em meio contendo açúcar: N e P na proporção 20:1:0,1, estão na Figura 1. Nesta se encontram os dados das médias das réplicas sobre a produção de biomassa, teor de açúcar, N total e do pH do meio, durante as 24 horas de cultivo.

A velocidade específica de crescimento (μ) de *C. utilis* nesse mesmo meio, está na Tabela 1.

A produção de biomassa obtida em meio de suco de polpa de café com 5g/l de açúcar e contendo nutrientes na proporção 40:1:0,1 está com os demais fatores determinados na Figura 2. Nesta, os pontos representam as médias obtidas nas réplicas das amostras obtidas durante o experimento. A velocidade específica de crescimento está demonstrada na Tabela 1.

Na Figura 3 e Tabela 1 estão os resultados obtidos em meio de suco de polpa com concentração de nutrientes de 60:1:0,1. No meio contendo nutrientes na proporção 80:1:0,1, foram determinados diferentes fatores que estão representados na Figura 4 e a velocidade específica de crescimento, na Tabela 1.

Na Tabela 1, demonstram-se ainda, comparativamente, os diferentes rendimentos de produção de *C. utilis* em meio de suco de polpa de café com 5g/l de açúcar total e com diferentes concentrações de nutrientes.

Para análise estatística as velocidades de crescimento foram transformadas em unidades logarítmicas por ser a amostragem pequena. Aplicando o teste F, verificou-se que entre os tratamentos houve diferenças significativas, consequentemente o teste LSD (limite da menor diferença) foi aplicado: $\alpha = 0,05$ sendo LSD teórico =

$$0,2294 (2,78 \cdot \sqrt{2} \cdot 0,006812)^2$$

Verificou-se que existem diferenças significativas, entre os resultados obtidos nos cultivos contendo concentrações de nutrientes diferentes. Não houve diferença significativa nos resultados obtidos, utilizando-se concentrações de 20:1:0,1 e 40:1:0,1 e nem entre as concentrações de 60:1:0,1 e 80:1:0,1 mas esses dois conjuntos foram estatisticamente diferentes entre si.

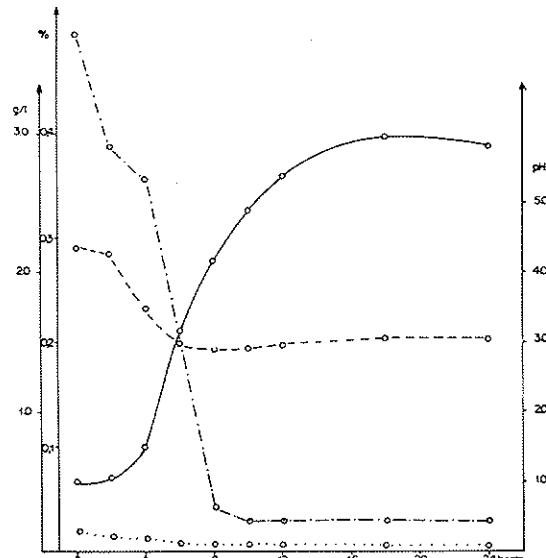
Aplicando-se a análise de variança com G.L = 3 e $\alpha = 0,05$, verificou-se que não houve diferença significativa entre as réplicas de cada experimento realizado.

Discussão

Admitindo-se que a energia de ativação da destruição térmica dos microrganismos seja maior que a de destruição térmica dos nutrientes (4), verifica-se que as condições de pasteurização foram suficientes para impedir a presença de contaminantes. Além disso, a técnica acarretou menor gasto de energia, que seria utilizada para esterilização do resíduo e evita grandes alterações na composição do meio.

Figura 3 - Cultivo de *Candida utilis* em suco de polpa de café com 5g/l de carboidrato, pH inicial de 4,5, agitação de 250rpm, aeração de 1ppv, em temperatura de 30°C e composição de nutrientes de 60:1,0:0,1, respectivamente de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e H_3PO_4 . Fermentador 1.

Símbolos: — = Biomassa; --- = pH; - - - = Açúcar total; ... = N total



A fonte de carbono utilizada nos ensaios foram, principalmente, os açúcares encontrados no suco de polpa de café, no qual através da cromatografia de gás, verificou-se grande quantidade de sacarose, frutose e glicose. Quanto ao N e P, foi necessária uma suplementação, verificada em testes preliminares, a qual foi realizada com sulfato de amônia e ácido fosfórico. As proporções ideais desses elementos, para maior produção de biomassa ou de rendimento do processo, foi de 20:1:0,1 e 40:1:0,1. Entretanto, a relação poderá variar, de acordo com os fatores ambientais de cultivo.

Na utilização de n-alcanos por *C. guilliermondii*, verificaram que a taxa favorável a ser adicionada ao meio de N/P foi de 4:1, sendo aqui utilizada 10:1 (17), assim parece-nos que o resíduo aqui estudado possibilita menor quantidade de N introduzido do que os n-alcanos ou que a *C. utilis* é menos exigente na presença de N do que aquela levedura.

Não foram realizados estudos com relações de açúcar: N:P menores que 80:1:0,1, em virtude dos resultados evidenciarem decréscimo significativo da produção de biomassa microbiana proporcional ao decréscimo desses nutrientes no meio (Tabela 1).

Para outros estudos do cultivo de *C. utilis* em meio de suco de polpa de café, através desses resultados aqui obtidos, optou-se pela utilização de concentrações de nutrientes para 40:1:0,1, para evitar o encarecimento do processo com a introdução de grandes quantidades de substâncias, fontes de N e P. Outro fato, é que, em ambas as proporções, o rendimento foi aproximadamente 0,5, valor este considerado ideal para fermentação de resíduos por leveduras (11) e que as velocidades obtidas não foram diferentes estatisticamente.

Durante o desenvolvimento da levedura no suco, verificou-se alteração da cor do meio contido no fermentador, no período de 4 a 6 horas, correspondendo ao grande consumo de açúcar e alteração do pH. De modo geral, observou-se que o maior decréscimo do teor de N no meio ocorreu após a diminuição dos teores de açúcar total do meio.

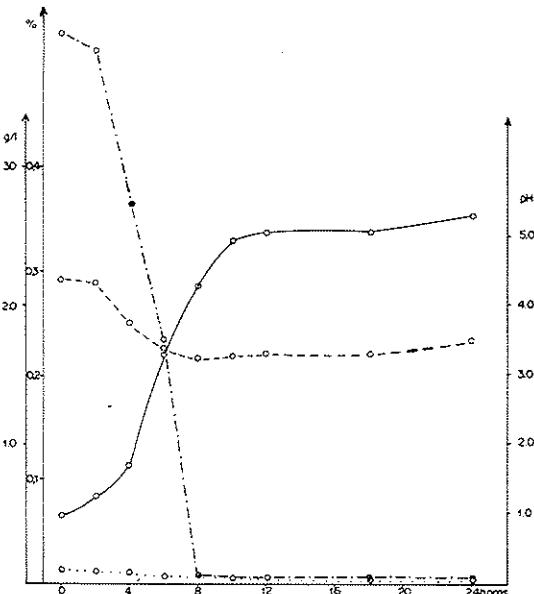
O pH inicial do meio de 4,5 foi utilizado, pois nesse o desenvolvimento bacteriano é difícil, evitando-se o problema de contaminação e também, porque entre 4,0-6,0 o pH favorece melhor a atividade das leveduras (12). Durante o desenvolvimento de *C. utilis* no meio, o pH decresceu para valores de 2,0-3,0, correspondendo as primeiras 6 horas de cultivo.

A aeração nos fermentadores é importante, sendo necessária sua definição, em cada tipo de sistema utilizado (24). Nesses experimentos, a quantidade de ar foi constante, 1ppv, quantidade mínima necessária para o desenvolvimento da levedura no sistema utilizado. Outros experimentos com aeração maior nos fermentadores, nessas mesmas condições e no sistema utilizado, já foram desenvolvidos, mas aqui não serão relatados.

De acordo com os resultados obtidos, evidencia-se que 8 horas de cultivo da levedura em suco de polpa de café foi o tempo ideal para produção de biomassa, porque num tempo superior não houve um aumento no número de células que justifique um

Figura 4 - Cultivo de *Candida utilis* em suco de polpa de café com 5g/l de carboidrato, pH inicial de 4,5, agitação de 250rpm, aeração de 1ppv, em temperatura de 30°C e composição de nutrientes de 80:1,0:0,1, respectivamente de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e H_3PO_4 . Fermentador 1.

Símbolos: — = Biomassa; --- = pH; -.- = Açúcar total; ... = N total



grande gasto de energia, necessário para manter constantes as condições nos fermentadores.

No final do cultivo, as células não foram separadas por centrifugação, porém, o produto final foi concentrado em um evaporador para concentração de suco de frutas, para posterior aplicação como ração animal. Essa tecnologia possibilita maior conservação da levedura e outros materiais que poderão ser produzidos durante o cultivo (10).

Estudos sobre efeito de concentrações maiores de açúcar total no meio e do aumento da aeração nos fermentadores tem sido realizados e resultados já foram obtidos (S.M.Tauk, manuscrito em preparação) para a caracterização dos fatores ambientais que atuam durante o crescimento de *C. utilis* em suco de polpa de café.

Agradecimentos

Agradecemos ao Ministério de Educação e Cultura, Coordenadoria de Aperfeiçoamento da Pesquisa de Ensino Superior (CAPES) e ao Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial, Guatemala, CA.

Referências Bibliográficas

1. Association of Official Analytical Chemists - Official methods of analysis. 11.ed. Washington, D.C., 1970.
2. Bressani, R. - Composición química de los subproductos del café. In: - Reunión Internacional sobre la utilización de subproductos agrícolas y industriales, 1a., Turrialba, Costa Rica, CA. Informe Final - C.R.IICA, p.13, 1974.
3. De León, R.; Calzada, F.; Herrera, R. & Rolz, C. - Fungal biomass production from coffee pulp juice. J. Ferment. Technol., 58:579-582, 1980.
4. Falanghe, H. - Produção de microrganismos. In: - Lima, U.A.; Aquarone, E. & Borzani, W., eds.-Tecnologia das fermentações. São Paulo, Edgard Blucher/Edusp, p.246-285, 1975.
5. González, N.; Kopecky, J. & Votruba, I. - Estudio sobre la composición de la levadura forrajera. Cuba azúcar, Julio-Septiembre, p.27-33, 1975.
6. Henry, D.P. & Thompson, R.H. - Growth of *Candida ingens* on supernatant from anaerobically fermented pig waste: effects of temperature and pH. Appl. and Envir. Microbiol., 37:1132-1136, 1979.
7. Kamel, B.S. - Dates as a potential substrate for single cell protein production. Enzyme Microbiol. Technol., 1:180-182, 1979.
8. Kersulis, A. - Effect of a deficit of phosphorus in the medium on phosphorus metabolites in *Candida utilis*. Biochem. Mokline Kont, p.295-298, 1967.
9. Menchú, J.F. - El aprovechamiento de los subproductos del beneficio húmedo del café. In: - VI Congresso Brasileiro de Café, Ribeirão Preto, SP, Brasil 77, 1978.
10. Pajunen, E.; Vanhatalo, I.; Linko, M. & Pessa, E. - Concentration of yeast extract with a centrifugal film evaporator. In: - Proc. IV Inter. Congress Food Sci. and Technol., 4:390-396, 1974.
11. Powell, M.E. & Robe, K. - Food process. In: - Furia, T.E., ed. - Algae, bacteria and yeasts as food or feed. Critical Rev. in Food Technol., 1:259-262, 1970.
12. Prescott, S.C. & Dunn, C.G. - Industrial microbiology. 3.ed. New York, Mac Graw-Hill Book Company, 1959.
13. Ratledge, C. - The economics of single-cell protein production. Chem. and Ind., 21:918-920, 1975.
14. Rolz, C.- Producción de biomasa de productos renovables. I - Obtención de jugo de pulpa de café. Informe Técnico. ICAITI, Guatemala, p.78-118, 1978.
15. Rolz, C.; Espinosa, R.; Cabrera, S.; Maldonado, O. & Menchú, J.F. - Growth of filamentous fungi on agricultural waste: continuous culture. 6 - Application and new fields. Ed. Soc. of Chem. Ind., London, International Symp. on Continuous Culture, Ed. Soc. of Chem. Ind., p.100-115, 1976.

16. Shamis, D.L.; Gelkonova, N.S. & Sarganova, L.N. - Effect of various sources of phosphorus on the yield and the nitrogen and phosphorus content of fodder yeasts. Tr. Inst. Mikrobiol. Virusol. Akad. Nauk. Kaz., 11:18-24, 1968.
17. Simek, R.; Szechenyi, E.M. & Borgiró-Berdnar, G. - The role of nitrogen and phosphorus in protein synthesis by *Candida guilliermondii* cultivated on n-alkanes. Biotechnol. & Bioeng. Symp., 4:155-160, 1973.
18. Solomons, G.L. - Fermenter design and fungal growth: fungal biotechnology. Academic Press, British Mycological Soc., Series 3, 1980.
19. Sood, S.M.; Sethi, R.P.; Sharma, B.N. & Gah, S.K. - Utilization of coffee waste as source of carbon for the production of fungal protein (SCP). J. Res. Agric. Univ., 16:69-73, 1979.
20. Steel, R.G.D. & Torrie, J.H. - Principles and procedures of statistics. New York, Mc Graw-Hill Book, 1960.
21. Tauk, S.M. - Estudo preliminar da vinhaça como substrato para leveduras. Rev. Microbiol., 7:92-97, 1976.
22. Tauk, S.M. - Efeito do tratamento com ácidos minerais em vinhaça no desenvolvimento de *Candida utilis*. Ciênc. e Cult., 30:350-353, 1978.
23. Tauk, S.M. & Gambale, V. - Efeito da adição de H₃PO₄ em cultura mista de levedura em vinhaça. Brasil Açuc., 91:9-14, 1978.
24. Thayer, D.W. - Woody plants, a renewable fermentation substrate. In: - Goodin, J.R. & Northington, D.K., ed. - Arid land plant res. Probhu Ponkshe, p.307-318, 1979.

ATIVIDADE PECTOLÍTICA DAS PATOVARES DE XANTHOMONAS CAMPESTRIS QUE AFETAM A MANDIOCA

José Carmine Dianese
 & Leila Terezinha Pereira dos Santos

Deptº de Biologia Vegetal
 Universidade de Brasília
 Caixa Postal 153081
 70910 Brasília DF, Brasil

Resumo

Isolados de *X. campestris* pv. *cassavae* da África (Xca) e Colômbia (Xcc) e *X. campestris* pv. *manihotis* (Xcm), causadores da "necrose bacteriana" e da "bacteriose" da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) respectivamente, foram comparados a uma estirpe de *X. campestris* pv. *campestris* (Xc) quanto à habilidade de degradar substâncias pecticas. Xc apresentou alta atividade de transeliminase do ácido poligalacturônico (PATE) e de pectinesterase (PE). Essas enzimas promoveram perda de eletrólitos, maceração e morte celular em tecidos de tubérculos de batata. Xcc mostrou comportamento idêntico, enquanto que Xca e Xcm apresentaram baixa atividade enzimática e não provocaram maceração e morte celular no mesmo bioensaio. Atividade de poligalacturonase foi detectada em Xcm, porém apenas nas primeiras 22 horas de incubação a 30°C.

Summary

Pectolytic activity of two pathovars of Xanthomonas campestris affecting cassavae

Xanthomonas campestris pv. *cassavae* from Africa (Xca) and Colombia (Xcc) and *X. campestris* pv. *manihotis* (Xcm) all three pathogenic to cassava (*Manihot esculenta* Crantz), were compared to *X. campestris* pv. *campestris* (Xc) isolate NRRL-B1459A, based on their ability to produce enzymes which degrade pectic substances. Xc showed high polygalacturonic acid-transeliminase (PATE) and pectinesterase (PE) activities. These enzymes induced leakage of electrolytes, maceration and cell death on tissues of potato tubers. Xcc followed a similar pattern, however, Xca and Xcm had low enzymatic activities upon pectic substrates and were unable to cause maceration and cell death on potato tubers. Xcm presented polygalacturonase activity limited to the first 22 hours of incubation at 30°C.

Introdução

Fungos e bactérias fitopatogênicas podem produzir enzimas que degradam os componentes da parede celular das plantas (8, 24). Embora a produção de enzimas pectolíticas "in vitro" não seja pré-requisito para patogenicidade, a habilidade de um fitopatógeno produzi-las tem sido relacionada com o seu tipo de ação patogênica (1,

2, 5, 12, 13). Assim, os sintomas causados nas plantas, por espécies de bactérias do gênero *Xanthomonas*, são diferentes daqueles induzidos pelos fitopatógenos pectolíticos dos gêneros *Erwinia* e *Pseudomonas*, sugerindo que *Xanthomonas* spp. não têm habilidade para degradar substâncias pecticas (16, 21). Entretanto, muitos dados atestam a atividade pectolítica das *Xanthomonas*. Burkholder & col. (4) já observaram que 38 entre 77 culturas de *Xanthomonas* podiam liquefazer um gel pectíco, embora mais lentamente e menos vigorosamente que *Erwinia* spp., que causam podridão mole. Observações similares estão em outros trabalhos (6, 19, 20, 21, 22). Das 19 estirpes do gênero *Xanthomonas* testadas por Starr & col. (22), 17 apresentavam atividade pectinesterase (PE), oito transeliminase do ácido poligalacturônico (PATE) e nenhuma delas produziu poligalacturonase (PG) ou transeliminase da pectina (PTE). Os mesmos autores (22) purificaram uma endo-transeliminase do ácido poligalacturônico (endo-PATE) de *X. campestris* por precipitação com acetona, cromatografia em DEAE-celulose e CM-celulose. Fawole & col. (7) relataram a presença de PG em *Xanthomonas campestris* pv. *mandirotis*.

O objetivo deste trabalho foi verificar as diferenças entre as duas patovares de *X. campestris* que afetam a mandioca, no que se refere à atividade pectolítica, em comparação com *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* que tem como hospedeiras as crucíferas.

Material e Métodos

Bactérias e meio - As bactérias, pertencentes às patovares *X. campestris* pv. *campestris* (Xc), *X. campestris* pv. *cassavae* da Colômbia (Xcc) e da África (Xca) e *X. campestris* pv. *mandirotis* (Xcm), foram mantidas em cultura por meio de transferências mensais em meio YDC (23) ou em meio 523 (9). Teste de patogenicidade de todos os estirpes foram realizados por Kimura & col. (10) (Tabela 1).

O meio para crescimento das bactérias (523+P) continha: 0,8% de caseína; 0,4% de extrato de levedura; 0,2% de K₂HPO₄; 0,03% de MgSO₄·7H₂O; 0,5% de pectina; 0,5% de polipectato de sódio. Os dois últimos compostos tiveram o pH ajustado para 7,0 e foram autoclavados em separado. Dez mililitros de cultura-semente produzida em 25ml de 523+P, durante 24 horas, foram transferidos para 500ml do mesmo meio e este incubado a seguir a 30°C durante 18 horas a 150rpm, para produção de enzimas em cultura.

Preparação enzimática - Após centrifugação por 20 minutos a 10400g o sobrenadante de culturas de 18 horas foi submetido à precipitação com uma série de sulfato de amônio entre 60 e 90% de saturação a 4°C. As suspensões obtidas foram centrifugadas e o precipitado ressuspandido em água destilada e dialisado com 300 vezes o volume da preparação em água destilada a 4°C.

Cromatografia de troca iônica - DEAE-celulose (Bio-Rad Lab., Richmond, California, 94804, USA) foi lavada com água destilada e as partículas finas eliminadas. O sedimento, ressuspandido com HCl 0,2N por 5 minutos, filtrado, lavado 2 ou 3 vezes com água destilada, filtrado novamente e ressuspandido em NaOH 0,2N antes da lavagem com água destilada e transferência para a coluna a ser equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05M pH 8,0.

A preparação enzimática retirada da dialise teve o seu pH ajustado para 8, colocada na coluna e submetida a concentrações crescentes de NaCl, até 0,5M.

Ensaios enzimáticos - PATE e PTE foram estimadas pelo método do ácido tiobarbitúrico (TBA) (18), pelo aumento dos grupos redutores na mistura de reação (17) ou pela perda de viscosidade (1). Os dois últimos testes também mediram a atividade de PG. PE foi estimada através da titulação com NaOH 0,01N (22).

A mistura de reação para dosagem de PATE continha 0,5% de polipectato de sódio (NaPP) (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) em tampão glicina 0,05M pH 9.5. Usou-se para dosar PTE, 0,5% de pectina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) em tampão acetato de sódio 0,05M pH 5.2 e para PG, 0,5% de NaPP em tampão acetato de sódio, pH 5.2. A proporção foi sempre 0,1ml de substrato e 0,1ml de diferentes con-

centrações de extrato enzimático. A perda de viscosidade foi determinada em viscosímetro Fenske Ostwald 300 contendo 3,5ml de pectina ou NaPP 1,2% com o tampão correspondente a cada enzima. Para PE a mistura de reação continha 1% de pectina, NaCl 0,1M e 10% (v/v) de enzima num total de 10ml. A mistura de reação foi ajustada para pH 7,0 com NaOH 0,01N após 60 minutos de reação.

As misturas de reação foram incubadas a 30°C e como controle usou-se sempre enzima fervida.

Figura 1 - Atividade da transeliminase do ácido poligalacturônico (PATE) estimada pelo teste do ácido tiobarbitúrico (TBA) (-x-) e perda de viscosidade (—) usando-se polipeptato de sódio em mistura com frações enzimáticas resultantes da precipitação dos filtrados de cultura de quatro estirpes de *Xanthomonas campestris* (*X. campestris* pv. *campestris*), *X. campestris* pv. *cassavae* da África (Xca) e Colômbia (Xcc) e *X. campestris* pv. *manihotis* (Xcm) com sulfato de amônio entre 60 e 90% de saturação, seguida de diaálise

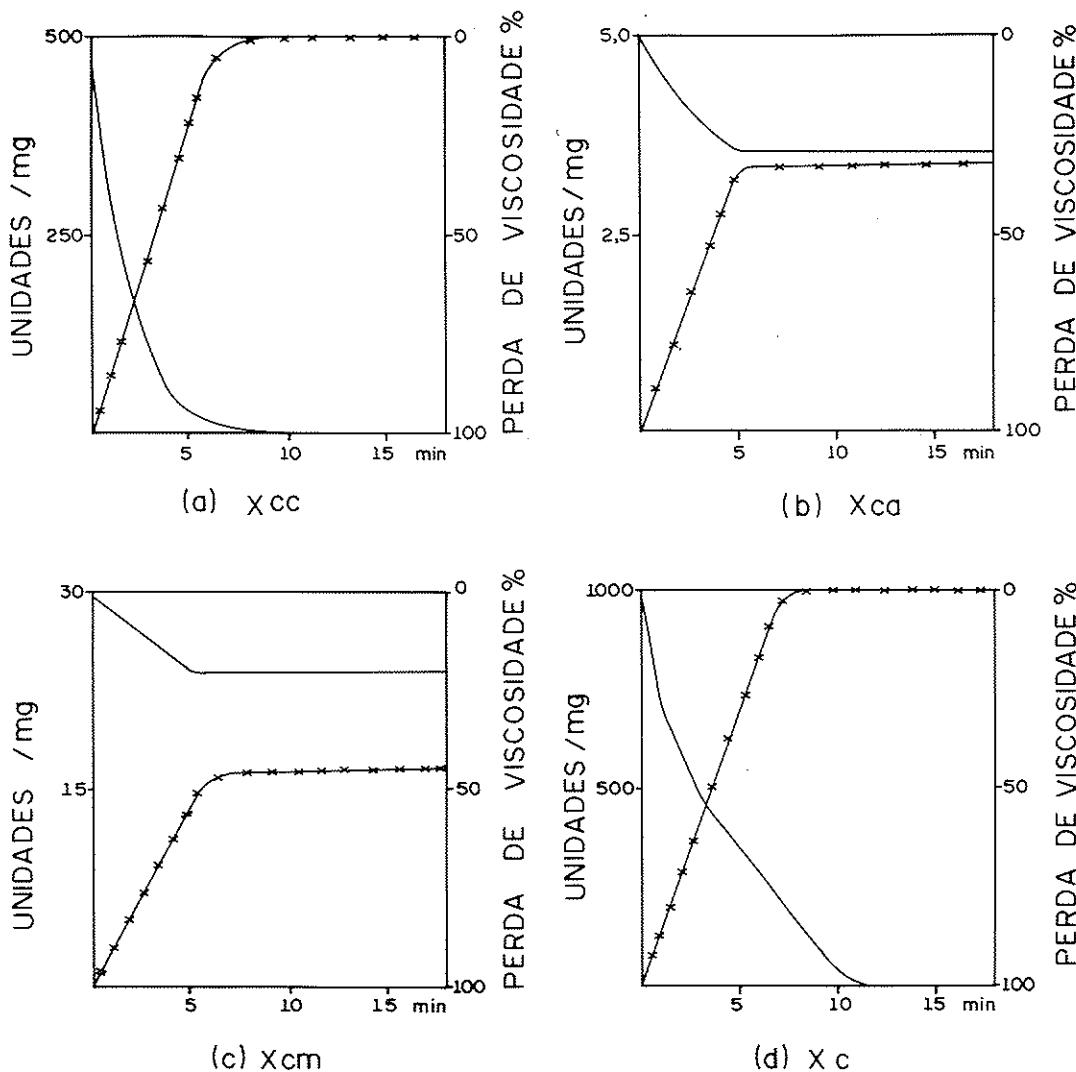
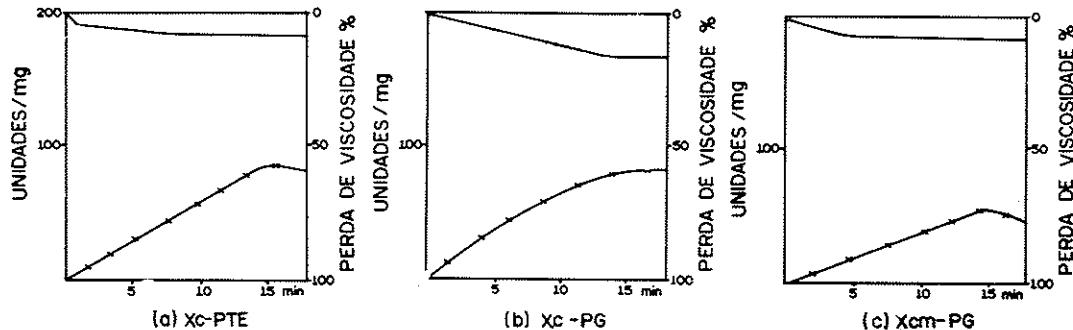


Figura 2 - a) Atividade da transeliminase da pectina (PTE) estimada pelo teste do ácido tiobarbitúrico (TBA) (-x-) e perda de viscosidade (—) de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xc); b) e c) Atividade da poligalacturonase (PG) determinada pelo método de Nelson (-x-) e perda de viscosidade (—) de Xc e de *X. campestris* pv. *manihotis* (Xcm), respectivamente. Usou-se pectina como substrato para determinar PTE e polipeptídeo de sódio para dosar PG no filtrado de cultura de Xc e Xcm



Uma unidade (U) de PATE e PFE, de acordo com Mount & col. (15), foi definida como a quantidade de enzima que causa um aumento de 0,1 em absorbância a 548nm pelo teste do ácido tiobarbitúrico. Para viscosimetria uma unidade (U) foi igual a 10^3 dividido pelo tempo em minutos para que 50% da viscosidade fosse perdida (1).

Unidade de PG foi expressa através de μmol de açúcares redutores liberados por min, por mg de proteína e PE em μmoles de grupos esteres hidrolisados por ml de enzima.

Todos os resultados foram apresentados em unidades por mg de proteína por ml de enzima. Proteína foi estimada pelo método de Lowry & col. (11).

Maceração de tecido vegetal, perda de eletrólitos e morte celular - A mistura de reação para esses estudos consistiu de 12 discos de batata (8mm de diâmetro X 0,4mm de espessura e aproximadamente 0,6g) em 6ml de tampão glicina-NaOH pH 9,5, 6ml de enzima e 0,02% de azida sódia.

A perda de eletrólitos foi registrada em intervalos de 15 ou 30 minutos com um condutímetro modelo RC-16E2 (Beckman Instruments Inc., Norcrone, GA, 30092). A morte celular foi determinada através da retirada dos discos de batata, transferência para uma solução plasmolisante contendo 0,001% de vermelho neutro (BBL, Cockeysville, Maryland, 21030) em KNO_3 0,85M durante 20 min seguida de lavagem em KNO_3 0,85M durante mais 20 minutos.

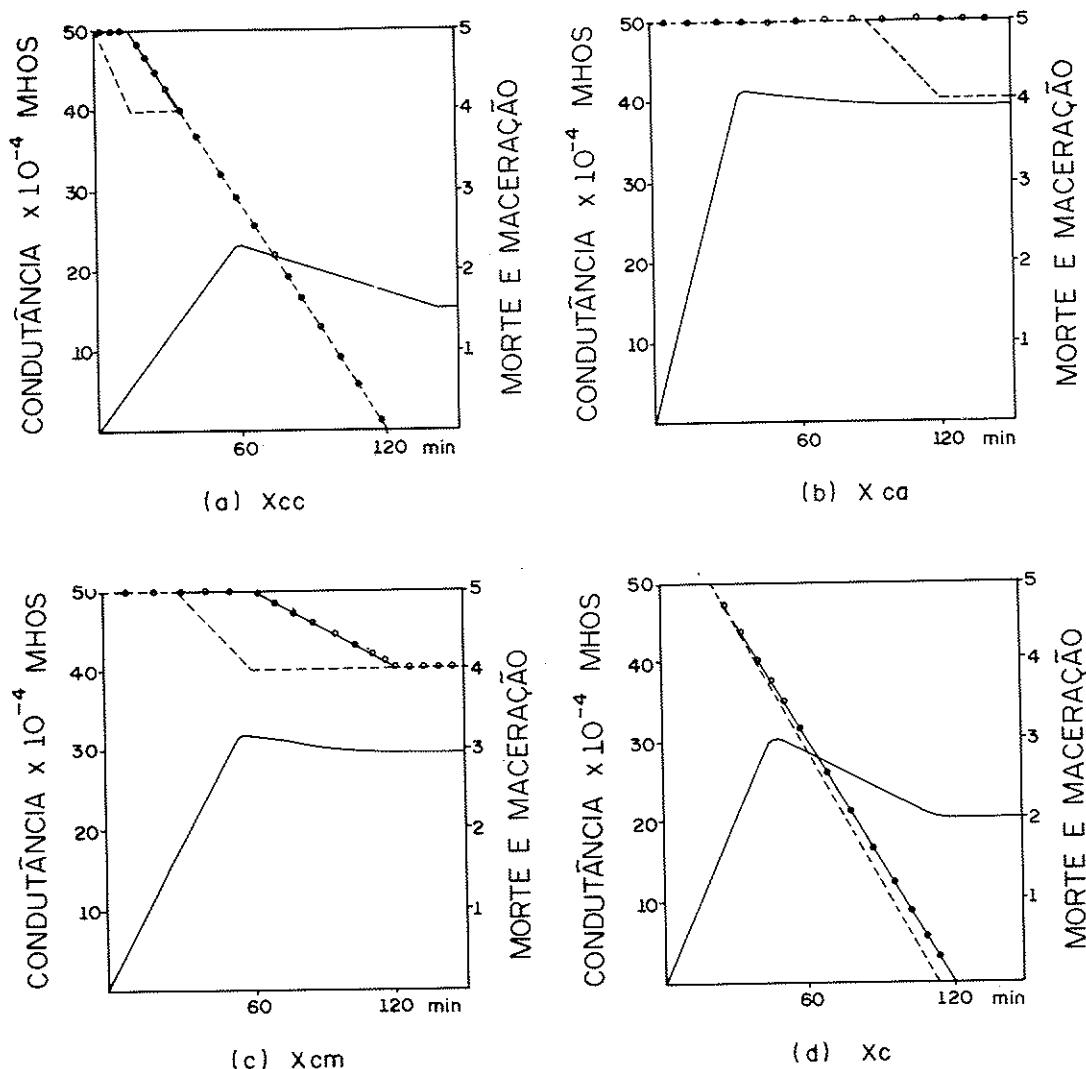
Os discos que não continham evidência de morte celular ficaram coloridos e receberam índice 5; discos com morte total receberam índice zero. Valores unitários intermediários foram distribuídos conforme o grau de coloração dos discos de batata.

Tabela 1 - Descrição das patovares de *Xanthomonas campestris* usadas na produção de enzimas que degradam material péctico.

Símbolos: 1 = Fornecida pelo Dr. L.K. Nakamura NRRL/USDA, Peoria, Illinois, 61604, USA; 2 = Fornecidas pelo Dr. O. Kimura da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 3 = Da coleção do Prof. Armando Takatsu da Universidade de Brasília

Estirpe	Procedência	Patovar
NRRL-B1459A	USA ¹	campestris
CIAT-1165	Colômbia ²	cassavae
CIAT-1196	Africa ²	cassavae
ENA-2648	Brasília/Brasil ³	manihotis

Figura 3 - Perda de eletrólitos (—). morte celular (---) e maceração (-o-) de discos de batata por ação de enzimas purificadas por precipitação do filtrado de cultura com sulfato de amônio (60 a 90% de saturação) provocadas por: a) *Xanthomonas campestris* pv. *cassavae* da Colômbia (Xcc); b) *X. campestris* pv. *cassavae* da África (Xca); c) *X. campestris* pv. *manihotis* (Xcm) e d) *X. campestris* pv. *campestris* (Xc). A mistura de reação continha 12 rodelas de batata (aproximadamente 0,6g); tampão glicina 0,05 M, pH 9,5; 0,02% de azida sódica e 0,065 a 0,09mg de proteína por ml. Enzima fervida e tampão serviram como controle



Maceração de discos de batatas foi estimada por índices de 0 a 5 também. Discos tratados com enzima autoclavada não eram macerados, então receberam 5 e os que tinham perdido a coerência receberam 0. Valores intermediários foram assinalados através da pressão com uma espátula indicando um maior amolecimento do tecido.

Cada experimento teve no mínimo 3 repetições e enzima autoclavada foi usada como controle.

Tabela 2 - Transeliminase do ácido poligalacturônico (PATE) e pectinesterase (PE), presentes em 3 patovares de *X. campestris* crescendo por 18 horas na presença de 0,5% de pectina e 0,5% de polipectato de sódio a 30°C.

Símbolos: 1: Xcc = *X. campestris* pv. *cassavae* da Colômbia, Xca = *X. campestris* pv. *cassavae* da África, Xcm = *X. campestris* pv. *manihotis*, Xc = *X. campestris* pv. *campestris*. 2 - Frações de DEAE-celulose: I = eluição com Tris-HCl 0,05 M pH 8,0, II = eluição com Tris-HCl 0,05 M pH 8,0 e NaCl 0,1 M, III = eluição com Tris-HCl 0,05 M pH 8,0 e NaCl 0,2 M; 3 = Transeliminase do ácido poligalacturônico (PATE) expressa em unidades de produto insaturado por min por mg de proteína, usando-se o teste do ácido tiobarbitúrico; Pectinesterase (PE) em µmoles de grupamentos carboxílicos determinados por titulação com NaOH 0,01 N

Patovares ¹ Fontes de enzimas	Xcc		Xca		Xcm		Xc		
	Enzimas ² :	PATE	PE	PATE	PE	PATE	PE	PATE	PE
Sobrenadante		2,0	0,01	0,17	-	1,0	-	7,7	0,1
(NH ₄) ₂ SO ₄ (60-90%)		76,0	0,6	0,64	0,33	3,0	0,013	129	0,4
DEAE-Celulose I		16,6	0,1	0,25	0,6	5,0	0,02	703,7	0,6
DEAE-Celulose II		7,4	0,1	-	-	-	-	176,4	0,1
DEAE-Celulose III		21,6	0,15	-	-	-	-	233,3	0,25

Resultados e Discussão

As enzimas PATE e PE predominaram nos ensaios enzimáticos com os três patovares crescidos durante 18 horas em meio 523 líquido contendo substrato péctico. As enzimas após fracionamento com uma série de sulfato de amônio foram chromatografadas por troca iônica em DEAE-celulose (Tabela 2).

Detectou-se PATE em quantidade superior a PE tanto no filtrado de cultura quanto após a purificação (Tabela 2). Na patovar Xc foram detectados PG e PTE e na patovar Xcm, somente PG foi encontrado no filtrado de cultura.

Starr & col. (22) usando 19 patovares de *X. campestris* com 9 isolados de Xc e um de Xcm encontraram somente PATE e PE no filtrado de cultura. Xc apresentou PTE e PG além das duas enzimas encontradas pelos pesquisadores acima, embora em menor quantidade quando comparadas às atividades de PATE por viscosimetria, TBA e açúcares redutores.

Em experimentos preliminares testou-se a atividade enzimática no filtrado de cultura dos três patovares, durante 24, 46 e 64 horas de crescimento. No caso de Xc, PG, PATE e PTE aumentaram cerca de 2, 3 e 4 vezes, respectivamente, a sua atividade de uma das fases de crescimento para a seguinte. A atividade de PG no caso de Xcm apareceu somente até 22 horas de incubação e a de PATE não foi crescente. Para o patovar Xca, PTE e PG não apareceram no filtrado de cultura em nenhum dos períodos de crescimento testados.

Nasuno & col. (16) detectaram uma atividade máxima para PATE em uma estirpe de Xc entre 36 e 48 horas de crescimento a 30°C. Aqui Xc apresentou um aumento quantitativo para as enzimas até com 64 horas de crescimento, sendo que PATE aumentou cerca de 9 vezes entre 22 e 64 horas de crescimento. Nasuno & col. (16) não detectaram produção de PG em Xc, mesmo quando variaram a temperatura, aeração, pH, fontes de hidrogênio e outros constituintes do meio de cultura. Já Fawole & col. (7) encontraram PG em filtrado de Xcm com atividade proporcional à idade de cultura com até 100 horas de incubação. No caso presente detectou-se atividade de PG em Xcm com até 22 horas de crescimento também a 30°C (Figura 2).

A atividade de PE em relação a PATE parece ser mais marcante para Xca do que para as outras bactérias (Tabela 2).

O maior rendimento no processo de purificação e na produção de PATE foi conseguido com Xc (Tabela 2).

Os patovares Xca e Xcm no processo de purificação não apresentaram as frações II e III, obtidas por eluição da coluna de DEAE-celulose com Tris-HCl 0,05M pH 8,0 e NaCl a 0,1 e 0,2M, respectivamente.

PATE e PTE foram liberadas juntas na lavagem da coluna de DEAE celulose com Tris-HCl 0,05M, pH 8,0 e também em 2 picos quando se eluiu com Tris-HCl 0,05M, pH 8,0 contendo NaCl 0,1 e 0,2M no caso das estirpes Xcc e Xc. Isto sugere a presença de isoenzimas de PATE e/ou de PE. Foi tentado o uso de CM-celulose nas mesmas condições cromatográficas de Nasuno & col. (16) mas a quantidade de enzimas purificadas com esta coluna foi insignificante.

Para Xcm e Xca as enzimas PATE e PE apareceram somente na eluição com Tris-HCl 0,05M, pH 8,0. Isto pode indicar ausência de isoenzimas ou ainda que o pH e a concentração de NaCl usados na cromatografia não foram os mais adequados para liberar outras espécies de enzimas presentes nessas bactérias.

Mount & col. (15) indicaram que a mudança de permeabilidade, maceração de tecido e morte celular em discos de batata podem ser causadas por uma endoPATE produzida por *E. carotovora*.

McClendon (14) e Bateman (3) concluíram que a maceração é relacionada com a ação de endoPG e endoPATE e que formas exo de hidrolases e liase, não causam maceração. No caso presente os resultados indicaram tendência semelhante, pois, embora a separação entre endo e exo enzima não tenha sido enfatizada, as Figs. 1 e 3 sugerem situação idêntica. Enzimas produzidas por Xc e Xca com altas perdas de viscosidade por minuto causaram maceração e morte enquanto que os de ação mais lenta, indicados de exo-transeliminase não possuem efeito macerante.

Referências Bibliográficas

1. Bateman, D.F. - Pectolytic activities of culture filtrate of *Rhizoctonia solani* and extracts of *Rhizoctonia* infected tissues of bean. *Phytopathology*, 53:197-204, 1963a.
2. Bateman, D.F. - The "macerating enzyme" of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 54:438-445, 1963b.
3. Bateman, D.F. - An induced mechanism of tissue resistance to polygalacturonase in *Rhizoctonia*-infected hypocotyls of bean. *Phytopathology*, 54:438-445, 1964.
4. Burkholder, W.H. & Starr, M.P. - The generic and specific characters of phytopathogenic species of *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 38:494-502, 1948.
5. Cooper, R.M. & Wood, R.K.S. - Cell wall degrading enzymes of vascular wilt fungi. III - Possible involvement of endo-pectin lyases in *Verticillium* wilt of tomato. *Physiol. Plant Pathol.*, 16:285-300, 1980.
6. Dye, D.W. - Pectolytic activity in *Xanthomonas*. *New Zealand Journal of Science*, 3:61-69, 1960.
7. Fawole, M.O. & Ikotun, T. - The production of polygalacturonase by *Xanthomonas manihotis*. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 13:375-381, 1978.
8. Goodman, R.N.; Király, Z. & Zaitlin, M. - The biochemistry and physiology of infectious plant disease. Toronto, D. van Nostrand, 1967.
9. Kado, C.I. & Heskett, M.G. - Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 60:969-976, 1970.
10. Kimura, O. & Dianese, J.C. - Caracterização proteica e isoenzimática das patovares de *Xanthomonas campestris* que atacam a mandioca. *Pesq. Agropec. Bras.*, 18:1215-1228, 1983.
11. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. & Randall, R.J. - Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275, 1951.
12. Mankarios, A.R. & Friend, J. - Polysaccharide-degrading enzymes of *Botrytis allii* and *Sclerotium cepivorum*: enzyme production in culture and the effect of the enzymes on isolated onion cell walls. *Physiol. Plant. Pathol.*, 17:93-104, 1980.

13. Marciano, P.; Dilenno, P. & Magno, P. - Polygalacturonase isoenzymes produced by *Sclerotinia sclerotiorum* "in vivo" and "in vitro". *Physiol. Plant. Pathol.*, 20:201-212, 1982.
14. McClendon, J.H. - Evidence for the pectic nature of the middle lamella of potato tuber cell walls based on chromatography of macerating enzymes. *Am. J. Botany*, 51:628-633, 1964.
15. Mount, M.S.; Bateman, D.F. & Basham, H.G. - Induction of electrolyte loss, tissue maceration and cellular death of potato tissue by an endopolygalacturonate transeliminase. *Phytopathology*, 60:924-931, 1970.
16. Nasuno, S. & Starr, M.P. - Polygalacturonic acid transeliminase of *Xanthomonas campestris*. *Biochem. J.*, 104:178-185, 1967.
17. Nelson, N. - A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 153:375-380, 1944.
18. Preiss, J. & Ashwell, G. - Polygalacturonic acid metabolism in bacteria. I - Enzymatic formation of 4-deoxy L-threo 5-hexoseulose uronic acid. *J. Biol. Chem.*, 238:1571-1576, 1963.
19. Sabet, K.A. & Dowson, W. J. - Action of phytopathogenic bacteria on pectate gel. *Nature*, 168:605, 1951.
20. Smith, W.K. - A survey of the production of pectic enzymes by plant pathogenic and other bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 18:33-41, 1958a.
21. Smith, W.K. - Chromatographic examination of the products of digestion of pectic materials by culture solutions of plant pathogenic and other bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 18:42-48, 1958b.
22. Starr, M.P. & Nasuno, S. - Pectolytic activity of phytopathogenic xanthomonads. *J. Gen. Microbiol.*, 46:425-433, 1967.
23. Wilson, E.E.; Zeitoun, F.M. & Fredrickson, D.L. - Bacterial phloem canker, a new disease of Persian Walnut trees. *Phytopathology*, 57:618-621, 1967.
24. Wood, R.K.S. - *Physiological plant pathology*. Oxford/Edinburgh, Blackwell Scientific Publications, 1967.

KINETIC BEHAVIOUR OF ACID PROTEINASE FROM *ASPERGILLUS NIGER*

Rasmy M. Attia

Microbiology Department
Agricultural Research Center
Soils & Water Res. Buildg.
Gamaa Street, Giza
Egypt

Rawia F. Gamal

Microbiology Department
Faculty of Agriculture
Ain-Shams University
Egypt

& S.H. Ahmed

Microbiology Department
Agricultural Research Center

Summary

The kinetic behaviour of acid proteinase from *Aspergillus niger* was investigated. Results indicated that the order of the reaction followed the second order. The half life ($t_{1/2}$) was 53 minutes. Michaelis constant and maximum velocity were determined using different methods. The average of K_m value was equal to 0.01mM. The maximum velocity (V_m) was determined being 0.45. The enzyme had one active site and the equilibrium constant k' , analogous to K_m was equal to 0.011mM. The pH optimum was 2.5. The pK and heat ionization of groups present in the catalytic site of the enzyme protein were studied. The pK parameters showed that $pK_e = 3$, $pK_{es} = 2.38$, $\Delta H^\circ = 1.5 \text{ kcal/M}$ and the ionized group was beta carboxy (Aspertyl residue).

Resumo

Cinética da proteinase ácida de *Aspergillus niger*

O estudo da cinética de proteinase ácida de *Aspergillus niger* revelou: a ordem da reação segue a segunda ordem; meia vida ($t_{1/2}$) 53 minutos. Através de diferentes métodos, as velocidades máximas e constantes de Michaelis foram estudadas. A média do valor de K_m foi igual a 0,01mM e a velocidade máxima (V_m) 0,45. A enzima apresenta um sítio ativo; a constante k' de equilíbrio, análoga a K_m , é igual a 0,011mM. O pH ótimo foi 2,5. Foram estudados também, pK e calor de ionização dos grupos presentes no sítio catalítico da enzima. Os parâmetros de pK demonstraram que: $pK_e = 3$; $pK_{es} = 2,38$; $\Delta H^\circ = 1,5 \text{ kcal/M}$ e que o grupo de ionização foi beta carboxy (resíduo aspertyl).

Introduction

The acid proteinase from molds (EC.3.4.23.6) has been studied by a number of workers (3, 7, 8, 16, 18, 20). The enzyme catalyzes the hydrolysis of peptides, especially at bonds involving the carboxyl groups of arginine or leucine. Many investigators studied the purification of proteases (1, 11, 12, 15, 17) using 2-3 volumes of alcohol, acetone or one volume of saturated ammonium sulfate to precipitate the enzyme. Others (6, 19, 21) purified the enzyme by using CM-cellulose, DEAE or Amberlite CG-50 chromatography.

Acid proteinase is used industrially in pharmaceutical preparations, brewing industries for clarification and maturing of beer and for correcting hazes which often develop in beer during storage. This use plus the unusual properties of this enzyme prompted us to include acid proteinase in the investigations of our laboratory.

This study describes kinetic experiments concerned with substrate concentration and pH behaviour.

Table 1 - Determination of the reaction order of *A. niger* acid protease

t(min)	a	x	a-x	a/a-x	1/a-x	ln a/a-x
0	100	0	100	1	0.01	0
10	100	21	79	1.27	0.013	0.24
20	100	32	68	1.47	0.015	0.39
30	100	42	58	1.72	0.017	0.54

Table 2 - Effect of substrate concentration on enzyme velocity

s (x10 ⁻³ mM)	log s	1/s (x10 ⁻³)	v	1/v	s/v	pS	log v/Vm
32	-1.5	31	0.29	3.45	0.11	1.5	0.29
27	-1.6	37	0.29	3.45	0.09	1.6	0.29
21	-1.7	48	0.29	3.45	0.07	1.7	0.29
16	-1.8	63	0.29	3.45	0.06	1.8	0.29
11	-2.0	91	0.23	4.40	0.05	2.0	0.04
5	-2.3	200	0.15	6.70	0.03	2.3	-0.29
3	-2.5	333	0.10	10.00	0.03	2.5	-0.53

Material and Methods

Organism - A preliminary screening program for high acid proteinase producing molds grown in submerged culture, indicated that *Aspergillus niger* was one of the most active (8). The organism was maintained on yeast malt agar slants based on that of Haynes & col. (10), and transferred at 4 weeks interval. Culture was grown in 250ml baffled Erleymeyer flasks, containing 50ml of 5% wheat flour, 2.13% sodium nitrate, 0.5% potassium dihydrogen phosphate, 0.1% sodium chloride and pH 4.5. Fermentation was run at 30°C on an incubated rotary shaker, 125rpm for 72 hours.

Enzyme purification - The technique adopted by Hashimoto (9) was followed. It is summarized as follows: the broth filtrate was adjusted to pH 4.5 and concentrated under vacuum at 35°C to one-third. The fractionation of the proteinase with ammonium sulfate was performed at a concentration of 0.58 saturation followed by centrifugation. The concentration of ammonium salts in the clear enzyme solution was raised to 0.7 saturation at pH 4.5. The precipitate was then dialyzed against distilled water to obtain enzyme free salt solution. The non dialyzable substrate was submitted for purification with 2.5 volumes acetone. The precipitate was redissolved in 0.01M acetate buffer at pH 4.0 and centrifuged to remove the impurities. Cold acetone (2.5 volumes) was added to the supernatant. The precipitate was redissolved in 0.1M acetate buffer (pH 4.0). The clear enzyme solution was applied to DEAE - cellulose column (2 by 57cm) equilibrated with 0.01M acetate buffer, pH 4.0. After washing the column with 0.01M acetate buffer, pH 4.0, elution was performed by a linear gradient of sodium chloride concentration from 0.1 up to 0.4 per cent. The flow-rate was adjusted to 30mls/hour. Five ml. fractions were collected. Active fractions of protease, number 26 to 35 were pooled and desalting by dialysis. The dialyzate of pooled fractions was reprecipitated and dried.

Table 3 - Different techniques for calculating K_m & V_m

Plots	Slope	Intercept		V_m	K_m
		Ord.	Abs.		
v versus s	-	v	s	0.44	0.009
$1/v$ versus $1/s$	K_m/V_m	$1/V_m$	$-1/K_m$	0.45	0.010
v versus pS	-	V_m	$-\log K_m$	0.44	0.010
s/v versus s	$1/V_m$	K_m/V_m	$-K_m$	0.435	0.0097
$\log v/V_m$ versus pS					0.0115

Table 4 - Hill plot for active site number and K_m values of *Aspergillus* acid protease.

Symbols: * = Maximum velocity (V_m) = 144U/ml

$s \text{ (mM}^{-3}\text{)}$	$-\log s$	$v \text{ (U/ml)}$	$(V_m-v)^*$	$\log v/V_m-v$
32	1.5	90	54	0.22
27	1.6	90	54	0.22
21	1.7	90	54	0.22
16	1.8	90	54	0.22
11	2.0	77	67	0.06
5	2.3	50	94	-0.27
3	2.5	35	111	-0.53

Enzyme assay - The modified method of Anson, described by Tsujita & Endo (21) was adopted here for enzyme assay. The reaction mixture (1.5ml) contained enzyme plus 10mg of Hammarstein milk casein (1%) in citric acid phosphate buffer, pH 3.0. Incubation was conducted at 37°C for 10 minutes and the reaction terminated by the addition of 1.5ml of trichloroacetic acid (10%). After standing for 20 minutes at 37°C, 0.5ml of the filtrate was taken to determine the amount of TCA-soluble products, using Folin-CioCalteau reagent. The blue colour was measured at 660nm by using a Perkin Elmer spectrophotometer Model 50E. One unit was defined as the amount of enzyme which developed the colour equivalent to 1 microgram of tyrosin.

Order of reaction - The experiment was carried out by dissolving the enzyme in citrate buffer at pH 3.0 and was rapidly brought to 37°C in a water bath, regulated to $\pm 0.05^\circ\text{C}$ and stirred continuously. Aliquots were removed at 10 minutes intervals for enzyme determination. The simplest mean of determining the order of reaction is to measure the variation of the concentrations of a reactant with time.

Results and Discussion

Criteria of enzyme purity - (i) **Solubility test and ultraviolet spectrum** - At two speeds, high speed at 500nm/min. and slow speed at 100nm/min were used for the criteria of enzyme purity. The absorption spectrum of the purified enzyme at the high speed was 302.4 and 303.9nm at low speed with an average of 303nm. The ultra violet absorption spectrum of an aqueous solution of the purified enzyme proved to be typical of a protein free of nucleic acids. These results are in agreement with those obtained by Sardinas (15) who found that maximum absorption of fungal proteinase was near 300nm; (ii) **Infra-red absorption** (Attia, R.M.; Gamal, R.F. & Ahmed, S.H.) - Observation on the infra-red absorption spectra of acid proteinases from *Aspergillus niger*. Res. Ann. Rev. Fac. Agric. Ain Shams Univ. (in press) - The fungal acid protease obtained by the authors compared with foreign counterpart enzymes, i.e. pepsin, fungal acid protease and microbial rennin obtained from Sigma Co., U.S.A. show resemblance in numbers of sharp absorption bands which may be correlated with unsymmetrical vibrations of atoms and groups of atoms. The infra-red spectra of all preparations show great similarity in the band position, indicating that the same compounds are present. The above results of criteria of purity indicate a very strong evidence for the purity of the enzyme, and therefore the enzyme preparation was used for kinetic studies.

Table 5 - pKa values of *Aspergillus* acid protease

pH	V_m	$K_m (\text{mM}^{-3})$	V_m/K_m	$\log V_m$	pS	$\log V_m/K_m$
2.0	123	9.60	12812.5	2.089	2.0177	4.11
2.5	159	11.76	13520.4	2.201	1.9300	4.13
3.0	351	31.25	11232.0	2.545	1.5051	4.05
3.5	416	45.45	9152.9	2.619	1.3425	3.96

Figure 1 - A plot of $1/(a-x)$ against time (t), showing the end order reaction, following the equation: $kt = x/a(a-x)$

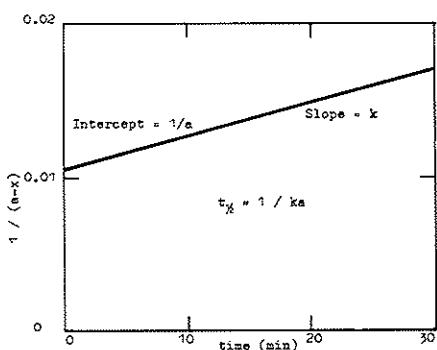
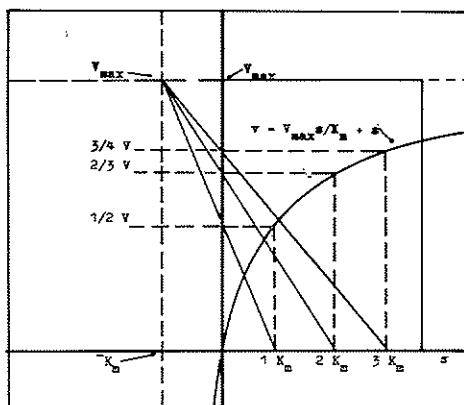


Figure 2 - Schematic plot of the Michaelis-Menten equation, showing the rectangular hyperbolic nature of the equation. The asymptotes to the curve are at $v = V$ and $s = K_m$ and the centre of the conic section is at the point $-K_m$ & V_{max}



Kinetic behaviour - The concept of order is important in understanding enzyme kinetics because the individual steps in enzyme catalysed reactions nearly always do have simple order, usually being first or second order (4). Data in Table 1 illustrated by Figure 1 clearly show that a plot of $1/a-x$ against (t) gave a straight line with a slope (k), and intercept ($1/a$) being 0.0002 and 0.0106 respectively. It is clear to prove that the reaction taken place in a single step and the concentrations of the reactants are of similar magnitude, this is given by the following equation: $1/(a-x) = kt + 1/a$, where (a) is the initial concentration at ($t=0$), and (x) represents the concentration of product formed at time (t).

Since the rate of reaction was found experimentally to be proportional to the concentration of $(1/a-x)$, the reaction was second order. On occasions half life is also used to describe the rate of second order reactions. This is given by using the equation of: $t_{1/2} = 1/ka$. The half life of the enzyme was calculated as 53 minutes. The rate of enzyme catalysed reaction show a characteristic dependence on substrate concentration. It can be safely said that only in certain instance does the velocity of an enzyme action parallel to the substrate concentration. When all variables can be controlled and the substrate concentration is low, such a correlation can often be demonstrated (2, 4). Table 2 illustrated by Figure 2 shows that an increase of substrate concentration produces at first a very rapid rise in velocity of reaction rates (1st order reaction). The rate of reaction increased with the increase of substrate concentration then fell down (mixed of first and zero order kinetic), while at higher substrate concentration no further change in velocity was observed (zero order kinetic). This can be attributed to that the enzyme catalyzed reaction at different substrate concentration is biphasic. At low concentration the active site of the enzyme was saturated and the number of substrate molecules increased, the active sites are covered to greater degree until no more active sites are available and the enzyme is working at full capacity, and the rate is independent of substrate concentration.

Data in Table 2 illustrated by Figures 2-7 show different ways of plotting the effect of substrate concentration in order to determine K_m and V_m .

Table 6 - pK parameters

	Values
pK_e	3.00
pK_{es}	2.36
ΔH°	1.5kcal/mole
Ionized group:	beta carboxyl (aspartyl)

Figure 3 - Graphical method of Dixon: use for determining K_m and enzyme molarity. $K_m = s_n - s_{n-1} = (s_n - e_t)/n$

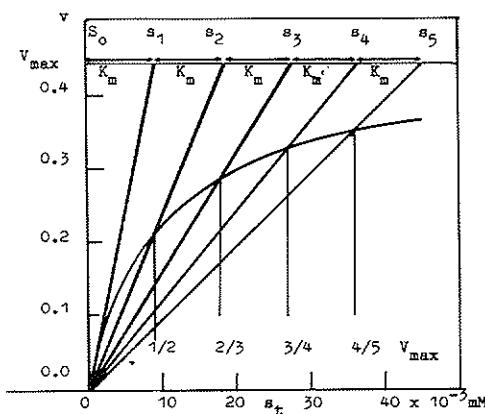
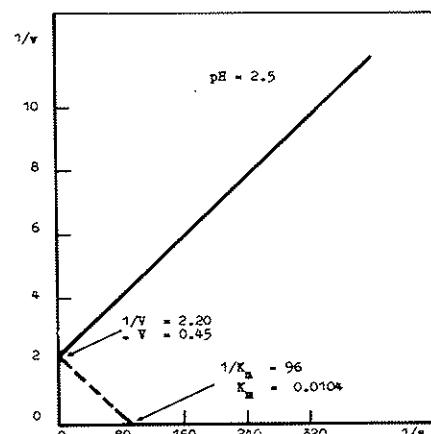


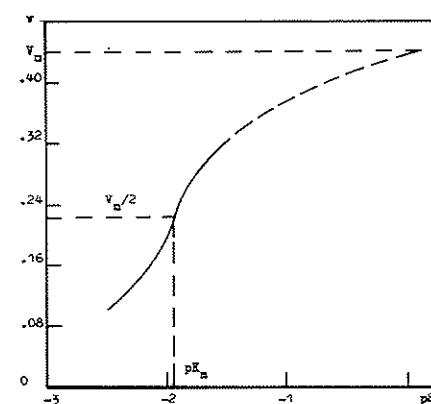
Figure 4 - Schematic plot of enzyme kinetic data using the Lineweaver-Burk equation. $1/v = K_m/V + 1/V$



To determine V_m and K_m the Michaelis equation: $v = V_m/ks/s$ was plotted in several different ways from a set of measurements of velocity at different substrate concentrations. The plot of (v) against (s) according to the Michaelis-Menten equation is often described as a rectangular hyperbole. Figure 2 illustrates a property of the curve. In this curve any straight line through the point of intersection of the asymptotes cuts the axes at two points that together provide the co-ordinates of a point on the curve. Figure 3 shows a curve of (v) against (s) concentration of a case here the enzyme concentration is negligibly small. A horizontal line is first drawn to show the maximum velocity (V_m), determined with saturating substrate concentration. Then points are marked on the curve at distances of V_m/n below the V_m line, where $(n=2, 3, 4, \dots)$ and straight lines are drawn from the origin through these points to cut the V_m line at points $s_2, s_3, s_4\dots$. This is given by using the Dixon equation (5) of: $S_n = nK_m t + e_t$ and the distance between two neighbouring intersection points will be: $S_n - S_{n-1} = K_m$. Thus the distance between the points on the V_m line are all equal and give a series of values for K_m from one curve, expressed in terms of the molarity scale used in plotting (s_t).

If $1/v$ is plotted against $1/s$, as shown in Figure 4, a straight line is obtained corresponding to the reciprocal form of Lineweaver and Burk equation (13): $1/v = K_m/V + 1/V_m$. From this graph the values of K_m and V_m were calculated to be 0.0104 and 0.45 respectively. Another method of plotting is shown in Figure 4, where (v) is plotted against pS ($= -\log s$), giving a curve of the familiar form met with dissociations. This correspond with the logarithmic forme of the Michaelis equation (6): $pS = pK_m + \log(V_m - v)/v$. The V_m and K_m were calculated to be 0.44 and 0.01 respectively. An alternative method which gives a straight line apparently rather similar to other methods, is to plot $s/v = K_m/V_m + 1/V_m s$. From Figure 6, Michaelis constant was obtained to be 0.097. Concerning with Figure 7, K_m can be calculated from Hill

Figure 5 - A plot of v against negative log s (pS)



(22) equation being 0.011mM. Table 3 summarises the different techniques for calculating K_m and V_m for *Aspergillus* acid protease. It could therefore be concluded that the average value of K_m was 0.01mM or 0.4% of casein hydrolysis by acid protease from *A. niger*. These results are in agreement with those obtained by other investigators (19) who found that K_m for casein by *Mucor pusillus* acid protease was 3.75 percent. Also with Ichishima (11) who reported that K_m for *Aspergillus* peptidase was 0.0125mM at 30°C and pH 2.5.

Figure 6 - Schematic plot of enzyme kinetic data using the Hans equation.
 $s/v = K_m/V + s/V$

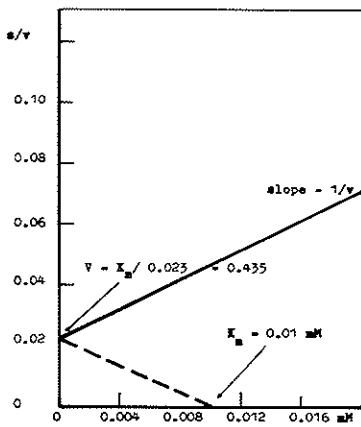
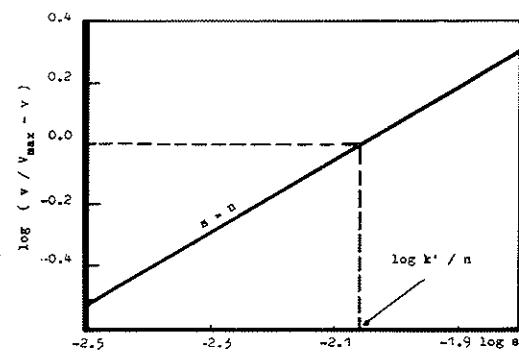


Figure 7 - Hill Plot. At $\log v/V_v = 0$, $k' = K_m = n \log s$



Active site studies - An expression describing the velocity as a function of substrate concentration is obtained from derivation of the Michaelis-Menten equation: $v/V_m - v = sn/k'$, where (n) represents the number of molecules, (k') is equilibrium constant which analogous to K_m (22). The logarithm of this equation is the commonly used linear transformation of the Hill (22) equation: $\log v/V_v - \log v = n \log s - \log k'$. A plot of $\log v/V_v$ versus $\log (s)$ is a straight line (Figure 7). The number of molecules of substrate binding to the enzyme in the reactive complex, (n) is the slope of this line. The value of k' is evaluated from the intercept of the vertical axis. At half the maximum attainable velocity, $v = V/2$ and $\log v/V_v = \log(V/2)/V_v/2$, since: $\log v/V_v = \log 1 = 0$ at $v = V/2$. Thus: $\log K' = n \log s$, where $\log v/V_v = 0$, on the Hill plot (Figure 7). From the above mentioned results in Table 4 illustrated by Figure 7, the $\log k/n$ was calculated as -2.06 and the slope (s) = $n=1$. Thus $\log k' = 2.06$, then $k' = 0.011 = K_m$.

It can be concluded that acid protease from *A. niger* has one active site and the equilibrium constant k' analogous to K_m , was equal to 0.011mM. The presence of one active site by Hill plot confirmed the result obtained by the authors from pK studies which proved that the enzyme contains one pK value being aspartyl residues (Table 6).

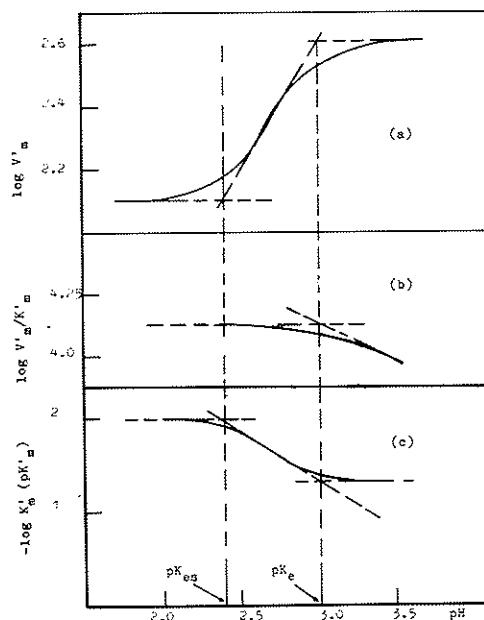
pK studies - Examining the pH dependence of enzymatic reactions, as with simple chemical reactions, one attempts to identify the apparent pK values of groups which may be involved in catalysis. One would hope to identify those functional groups involved and their states of ionization (5). Results of the pK value and heat ionization of groups present in the catalytic site of proteins are recorded in Table 5. Since the velocity of overall reaction is given by the modified Michaelis-Menten equation: $v = V's/K_m + s$, where V' is the observed maximum velocity at a constant pH and K_m is the observed Michaelis-Menten constant at that pH. It may be

shown that the observed maximum velocity is related to the actual maximum velocity by: $V' = v/1 + h/k_{es}$, where (k_{es}) is constant rate of enzyme substrate complex, and (h) is hydrogen ion concentration. Thus the plot of $\log (V)$ versus pH as shown in Figure 8a gave the pK_{es} (pK of enzyme-substrate complex) as 2.38 in pH range 2-2.6. It was noticed that the pK_e of a group situated in the (ES) complex produces an upward bend, i.e. an increase of slope with increased pH. Also from Figure 8a when the straight portions extrapolated in pH range (2.7-3.5) intersect at pH corresponding to the pK_e of free enzyme as 3.0.

A plot of $\log V_m/K_m$ versus pH as in Figure 8b also yield linear segments. The pH values at which these linear segments intersect when extrapolated correspond to the pK_e values of the basic group pK_e produce downward bend, i.e. a decrease in slope with increase of pH. Also from Figure 8b we can observe that pK_{es} was 2.38. The value of K_m may also vary with pH.

A plot of $\log K_m$ or pK_m versus pH as shown in Figure 8c reflects also the pK_{es} of all dissociation constant of free enzyme and enzyme substrate complex, being 3.0 and 2.38 respectively. It can be concluded that the *Aspergillus* acid protease has one pK_e being 3.0 which will be decreased to 3.38 in case of enzyme substrate complex. The pK of free enzyme is probably beta carboxyl group aspartyl residue as shown in Table 6. Therefore the enthalpy of ionization, ΔH° of carboxyl, being 1.5Kc/mole. These results are in agreement with those obtained by many investigators (14, 18) who reported that it was established that aspartic acid residues constitute the active site of microbial acid protease.

Figure 8 - pH dependencies of kinetic constants of enzyme-catalyzed reactions



References

1. Arima, K.; Yu, J.; Iwasaki, S. & Tamura, G. - Milk clotting enzyme from microorganisms. V - Purification and crystallization of Mucor rennin from *Mucor pusillus*. *Appl. Microbiol.*, 16:1727-1733, 1968.
2. Attia, R.M. & Gamal, R.F. - Subtilopeptidase A produced by *Bacillus subtilis* PR-70. I - Kinetic behaviour of solubilized enzyme. *Zbl. Bakt. II. Abt.*, 134:275-281, 1979.
3. Belyanskaite, J.P.; Palubinskas, V.J.; Anchenko, D.E.; Vesa, V.S. & Gleznza, A.A. - Purification and some properties of extracellular acid proteinase from *Mucor renninus*. *Enz. Microb. Technol.*, 2:37-44, 1980.
4. Bowden, A.C. - Fundamentals of enzyme kinetics. United Kingdom, Butterworths, 1979.
5. Dixon, M. & Webb, E.C. - Enzymes. 3.ed. Longmans, 1979.
6. Dowd, J.E. & Riggs, D.S. - A comparison of estimates of Michaelis-Menten kinetic constants from various linear transformations. *J. Biol. Chem.*, 240:863, 1965.
7. Fukumoto, J.; Tsuru, D. & Yamamoto, T. - Studies on mold proteinases. I - Purification, crystallization and some enzymatic properties of acid proteinase of *Rhizopus chinenses*. *Agric. Biol. Chem.*, 3:710-717, 1967.

8. Gamal, R.F.; Attia, R.M.; Mahmoud, S.A.Z. & Ahmed, S.H. - Studies on the production of acid proteinase by submerged culture of local isolates. Hon. Con. Agric. Bot. Sci., 27-28 April, 1983.
9. Hashimoto, H.; Kaneko, Y.; Iwasa, T. & Yokotsuka, T. - Production and purification of acid proteinase from the thermophilic fungus *Penicillium dupontii* K 1014. Appl. Microbiol., 25:584-588, 1973.
10. Haynes, W.C.; Wickerham, L.J. & Heseltine, W. - Maintenance of cultures of industrially important microorganisms. Appl. Microbiol., 3:361-368, 1955.
11. Ichishima, E. - Purification and mode of assay for acid proteinase of *Aspergillus saitoi*. In: - Perlmann, G.E. & Lorand, L., eds.- Methods in enzymology. New York, Academic Press, vol. XIX 1970.
12. Iwasaki, S.; Tamura, G. & Arima, K. - Milk clotting enzyme from microorganisms. II - Enzyme production and the properties of the crude enzyme. Agric. Biol. Chem. (Tokyo), 31:546-548, 1967.
13. Lineweaver, H. & Burke, D. - Determination of enzyme dissociation constants. J. Am. Chem. Soc., 56:658-666, 1934.
14. Morihara, K. - Comparative specificity of microbial proteinase. Adv. Enzymol., 41:179-243, 1974.
15. Sardinas, J.L. - Microbial rennets. Adv. Appl. Microbiol., 15:39-73, 1972.
16. Sawada, J. - Studies on the acid proteinase of *Poecilomyces veriati* Bainier TRR 220. I - Crystallization of acid proteinase. Agric. Biol. Chem., 27:677-683, 1963.
17. Siepen, D.; Yu, P.H. & Kula, M.R. - Proteolytic enzymes of *Neurospora crassa*: purification and some properties of five intra cellular proteinases. Eur. J. Biochem., 56:271-282, 1975.
18. Sodek, J. & Hofmann, T. - Large scale preparation and some properties of *Penicillium janthinellum*. Can. J. Biochem., 48:425-431, 1970.
19. Somkuti, G.A. & Babel, F.J. Purification and properties of *Mucor pusillus* acid proteinases. J. Bact., 95:1407-1414, 1968.
20. Strenberg, M. - Crystalline milk clotting proteinase from *Mucor miehei* and some of its properties. J. Dairy Sci., 54:159, 1971.
21. Tsujita, Y. & Endo, A. - Purification and characterization of the two molecular forms of *Aspergillus oryzae* acid proteinase. Biochem. Biophys. Acta, 445:195-204, 1976.
22. West, E.S.; Tood, W.R.; Mason, H.S. & Bryggen, J.T.V. - Text book of biochemistry. 4.ed. New York, Macmillan, 1967.

SALMONELAS EM AMOSTRAS DE FÍGADO DE BOVINO E AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE MEIOS DE ENRIQUECIMENTO SELETIVO, TEMPO E TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO NO SEU ISOLAMENTO

Maria de Fátima F.F. Gomes

(correspondência em nome da segunda autora)

Sirdeia Maura Perrone Furlanetto

Deptº de Microbiologia

Instituto de Ciências Biomédicas USP

Caixa Postal 4365

05508 São Paulo SP, Brasil

Resumo

A partir de amostras de fígado de bovino, adquiridas em feiras livres do Município de São Paulo, foram isolados 14 sorótipos de bactérias do gênero *Salmonella* classificados com *S. san-diego*, *S. derby*, *S. agona*, *S. typhimurium*, *S. montevideo*, *S. oranienburg*, *S. infantis*, *S. infantis* O:14+, *S. tenessee*, *S. newport*, *S. dublin*, *S. panama*, *S. anatum* e *S. minnesota*. *S. infantis* revelou-se predominante, tendo sido isolada de 25% das amostras positivas. Foram utilizados os caldos de enriquecimento tetrathionate (TT) e selenito cistina (SC), incubados à temperatura de 35°C e 43°C por 24 horas. O enriquecimento em caldo TT incubado a 43°C durante 24 e 48 horas, apresentou o maior grau de positividade, 66,7% e 75%, respectivamente. Ao se incubar o caldo TT à temperatura de 35°C por 24 e 48 horas, obteve-se um percentual de recuperação inferior ao obtido pelo mesmo caldo incubado sob as condições anteriormente citadas. Em relação ao caldo SC, tanto as temperaturas como os tempos de incubação não apresentaram diferença aparente na recuperação de salmonelas, sendo inferior ao obtido com o caldo TT a 43°C. Das 50 amostras analisadas 24 (48%) apresentaram-se contaminadas por salmonelas, estando assim em desacordo com os padrões microbiológicos federais e os estabelecidos pela Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Summary

Isolation of Salmonella from beef liver and evaluation of enrichment broths, time and temperature of incubation

Fifty samples of beef liver were acquired in various markets in the city of São Paulo, Brazil and *Salmonella* determination were carried out. Fourteen serotypes were identified to wit: *S. san-diego*, *S. derby*, *S. agona*, *S. typhimurium*, *S. montevideo*, *S. oranienburg*, *S. infantis*, *S. infantis* O:14+, *S. tenessee*, *S. newport*, *S. dublin*, *S. panama*, *S. anatum* and *S. minnesota*. *S. infantis* was the most frequent, being isolated from 25% of the positive samples. For isolation, were utilized the tetrathionate (TT) and selenite cystine (SC) enrichment broths, incubated at 35°C

and 43°C, during 24 and 48 hours. The TT enrichment broth, at 43°C during 24 and 48 hours, showed more positive results, 66,7% and 75%, respectively. The TT broth incubated at 35°C during 24 and 48 hours, showed a recovery percentage bellow those results obtained by the same broth incubated at the conditions mentioned above. To SC broth, the temperature as well as the incubation time didn't show significant differences in terms as *Salmonella* recovery, being below those obtained with the TT broth as 43°C. From 50 analised samples, 24 (48%) were positive for *Salmonella* serotypes and therefore, out of microbiological Federal Standards and those established by State Health Secretary of São Paulo, Brazil.

Introdução

O homem sempre utilizou a carne como sua principal fonte de alimentação, variando a espécie animal consumida, com a região e os costumes da população. O conceito de carne inclui o tecido animal e os vários órgãos comestíveis, como o coração, fígado, rins e cérebro, entre outros utilizados como alimento (26).

O fígado, pelo alto valor nutritivo, é comumente utilizado na terapia de algumas doenças, como a anemia, sendo consumido cru. É ministrado como suplemento proteico à pessoas idosas, mal nutridas ou doentes, sob a forma de pó, elaborado através de tratamento térmico muito baixo (39, 43).

O pH do fígado é mais elevado do que o da carne, portanto, o processo de deterioração é desencadeado em menor espaço de tempo (27). Dessa forma, torna-se necessário maior cuidado na manipulação, armazenamento e manutenção da qualidade microbiológica a fim de que este produto não venha a representar risco à saúde do consumidor.

As salmonelas humanas têm sido estudadas durante muitos anos por vários autores. Quanto a estas doenças, segundo Silliker (36), a situação atual parece não ter se alterado muito em relação a anos anteriores. Este autor afirma serem as salmonelas responsáveis por toxinfecções alimentares, concluindo que as salmoneloses humanas ainda são um importante problema de Saúde Pública. Kafel & Bryan (24) também concordam com a afirmação de que o número de casos de toxinfecções alimentares causadas por salmonelas no homem, não se mostra com tendência a decrescer. Afiram, ainda, que a ocorrência de salmonelas em animais parece ter aumentado através dos anos, acrescentando que, frequentemente, são isolados de alimentos, principalmente da carne.

Com exceção da *S. typhi* e *S. paratyphi*, os animais são os principais reservatórios dos outros sorótipos de salmonela e, assim sendo, os alimentos de origem animal, como a carne, o leite, os ovos e derivados, são os principais veiculadores destas bactérias. A manutenção destes alimentos contaminados em temperatura ambiente, possibilita a sua multiplicação, o que torna possível a ocorrência de surtos de toxinfecções alimentar causados por tais microrganismos (4, 5, 23).

De uma maneira geral, a carne e seus produtos derivados, encabeçam as listas de alimentos responsáveis pela veiculação de salmonelas. Embora a carne fresca crua, na quase totalidade dos casos, seja consumida após cocção, segundo Bryan (5) pode ser responsável pela veiculação de salmonelas para o ambiente onde está sendo comercializada, cozinhas, outros produtos cozidos e mãos dos manipuladores. Segundo Bowmer (4), num surto ocorrido na Inglaterra e País de Gales, associado com carnes, revelou que 86% foram causados por carne processada. Neste relato feito por Bowmer (4), a carne fresca cozida se mostrou mais segura do que a carne processada. Na Inglaterra e País de Gales, durante os anos de 1951 e 1960, Wilson & Miles (48) constataram que, de 413 surtos de toxinfecção alimentar causados por salmonelas, nem todos os prováveis veículos foram identificados, porém, 201 (48,7%) foram devidos à ingestão de carnes, 91 (22%) por ovos e derivados, 67 (16,2%) por doces e 20 (4,8%) oriundos do leite. Entre os produtos derivados de carnes implicados nestes surtos, os processados foram responsáveis por 169 (84%) casos, os enlatados por 17 (8,5%) e

a carne fresca por apenas 2 (1%) casos. Em produtos enlatados, a contaminação muitas vezes ocorre após os mesmos serem abertos. Nos Estados Unidos, em 1975, de 16 surtos de salmonelas ocorridos, 9 estavam relacionados com carne e derivados (10).

A contaminação por salmonelas tem sido estudada em vários centros de pesquisa em alimentos. Assumpção (1), em São Paulo, analisando amostras de carnes de bovinos, suíños, aves e outros animais, obteve positividade no isolamento de salmonelas da ordem de 19% em carnes de suíños, 10,6% de bovinos e 10% de galinhas. Pestana & Ruggai (32), examinando amostras de carne preparada vendida no varejo, na cidade de São Paulo, detectaram a presença de salmonelas em 3,52% das 170 amostras analisadas, sendo que as *S. anatum*, *S. minnesota* e *S. newport*, foram os sorótipos isolados. Iaria & col. (21), examinaram amostras de quibe cru vendido na cidade de São Paulo e obtiveram o isolamento de *S. schottmuelleri*. Leitão (27), analisando amostras de linguiça fresca de porco, obteve 23,5% de positividade para salmonelas, tendo isolado cepas pertencentes aos sorótipos *S. anatum*, *S. derby* e *Salmonella* sp. Cerqueira-Campos (11) constatou positividade de 14% para salmonelas em 50 amostras de carne crua moída, vendida no Município de São Paulo, tendo isolado cepas dos sorótipos *S. anatum*, *S. dublin* e *S. typhimurium*.

Vanpee & Mazibo (44), examinara, no Zaire, 653 amostras de carne e derivados durante o ano de 1972, e isolaram sorótipos de *Salmonella* a partir de 17 amostras. O fígado de suíno e o de bovino revelaram-se com um alto grau de contaminação em relação aos demais produtos examinados.

Quanto ao isolamento de salmonelas a partir de alimentos, o ICMSF (22), afirma que não é possível recomenda-se um método específico, que seja ao mesmo tempo satisfatório a todos os sorótipos dessas bactérias. Isto deve-se principalmente, ao fato das salmonelas se disseminarem através das fezes. Devido a este fato, as salmonelas estariam presentes nos alimentos juntamente com outras bactérias, em particular, outros membros da família Enterobacteriaceae. Estes microrganismos possuem muitas características comuns às salmonelas e, muitas vezes, estão presentes em maior número de que estas, resistem melhor ao calor, à congelação, à dessecção e a diversas substâncias antibacterianas, sendo que tais fatores tornam seu crescimento mais rápido e competitivo em relação às salmonelas.

Bryan & col. (6) confirmam que um dos problemas básicos no isolamento de salmonelas é o seu pequeno número em relação à quantidade de outras bactérias competidoras, ocorrendo isto, principalmente, em alimentos. Devido a este problema, geralmente os métodos seguem etapas sequenciais como o pré-enriquecimento não seletivo, enriquecimento seletivo, isolamento em placas de ágar seletivo e sua identificação final, bioquímica e sorológico. É importante salientar que, ao se escolher uma determinada metodologia, deve-se levar em conta o tipo de alimento a ser analisado (15).

Na tentativa de se obter uma maior recuperação de salmonelas a partir de alimentos, muitos autores têm sugerido a utilização de vários meios de enriquecimento seletivo e também uma série de temperaturas a tempos de incubação. Bryan & col. (6), relatam que, de uma maneira geral, vários pesquisadores recomendam o uso de um período de incubação que varia de 8 a 72 horas, em temperaturas de 35°C a 43°C.

Greenfield & Bankier (17) compararam as temperaturas de incubação no isolamento de salmonelas provenientes de vários materiais. Os meios de enriquecimento seletivo utilizados foram o TT a 35°C e o SF a 35°C e 43°C. Os autores obtiveram melhores resultados com o SF à temperatura de 43°C.

Em relação ao tempo de incubação, segundo Fagerberg & Avens (15), vários pesquisadores recomendam que os meios de enriquecimento seletivo sejam incubados por um período que varia de 16 a 96 horas. Harvey & Price (18) mostram a necessidade de se fazer subculturas dos meios de enriquecimento seletivo em tempos diferentes, principalmente em amostras contendo mais de um sorótipo de *Salmonella*. Isto ocorre em virtude de um sorótipo ser predominante em determinado tempo, enquanto outro pode ser predominante num período mais tardio. Segundo Poelma & Silliker (33), normalmente os caldos de enriquecimento seletivo devem ser incubados durante 24 horas, embora alguns investigadores recomendam períodos de 8, 48 e 72 horas.

Pelo exposto, planejou-se a realização deste trabalho que tem por objetivos: a) a pesquisa de bactérias do gênero *Salmonella* a partir de amostras de fígado de bovino naturalmente contaminado; b) comparar os resultados obtidos com alguns padrões mi-

crobiológicos nacionais para esse tipo de alimento; c) estudar a influência dos meios de enriquecimento seletivo, tempo e temperaturas de incubação no isolamento dessas salmonelas.

Material e Métodos

Foram adquiridas 50 amostras de fígado de bovino de diferentes feiras livres do Município de São Paulo, em barracas credenciadas para a venda de carnes de origem bovina, suína e de aves. As amostras de fígado, uma vez obtidas, eram transportadas para o laboratório e mantidas sob a refrigeração até o início da análise bacteriológica. O tempo decorrido entre a coleta das amostras e o começo dos exames, nunca ultrapassou o prazo de 2 horas.

A pesquisa de bactérias do gênero *Salmonella* foi realizada segundo as técnicas preconizadas pelo ICMSF (22). Assim, cada amostra de fígado bovino era dividida em 4 porções de 25g que eram então colocadas em 4 frascos contendo, cada um, 225ml de caldo de enriquecimento seletivo para salmonelas. Dois frascos continham caldo tetratrationato (TT) (Merck, art. nº 5285), adicionado de novobiocina a 0,4%, sendo um incubado à temperatura de 35°C e outro 43°C, ambos por 24 e 48 horas. Os outros 2 frascos continham caldo selenito cistina (SC) (Merck, art. nº 7709), os quais eram incubados nas mesmas condições dos frascos anteriormente citados.

Após a incubação e a partir do caldo de enriquecimento seletivo, eram semeadas, placas de ágar SS (Merck, art. nº 7667) e ágar verde brilhante (Difco B 285), as quais eram incubadas à temperatura de 35°C durante 24 horas.

Após o período de incubação, selecionavam-se de cada placa, colônias com características de salmonelas, ou seja, não fermentadoras de lactose, as quais eram, semeadas em tubos contendo ágar triplice-açúcar-ferro (Merck, art. nº 3915), posteriormente incubados a 35°C por 24 horas. Os tubos que se apresentavam com comportamento típico de salmonelas, eram submetidos a testes bioquímicos e sorológicos confirmatórios. Estes testes consistiam na produção de desaminase da fenilalanina, de urease, descarboxilase da lisina, fermentação de carboidratos, utilização do malonato e do citrato, prova de motilidade, produção de indol e reação de VM-VP.

Após a realização das provas bioquímicas, as cepas que se apresentavam com características de *Salmonella*, eram submetidas às provas de soro-aglutinação em placas de Huddleson para抗igenos somáticos "O" e flagelares "H".

As cepas positivas nas provas de soro-aglutinação, eram posteriormente enviadas à Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, onde era realizada a identificação dos sorótipos de salmonelas isolados.

Resultados e Discussão

Na literatura consultada existem poucos estudos realizados com relação a presença de salmonelas em fígado de bovino; encontram-se algumas pesquisas relacionadas, de um modo geral, à carnes frescas. Assim, Weossman & Carpenter (47) encontraram positividade para salmonelas de 74%, em carcaças de bovinos; Dixon & Peacock (citados por Bryan & col.) (6) isolaram cepas de salmonelas de 4% de carcaças de bovinos por eles analisados; Barrel (2), em amostras de carnes de bovinos, obteve 5,2% de positividade para salmonelas. Em nosso meio, Assumpção (1), constatou a presença de salmonelas em 10,6% das amostras de carnes de bovinos analisadas, enquanto que Leitão (27) encontrou 7,5%; ainda em nosso meio, Cerqueira-Campos (11) trabalhando com carne crua moída, obteve 14% de positividade para salmonelas.

Das 50 amostras de fígado analisadas, 24 (48%) apresentavam-se contaminadas por salmonelas. Estes resultados mostraram-se superiores aos obtidos, para este mesmo tipo de alimento, por Varela & Zozaya (45), 10,6%; Assumpção (1) 16%; Dixon & Peacock (citados por Bryan & col.) (6) 3% e VanPee & Mazibo (44) 6,4%.

Comparando-se os resultados do presente trabalho com os padrões vigentes adotados pelo Ministério da Saúde (29) e pela Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo (35), observa-se que 24 (48%) amostras de fígado bovino, positivas para salmonelas,

revelaram-se impróprias ao consumo, dado que esses padrões exigem ausência de salmonelas em 25g do produto analisado. A mesma porcentagem de amostras seria condonda se os resultados obtidos fossem comparados com o padrão português Ribeiro (34) e o adotado no Estado de Massachusetts, EUA (23).

Na Tabela 1, pode-se observar a frequência de isolamento dos diferentes sorótipos, em relação às amostras examinadas. Assim, verifica-se que a *S. infantis* mostrou-se presente em 6 (25%) das amostras, a *S. anatum* em 4 (16,7%), as *S. dublin*, *S. oranienburg*, *S. newport* e *Salmonella* sp. em 3 (12,5%) amostras respectivamente, as *S. derby*, *S. infantis* O:14+, *S. agona* e *S. tennessee* em 2 (8,3%) amostras, respectivamente e as *S. san diego*, *S. typhimurium*, *S. panama*, *S. montevideo* e *S. minnesota* em 1 (4,17%) amostras respectivamente. Por outro lado, na mesma tabela, observa-se que há amostras das quais se obteve o isolamento de cepas pertencentes a um único sorótipo de salmonela, enquanto que de outras, constatou-se positividade para dois, três e até quatro sorótipos diferentes, como é o caso de uma amostra em que se isolaram cepas de *S. minnesota*, *S. newport* e *S. agona* e uma outra para a qual não foi possível determinar-se o sorótipo a que pertencia.

Em nosso meio, vários pesquisadores estudaram a ocorrência de salmonelas em carnes frescas, preparadas ou não e em fígado de animais. Assim Assumpção (1) isolou *S. anatum* e *Salmonella* sp. de 10,2% das amostras de carnes de bovinos, *Salmonella* sp. de 16% das amostras de fígado de bovino e as *S. newton*, *S. give*, *S. anatum*, *S. cholerae-suis* var. Kunzendorff, *S. reading*, *S. paratyphi* B de 47,3% das amostras de fígado de suíno, por ele analisadas; Iaria & col. (21) isolaram a partir de quibe cru, *S. schottmuelleri* de 1 (5,3%) das 19 amostras examinadas; Pessoa & col. (31) isolaram a partir da carne de bovino, *S. anatum* de 22,5%, *S. derby* de 13,33%, *S. infantis* de 12,0%, *S. minnesota* de 10,0%, *S. dublin* de 9,09%, *S. newport* de 5,68%, *S. takoradi* de 5,3%, *S. agona* de 4,9%, *S. typhimurium* de 3,6% e *S. bredeney* de 3,23% das amostras estudadas; Leitão (27) constatou a presença, em carnes de bovinos, de *S. anatum* em 25,0%, *S. typhimurium* em 18,75%, *S. newport*, *S. bredeney* e *S. takoradi* em 6,25% das amostras analisadas, respectivamente; Baruffaldi & col. (3) trabalhando com carne fresca moída, obtiveram 56% de positividade para *Salmonella* sp.; Cerqueira-Campos (11) estudando a presença de salmonelas em carne crua moída, isolou *S. anatum* de 71,4%, *S. dublin* de 14,3%, *S. anatum* e *S. typhimurium* de 14,3% das amostras pesquisadas.

Em 1976, nos Estados Unidos da América (10) foram isoladas cepas de salmonelas de amostras de carne bovina identificadas como sendo pertencentes aos seguintes sorótipos: *S. typhimurium* de 54%, *S. dublin* de 19,7%, *S. newport* de 5,2%, *S. anatum* de 4,3% e *S. agona* de 1,8% das amostras estudadas. Na Inglaterra, Barrel (2) analisando carnes de bovinos, constatou a presença de *S. typhimurium*, *S. hadar* e *S. heidelberg* em 13% das amostras, respectivamente e de *S. virchow*, *S. agona* e *S. bredeney* em 8,7%, respectivamente. Varela & Zozaya (45), na Venezuela, analisaram vísceras de bovinos, tendo isolado *S. derby* de 37,4%, *S. panama* de 25,0%, *S. newington* de 25,0% e *S. vejle* de 12,5% das amostras estudadas. VanPee & Mazibo (44), no Zaire, isolaram cepas de *S. kibushi* de 60,0% e *S. newport* e *S. duisburg* de 20,0% das amostras de fígado de bovino analisadas, respectivamente. Thomason & col. (43), nos Estados Unidos da América, isolaram cepas de salmonela pertencentes ao sorótipo *S. minnesota*, *S. anatum* e *S. derby*, de fígado em pó de bovino, utilizado como suplemento proteíco.

Comparando-se os resultados apresentados na Tabela 1 com os obtidos pelo autores acima citados, observa-se uma certa coincidência entre os sorótipos isolados, mas com pequena variação quanto à sua frequência. Nota-se que em nosso meio o sorótipo que apresentou maior frequência de isolamento foi a *S. anatum*, fato que difere um pouco do observado no presente trabalho. Neste o sorótipo *S. anatum* ocupou o segundo lugar, sendo o mais frequente, *S. infantis*. Podemos observar, também, certa constância no isolamento de *S. typhimurium*, porém neste estudo a sua frequência foi muito baixa, tendo sido isolada apenas um (4,17%) das 24 amostras positivas para salmonelas.

De forma geral, relacionando-se os resultados obtidos por diferentes autores quanto à frequência do isolamento de salmonelas de origem não humana com aquelas provenientes de fonte humana, observa-se uma alta concordância entre ambos. A este respeito, Taunay (41), em São Paulo, analisando amostras de fezes humanas, num período de 17 anos, obteve uma maior frequência para *S. newport* (19,9%), *S. anatum* (11,2%), *S. typhimurium* (11,2%) e *S. derby* (10,0%); ainda em São Paulo, Pessoa & col. (31), também trabalhando com fezes humanas, verificaram uma predominância para *S. typhimurium*, (85,6%), tendo sido isoladas também cepas de *S. oranienburg* (3,6%), *S. derby* (2,0%), *S. newport* (1,0%) e *S. anatum* (0,8%). Nos Estados Unidos da América (10), os sorótipos frequentemente isolados de material humano, foram *S. typhimurium* (32,3%), seguido de *S. heidelberg* (8,4%), *S. newport* (5,7%), *S. enteritidis* (5,2%) e *S. infantis* (4,4%). Na Inglaterra e País de Gales, Taylor & McCoy (42) isolaram, de origem humana, o sorótipo *S. typhimurium* (67,9%), como sendo o mais frequente, mas isolaram também as cepas de *S. heidelberg* (5,0%), *S. enteritidis* (3,2%), *S. newport* (1,7%), *S. saint paul* (1,2%), *S. anatum* (0,9%), *S. dublin* (0,6%), *S. infantis* (0,5%), *S. tennessee* (0,5%) e *S. derby* (0,4%) entre outros.

No presente trabalho procurou-se estudar, também, uma possível relação entre o uso dos caldos de enriquecimento seletivo com as temperaturas e tempos de incubação, no isolamento de salmonelas a partir das amostras de fígado de bovino naturalmente contaminadas. Assim, na Tabela 2, pode-se observar que o caldo TT incubado à temperaturas de 43°C por um período de 48 horas, possibilitou o maior grau de positividade (75%) no isolamento de salmonelas a partir de amostras de fígado de bovinos; quando o tempo de incubação era de 24 horas, embora em proporção menor, obteve-se resultado também bastante satisfatório (66,7%). Nesta mesma tabela, os resultados apresentados sugerem que em relação ao caldo SC, tanto as temperaturas como os tempos utilizados na incubação, não apresentaram diferença aparente na recuperação de salmonelas. Isto faz crer que os tempos e temperaturas utilizados na incubação do caldo SC, não influem nos níveis de recuperação de bactérias do gênero *Salmonella*. Entretanto, cumpre salientar que ao se analisarem os resultados obtidos com o caldo TT incubado à temperatura de 35°C por 24 e 48 horas, verifica-se que os percentuais de recuperação de salmonelas foram inferiores aos obtidos quando da utilização do caldo TT a 43°C por 24 horas e do SC em temperaturas de 35°C e 43°C por 24 e 48 horas.

Comparando-se os nossos resultados obtidos em relação aos caldos de enriquecimento seletivo e a temperatura de incubação (Tabela 2), observa-se que os mesmos estão em concordância com os verificados em pesquisas de alguns autores. Assim, Erdman (14), na tentativa de encontrar um método melhor de recuperação de salmonelas a partir de carne crua, obteve para o caldo TT um maior grau de positividade em relação ao caldo SC ambos incubados a 43°C. Este autor afirmou, ainda, que a maior ou menor positividade obtida com um meio de enriquecimento, estariam na dependência do sorótipo de *Salmonella* presente. Carlson & col. (7), trabalhando com fezes contaminadas artificialmente, concluíram que os meios de enriquecimento seletivo à base de

Tabela 1 - Número e percentagem de amostras de fígado de bovino, segundo os sorótipos de *Salmonella* isolados

Sorótipos isolados	Amostras positivas	
	Nº	%
<i>S. infantis</i>	3	12,50
<i>S. infantis</i> O14+	2	8,32
<i>S. anatum</i>	2	8,32
<i>S. derby</i>	1	4,17
<i>S. dublin</i>	1	4,17
<i>S. oranienburg</i>	1	4,17
<i>S. panama</i>	1	4,17
<i>S. san diego</i>	1	4,17
<i>S. typhimurium</i>	1	4,17
<i>S. tennessee</i> - <i>S. oranienburg</i>	2	8,32
<i>S. agona</i> - <i>S. derby</i>	1	4,17
<i>S. anatum</i> - <i>S. infantis</i>	1	4,17
<i>S. dublin</i> - <i>S. newport</i>	1	4,17
<i>S. dublin</i> - <i>Salmonella</i> sp.	1	4,17
<i>S. infantis</i> - <i>S. infantis</i> O:14+	1	4,17
<i>S. newport</i> - <i>S. infantis</i>	1	4,17
<i>S. infantis</i> - <i>S. anatum</i> - <i>Salmonella</i> sp.	1	4,17
<i>S. montevideo</i> - <i>S. tennessee</i> - <i>S. oranienburg</i>	1	4,17
<i>S. minnesota</i> - <i>S. newport</i> - <i>S. agona</i> - <i>Salmonella</i> sp.	1	4,17
Total	24	100,00

tetrationato (TT e TVB) se mostraram superiores aos meios contendo selenito (SVB-sulfa, SC e SF), principalmente quando a incubação era feita à temperatura de 43°C. Entretanto, Silliker & Cabis (37), verificaram que entre os vários meios de enriquecimento seletivo utilizados por eles, no isolamento de salmonelas a partir de carne crua congelada, o SC incubado a 43°C forneceu maior grau de positividade (92,%) quando comparado com o TT (88%), nas mesmas condições de tempo e temperatura.

Em relação à temperatura de incubação, a opinião predominante entre vários autores é a de que a 43°C obtém-se melhor recuperação de salmonelas do que a 37°C (7, 9, 14, 16, 17, 19, 24, 30, 46). Os resultados obtidos no presente trabalho, concordam com tal opinião, porém somente com relação ao caldo TT a 43°C em que, aparentemente, se obteve maior grau de recuperação de salmonelas. No entanto, McCoy (28) em seu trabalho com águas poluídas por esgoto, verificou que o caldo TT incubado à temperatura de 43°C mostrava-se letal às salmonelas.

Alguns autores utilizaram temperaturas de incubação próxima de 43°C. A este respeito, Spino (40), trabalhando com águas de rios, obteve maior positividade em relação a recuperação de salmonelas à temperatura de 41,5°C e Smyser & col. (38), obtiveram melhor isolamento dessas bactérias a 42°C, a partir de subprodutos derivados de carnes.

Carlson & col. (9) trabalharam com amostras de carnes e farinha de ossos artificialmente contaminadas por *S. typhimurium* e por outras bactérias aeróbias. Os autores observaram uma melhor recuperação do patógeno quando os caldos de enriquecimento seletivo seriam incubados à temperatura de 45°C. Como explicação, sugeriram que os meios de enriquecimento seletivo incubados à temperaturas mais elevadas (41,5°C a 43°C) eram levemente mais inibidores para outros germes do que a 37°C. Uma outra explicação sugerida pelos autores é o fato de que em temperaturas elevadas a curva de crescimento dos demais microrganismos presentes seria afetada, apresentando, assim, população máxima menor do que a de *S. typhimurium*, além de morrerem mais rapidamente durante um período de, ainda, relativa estabilidade para a população do patógeno.

Quanto ao tempo de incubação, alguns autores recomendam o uso de, no mínimo, 2 períodos de incubação, nos quais são realizadas subculturas em intervalos determinados, em placas de ágar seletivo. Assim, recomendam o uso de tempos de incubação de 18-24 e 48 horas (12); 32 e 48 horas (9); 24 e 48 horas (7); 24 e 48 horas (24); 24 e 48 horas (13). Segundo Edgar & Soar (13), a prática de se utilizar mais de um períodos de incubação tem como finalidade aumentar a positividade no isolamento de salmonelas. Ainda, de acordo com estes dois autores, fazendo-se subculturas em placas de ágar seletivo nos dois período de incubação, a taxa de isolamento de salmonelas pode aumentar de 50 para 120%. McCoy (28) em seu trabalho com amostras de águas poluídas por esgoto, sugeriu que ao se fazer subculturas do meio de enriquecimento seletivo para salmonelas, incubado por 24, 48, 72 e 96 horas, poderiam ser selecionados, no mínimo, 85% de amostras positivas nos dois primeiros períodos de incubação (24 e 48 horas). Observou, ainda, que o isolamento de salmonelas não era obtido nas diferentes amostras ao mesmo tempo, mas eram recuperadas no decorrer do período de incubação, no qual eram feitas as subculturas em tempos determinados (24h, 48h, etc). Carlson & col. (8) comparando vários tempos de incubação do caldo de enriquecimento (24h, 48h e 96h), observaram que a maioria dos sorótipos eram recuperados após as 48 horas, sendo que poucos sorótipos eram recuperados após as 96 horas de incubação. Estes autores concluíram, também, que as subculturas feitas após as 48 horas de incubação, forneceram maior número de isolamentos positivos.

No presente estudo, utilizaram-se os períodos de incubação de 24 e 48 horas, observando-se, na Tabela 2, que o caldo TT incubado a 43°C, forneceu, aparentemente, maior grau de positividade no isolamento de salmonelas, após 48 horas de incubação. Quando o caldo SC, em 48 horas a 43°C, obteve-se uma taxa de positividade maior, porém muito próxima da observada em 24 horas à mesma temperatura. Pode-se considerar, ainda, pela observação dos resultados, que a incubação dos caldos por dois períodos de tempo a 43°C, possibilitou, embora em pequeno grau, um aumento na recuperação de salmonelas, fato que estaria em concordância com os autores acima citados.

Tabela 2 - Distribuição dos sorótipos de *Salmonella* isolados de fígado de bovino segundo as amostras examinadas, os meios de enriquecimento seletivo, as temperaturas e os tempos de incubação

Amostra nº	TT						SC									
	35°C			45°C			35°C			45°C						
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h				
1	-	S. dublin	Salmonella sp. S. dublin	-	S. dublin	S. dublin	S. dublin	S. dublin	-	-	-	-				
2	-	-	S. infantis O:14*	S. infantis O:14*	-	-	-	-	-	-	-	-				
3	S. newport	-	-	-	S. newport Salmonella sp.	S. minnesota S. agona	S. newport	S. newport	S. newport	-	-	-				
4	S. infantis O:14*	-	S. infantis O:14*	S. infantis O:14*	S. infantis O:14*	S. infantis O:14*	S. infantis O:14*	S. infantis O:14*	S. infantis O:14*	S. infantis O:14*	S. infantis O:14*	S. infantis O:14*				
5	-	-	S. derby	S. derby	S. derby	S. derby	-	-	-	-	-	-				
6	S. infantis	-	S. infantis	S. infantis	-	-	-	-	-	-	-	-				
7	-	-	S. anatum	S. anatum	-	-	-	-	-	-	S. anatum	-				
8	-	-	S. dublin	S. dublin	S. dublin	S. dublin	S. dublin	S. dublin	S. newport	-	-	-				
9	-	-	S. infantis	S. infantis	-	-	-	-	S. newport	S. newport	S. newport	S. newport				
10	-	-	S. infantis	S. infantis	S. infantis	S. infantis	S. infantis	S. infantis	S. infantis	S. infantis	S. infantis	S. infantis				
11	-	-	S. infantis	S. infantis	S. infantis	S. infantis	S. infantis	S. infantis	S. infantis	S. infantis	S. infantis	S. infantis				
12	-	-	-	-	S. dublin	S. dublin	-	-	-	-	S. dublin	-				
13	-	-	-	-	S. anatum	S. anatum	-	-	-	-	-	-				
14	-	S. anatum	S. infantis	S. anatum	S. infantis	S. anatum	S. anatum	S. anatum	-	-	-	-				
15	-	-	S. infantis	S. infantis	S. infantis Salmonella sp.	S. infantis S. anatum	-	-	-	-	-	-				
16	S. infantis	S. infantis	-	S. infantis	-	-	-	-	-	-	-	-				
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S. oranienburg				
18	S. oranienburg	-	S. tennessee	S. oranienburg	-	-	-	-	-	-	-	-				
19	-	-	-	S. montevideo S. oranienburg	-	-	-	-	S. oranienburg	S. tennessee S. oranienburg	S. tennessee S. oranienburg	-				
20	-	-	S. panama	S. panama	-	-	-	-	-	-	S. panama	-				
21	-	-	S. tennessee S. oranienburg	S. tennessee	-	-	-	-	S. tennessee S. oranienburg	-	S. tennessee S. oranienburg	-				
22	-	-	S. agona S. derby	S. agona S. derby	S. agona	-	-	-	S. agona	S. agona	S. agona	-				
23	-	-	-	-	-	-	S. san diego	-	-	-	-	-				
24	-	-	-	S. lymphimurium	-	-	-	-	-	-	-	-				
Total	5	20,82	3	12,58	16	65,78	13	758	11	45,88	10	41,78	10	41,78	11	45,88

Diversos autores procuraram explicar o porque da obtenção de resultados diferentes, após vários períodos de incubação. Knox & col. (25) apontaram como possível explicação para a diferença dos resultados obtidos na várias subculturas a partir de caldos TT em diferentes intervalos de tempo, a progressiva diminuição da seletividade do meio, devido a redução do tetracionato. McCoy (28) demonstrou que o tempo de incubação do caldo de enriquecimento seletivo, necessário para a recuperação de salmonelas em placas de ágar seletivo, estava relacionado com a concentração inicial do inóculo, pois quando em número pequeno, as salmonelas necessitavam de um tempo superior a 24 horas para serem isoladas. Outro fator apontado por este autor seria a natureza inibitória do meio de enriquecimento, onde maior concentração do agente seletivo demandaria maior tempo para a recuperação das salmonelas. Harvey & Price (20) sugerem que a prática de se fazer várias sub-culturas em intervalos de tempo diferentes, é muito importante principalmente se a amostra apresenta mais de um sorótipo de *Salmonella*, pois um determinado sorótipo pode predominar na amostra apenas um certo período de tempo.

Ainda na Tabela 2, pode-se verificar que em algumas amostras foi isolado mais de um sorótipo diferente de *Salmonella*. Outro fator a ser comentado é o de que alguns sorótipos isolados após 24 horas de incubação, enquanto outros após 48 horas, isto, considerando-se uma mesma amostra. Estes fatos aqui mencionados estão em concordância com o que foi encontrado por Harvey & Price (20).

Do exposto, pode-se depreender que a maior positividade no isolamento de salmonelas não estaria na dependência de apenas um fator isolado, mas de vários fatores interagindo mutuamente. Neste caso, a interação do meio de enriquecimento seletivo,

a temperatura e o tempo de incubação seriam, em conjunto, determinantes fundamentais para o melhor isolamento de salmonelas.

Referências Bibliográficas

1. Assumpção, L. - Pesquisa de bactérias do gênero *Salmonella* em carnes e seus derivados vendidos a retalho. *Arq. Hig. Saúde Públ.*, 29:473-486, 1946.
2. Barrel, R.A.E. - Isolations of salmonellas from human, food and environmental sources in the Manchester area: 1976-1980. *J. Hyg.*, 88:403-411, 1982.
3. Baruffaldi, R.; Vessoni Penna, T.C.; Colombo, A.J.; Almeida Cunha, B.C. - Levantamento das condições sanitárias da carne fresca moída vendida no varejo. *An. Farm. Quim. S. Paulo*, 19:139-155, 1979.
4. Bowmer, E.J. - *Salmonella* in food: a review. *J. Milk Food Technol.*, 28:74-86, 1965.
5. Bryan, F.L. - What the sanitarian should know about staphylococci and salmonellas in non-clairy products. I - Staphylococci. *J. Milk Food Technol.*, 31:110-116, 1968.
6. Bryan, F.L.; Fanelli, M.J.; Riemann, H. - *Salmonella* infections. In: - Riemann, H. & Bryan, F.L. - Food-borne infections and intoxication. 2.ed. New York, Academic Press, p.74-129, 1979.
7. Carlson, V.L. & Snoeyenbos, G.H. - Comparative efficacies of selenite and tetrathionate enrichment broth for the isolation of *Salmonella* serotypes. *Amer. J. Vet. Res.*, 35:711-718, 1974.
8. Carlson, V.L.; Snoeyenbos, G.M.; McKie, B.A.; Snyser, C.F. - A comparison of incubation time and temperature for the isolation of *Salmonella*. *Avian. Dis.*, 11:217-225, 1967.
9. Carlson, F.L. & Snoeyenbos, G.H. - Relationship of population kinetics of *Salmonella typhimurium* and cultural methodology. *Amer. J. Vet. Res.*, 33:177-184, 1982.
10. Center for Disease Control - *Salmonella* surveillance: annual summary 1977. Atlanta, Ga, 1979.
11. Cerqueira-Campos, M.L. - *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* e bactérias do gênero *Salmonella* em carne moída, vendida no Município de São Paulo (1976-1977). São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas da USP, 1980. (Tese de Doutoramento).
12. Edel, W. & Kampelmacher, E.H. - *Salmonella* isolation in nine european laboratories using a standardized technique. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 41:297-306, 1969.
13. Edgar, D. & Soar, M.S. - Evaluation of culture media for the isolation of *Salmonella* from sewage sludge. *J. Appl. Bact.*, 47:237-241, 1979.
14. Erdman, I.E. - ICMSF methods studies. IV International collaborative assay for detection of *Salmonella* in raw meat. *Can. J. Microbiol.*, 20:715-720, 1974.
15. Fagerberg, D.J. & Avens, J.S. - Enrichment and plating methodology for *Salmonella* detection in food: a review. *J. Milk Food Technol.*, 39:628-646, 1976.
16. Gabis, D.A. & Silliker, J.H. - ICMSF methods studies. IX - The influence of selective enrichment broths differential planting media, and incubation temperatures on the detection of *Salmonella* in dried foods and feed ingredients. *Can. J. Microbiol.*, 23:1225-1231, 1977.
17. Greenfield, J. & Bankier, J.C. - Isolation of *Salmonella* and *Arizona* using enrichment media incubated at 35°C and 43°C. *Avian. Dis.*, 13:864-871, 1969.
18. Harvey, R.W.S. & Price, T.H. - The examination of samples infected with multiple *Salmonella* serotypes. *J. Hyg.*, 65:423-434, 1967.
19. Harvey, R.W.S. & Price, T.H. - Elevated temperature incubation of enrichment media for the isolation of *Salmonella* from heavily contaminated materials. *J. Hyg.*, 66:377-381, 1978.
20. Harvey, R.W.S. & Price, T.H. - A review: principles of *Salmonella* isolation. *J. Appl. Bact.*, 46:27-63, 1979.

21. Iaria, S.T.; Queiroz, J.C. de; Paim, G.V. & Mello, D. de - Contaminação do quibe cru, vendido na zona central da Cidade de São Paulo, por microrganismos de origem fecal. Arq. Fac. Hig. S. Paulo, 19:111-121,
22. International Commission on Microbiological Specifications for Foods: microorganisms in foods. 1 - Their significance and methods of enumerations. 2.ed. Toronto, University of Toronto Press, 1978.
23. Jay, J.M. - Microbiologia moderna de los alimentos. Zaragoza, Ed. Acribia, 1978.
24. Kafel, S. & Bryan, F.L. - Effects of enrichment media nad incubation conditions on isolating salmonelae from ground-meat filtrate. Appl. Env. Microbiol., 34:185-191, 1977.
25. Knox, R.; Gell, P.G.H.; Pollock, M.R. - The selective action of tetrathionate in bacteriological media. J. Hyg., 43:147-158, 1943.
26. Lawrie, R.A. - Ciencia de la carne. Zaragoza, Acribia, 1967.
27. Leitão, M.F.F. - Salmonelas em águas fluviais e em alimentos não processados e industrializados de origem animal e vegetal no Estado de São Paulo. São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 1979. (Tese de Doutoramento).
28. McCoy, J.H. - The isolation of Salmonellae. J. Appl. Bact., 25:213-224, 1962.
29. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos - Resolução nº 13/78, D.O. União, p.11616-11617, 25/07/78.
30. Morris, G.K. & Dunn, C.G. - Influence of incubation temperature and sodium heptadecyl sulfate (Tergitol nº 7) on the isolation of Salmonellae from pork sausage. Appl. Microbiol., 20:192-195, 1970.
31. Pessôa, G.V.A.; Irino, K.; Calzada, C.T.; Melles, C.E.A.; Kano, E. - Ocorrência de bactérias enteropatogênicas em São Paulo no septênio 1970-1976. I - Sorótipos de *Salmonella* isolados e identificados. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 38:87-105, 1978.
32. Pestana, B.R. & Rugai, E. - Da presença de salmonelas nas carnes preparadas. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 7:5-7, 1947.
33. Poelma, P.L. & Silliker, J.H. - *Salmonella*. In: - American Public Health Association - Compendium of methods for the microbiological examination of foods, p.301-328, 1976.
34. Ribeiro, A.M.R. - Padrões bacteriológicos de alimentos portugueses. Rev. Microbiol., 5:17-25, 1974.
35. Secretaria de Estado da Saúde. Normas Técnicas Especiais Relativas a Alimentos e Bebidas - Norma Técnica nº 3. In: - Regulamento da promoção, preservação e recuperação da saúde no campo de competência da Secretaria de Estado da Saúde - São Paulo, p.153-154, 1979.
36. Silliker, J.H. - The salmonella problem: current status and future direction. J. Food Prot., 45:661-666, 1982.
37. Silliker, J.H. & Gabis, D.A. - ICMSF methods studies. V - The influence of selective enrichment media and incubation temperature on detection of *Salmonella* in raw frozen meats. Can. J. Microbiol., 20:813-816, 1974.
38. Smyser, C.F.; Snoeyenbos, G.H.; McKie, B.A. - Isolation of Salmonellae from rendered by product and poultry litter cultured in enrichment media incubated at elevated temperatures. Avian. Dis., 14:248-254, 1970.
39. Soonatrakul, W.; Andersen, B.R.; Bryner, J.H. - Raw liver as a possible source of *Vibrio fetus* septicemia in man. Amer. J. Med. Sci., 261:245-249, 1971.
40. Spino, D.F. - Elevated-temperature technique for the isolation of *Salmonella* from streams. Appl. Microbiol., 14:591-595, 1966.
41. Taunay, A.E. - Diagnóstico bacteriológico das salmonelas de origem animal, sua importância e frequência no Município de São Paulo. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 28:43-68, 1968.
42. Taylor, J. & McCoy, J.H. - *Salmonella* and *Arizona* infection. In: - Riemann, H., ed. - Food-borne infection and intoxication. New York, Academic Press, p.3-72, 1969.

43. Thomason, B.M.; Cherry, W.B.; Dodd, D.J. - *Salmonellae in health foods.* Appl. Env. Microbiol., 34:602-603, 1977.
44. VanPee, W. & Mazibo, F. - *Le role de viandes de boucherie dans l'epidemiologie de salmoneloses humaines a Kinshasa.* Ann. Soc. Belge Méd. Trop., 54:451-455, 1974.
45. Varela, G. & Zozaya, J. - *Hallzgo de Salmonella em alimentos (estudio de visceras de bovinos y porcinos y de leches).* Rev. Inst. Salubr. Enfer. Trop. (México), 5:171-172, 1944.
46. Vassiliadis, P; Patéraki, E.; Papaiconomou, N.; Papadakis, J.A.; Trichopoulos, D. - *Nouveaus procéde d'enrichissement de Salmonella.* Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 127B:195-200, 1976.
47. Weissman, M.A. & Carpenter, J.A. - *Incidence of Salmonellae in meat and meat products.* Appl. Microbiol., 17:899-902, 1969.
48. Wilson, G.S. & Miles, A.A. - *Topley & Wilson's principles of bacteriology and immunity.* 5.ed. Edward Arnold, vol.2, 1966.

PROTEASE (GELATINASE) EXCRETION AS AN UNSTABLE CHARACTER IN PROTEUS VULGARIS

Marisa Bianco

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

Sérgio Olavo Pinto da Costa

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

& Maria Christina Manhães Bonato

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

Summary

Some strains of *Proteus vulgaris* display the ability to excrete protease (gelatinase) as an unstable character, where a number of individuals in the population do not excrete the enzyme (P^- cells). The occurrence of P^- cells may be greatly increased by prolonged cultivation and through successive transfers in nutrient broth. This instability has not been observed with respect to some other biochemical features found in *P. vulgaris* such as indole production and urease synthesis.

Resumo

Excreção de protease (gelatinase) como um caráter genético instável em Proteus vulgaris

Algumas culturas de *Proteus vulgaris* apresentam instabilidade quanto à excreção de protease, sendo que um número de indivíduos da população não excreta essa enzima (células P^-). A ocorrência de células P^- em populações instáveis de *P. vulgaris* pode ser grandemente aumentada através de cultivos prolongados e repiques sucessivos em caldo nutritivo. Este fenômeno de instabilidade não foi observado com relação a outras propriedades bioquímicas de *P. vulgaris*, tais como produção de indol e síntese de urease.

Genetic instability related to protease excretion characterized by spontaneous and induced loss of the proteolytic activity and behavior of protease-excreting (P^+) and non-excreting cells (P^-) of *Proteus mirabilis* strains, had already been demonstrated (Costa, S.O.P. & col., Microbial Genet. Bull., 51:2, 1981; Costa, S.O.P. & col., Rev. Microbiol., 12(4):117, 1981; Costa, S.O.P. & col., Rev.

Microbiol., 13(1):35, 1982; Costa, S.O.P. & col., Rev. Microbiol., 13(1):46, 1982). We have now analysed colonies derived from 36 newly isolated *Proteus vulgaris* strains obtained from human clinical material of different sources and we have found some populations showing heterogeneity in terms of the ability of colonies to excrete protease. On the other hand, prolonged storage (one year) in nutrient agar of P⁺ colonies isolated from the same strains led to a considerable increase of the strains with high frequency of P⁻ individuals. The instability of protease production was also observed when some strains were either cultivated in nutrient broth for 21 days or submitted to daily subculturing in the same medium.

In contrast, such high level of instability does not appear to occur in several other bacterial species also endowed with proteolytic activity such as *Pseudomonas aeruginosa* (fourteen), *Bacillus subtilis* (seven), *Bacillus megatherium* (three), *Bacillus cereus* (five) and *Staphylococcus aureus* (seven). Two other biochemical characteristics of *P. vulgaris*, indole production, and urease synthesis, have been shown to be stable in the same *P. vulgaris* strains we have studied.

It is possible that in both, *P. vulgaris* and *P. mirabilis*, the instability of protease excretion relies on a similar phenomenon.

AVALIAÇÃO DO TESTE DE ELEK MODIFICADO, NO PREPARO DE ESPÉCIMES, PARA DETECÇÃO DE ENTEROTOXINA TERMOESTÁVEL (STA) DE *ESCHERICHIA COLI**

Marlene Braide Serafim
 Isildinha Aparecida Greggio Colli
 & Antonio Fernando Pestana de Castro
 Deptº de Microbiologia e Imunologia
 Unicamp
 Cidade Universitária Barão Geraldo
 13100 Campinas SP, Brasil

Resumo

O preparo de espécimes para detecção de enterotoxina termoestável (STA) de *Escherichia coli*, a partir de 73 amostras STA⁺, usando blocos de ágar, retirados da proximidades do crescimento, em meio de Biken e, em seguida, eluídos em tampão fosfato salina revelou que a enterotoxina STA produzida é insuficiente ou não é eluída, em quantidade adequada, para ser detectada pelo teste do camundongo recém nascido. A utilização de outros meios de cultura (Mac Conkey, CAYE-sólido e ágar simples) não melhorou o rendimento do método.

Summary

Evaluation of the modified ELEK test in the preparation of specimens for the detection of thermostable enterotoxins (STA) from Escherichia coli

The preparation of specimens for the detection of thermostable (STA) enterotoxin of *Escherichia coli* by 73 STA⁺ strains, using pieces of agar punched off from the proximity of their growth on Biken medium followed by elution of STA in phosphate buffered saline, revealed that the STA produced is either insufficient or is not eluted in appropriate quantities to be detected by the infant mouse test. The use of other culture media (such as Mac Conkey, solid-CAYE and nutrient agar) did not improve the efficiency of above method.

Para a detecção de enterotoxina termoestável (STA) de *Escherichia coli*, o teste do camundongo recém nascido (CRN) (Dean, A.G.; Ching, Y.; Willians, R.G. & Harden, L.B. - *J. Clin. Microbiol.*, 10:786-790, 1979) é o único ensaio biológico eficiente para o estudo desta enterotoxina e, graças a sua simplicidade, é largamente empregado. Apesar disto, a dificuldade que certos laboratórios têm em obter camundongos recém nascidos, bem como a necessidade de se cultivar as amostras de *E. coli*, em condições de alta oxigenação, para que haja produção de STA (Giannella, R.A. - *Infect. Immun.*, 14:95-96, 1976) tem levado alguns pesquisadores a idealizarem métodos mais simples, para o preparo de espécimes a serem examinados pelo teste do CRN (Gomes, J.A.; Rodrigues, A.C.; Simões, M.; Serafim, M.B. & Castro, A.F.P. de - *J. Clin.*

* Projeto financiado pela FINEP e CNPq.

Microbiol., 10:786-790, 1979; Honda, T.; Arita, M.; Takeda, Y. & Miwatani, T. - J. Clin. Microbiol., 16:60-62, 1982).

Recentemente, Honda & col. (Honda, T.; Arita, M.; Takeda, Y. & Miwatani, T. - J. Clin. Microbiol., 16:60-62, 1982) sugeriram o aproveitamento do teste de ELEK modificado, por eles descrito, para a detecção de enterotoxina termolábil (LT) (Honda, T.; Taga, S.; Takeda, Y. & Miwatani, T. - J. Clin. Microbiol., 13:1-5, 1981), também para o exame da produção da STA.

Deste modo, a partir do meio de Biken, distribuídos em placa de Petri (Honda, T.; Taga, S.; Takeda, Y. & Miwatani, T. - J. Clin. Microbiol., 13:1-5, 1981) 6 amostras de *E. coli* a serem examinadas quanto a produção de STA, eram semeadas, ao redor de um orifício central, feito no ágar. Após incubação a 37°C por 48h, retiravam-se do meio 2 blocos de ágar (φ 7mm), por amostra em teste. Os blocos de ágar eram então colocados em 0,4ml de tampão fosfato-salina (PBS) 0,01M, pH 7,0 permanecendo a 4°C, durante a noite, para a extração da STA. Os materiais eluídos eram então examinados pelo teste do CRN. Segundo estes autores (Honda, T.; Arita, M.; Takeda, Y. & Miwatani, T. - J. Clin. Microbiol., 16:60-62, 1982) houve alta correlação nos testes do CRN realizado com materiais preparados em meio líquido de casamino-ácido-extrato de levedura (CAYE) (Evans Jr., D.J.; Evans, D.J. & Gorbach, S.L. - Infect. Immun., 8:725-730, 1973) sob agitação (150rpm) e os preparados por esta técnica. No presente trabalho, fizemos uma avaliação do teste de ELEK modificado, para o preparo de materiais, para a detecção de STA, estudando também os meios de ágar simples, Mac Conkey, CAYE, adicionado de 1,2% de ágar. Foram examinadas 73 amostras de *E. coli* STA+, sendo 11 de origem humana e 62 de origem suína. Todos os procedimentos descritos no trabalho de Honda & col. (J. Clin. Microbiol., 16:60-62, 1982), foram seguidos, estudando-se ainda o efeito da eluição da STA por 24h, 48h e 72h, nos testes de CRN. Paralelamente, preparações de STA, das mesmas amostras, feitas pelo método usual (sobrejadantes de cultivo, em meio de CAYE, sob agitação) foram examinadas pelo teste do CRN.

Houve baixo rendimento do método proposto (Tabela 1). Reduzido número de amostras foi capaz de produzir STA, pelo menos em quantidade suficiente para ser detectada pelo teste do CRN e, assim mesmo, quando utilizado o meio de Biken. Não parece ter havido variação significativa nos resultados positivos, nas eluições feitas com 24 e 48h. Observar que, nos materiais eluídos com 72 horas, com exceção de dois, todos os resultados do teste do CRN foram negativos.

Os resultados do presente trabalho, dado o elevado número de reações falso-negativas, desaconselham o uso da técnica recomendada por Honda & col. (J. Clin. Microbiol., 16:60-62, 1982), para o preparo de espécimes, para a detecção de STA, o que reforça a validade de publicação anterior (Gomes, J.A.; Rodrigues, A.C.; Simões, M.; Serafim, M.B. & Castro, A.F.P. de - J. Clin. Microbiol., 10:786-790, 1979), sobre o preparo, em papéis de filtro, de materiais para a pesquisa de STA, onde foi observada total correspondência com os espécimes preparados pelo método usual.

Tabela 1 - Resultados da utilização do teste de ELEK modificado no preparo de espécimes a serem examinados quanto a produção de enterotoxina STA, pelo teste do cã mundongo recém nascido (CRN).

Símbolos: * = número de amostras positivas; (1) = Eluição de STA em tampão fosfato, após 24, 48 e 72h; MC = Meio de Mac Conkey; C-S = Meio de CAYE, adicionado de 1,2% de ágar; B = Meio de Biken; AS = Ágar simples

Origem das amostras	Método convencional* de preparo de STA	Método de ELEK modificado para preparo de STA*											
		24h				48h				72h (1)			
		MC	C-S	B	AS	MC	C-S	B	AS	MC	C-S	B	AS
Homem	11	2	1	2	2	1	2	2	0	0	0	0	0
Suínos	62	0	5	9	5	1	6	10	2	0	0	2	0

FRECUENCIA ETIOLÓGICA DE LA SHIGELOSIS POR ESPECIE Y SEROTIPO EN VENEZUELA

Gustavo Prieto

Ada Martínez

Irene de Cepeda

& Luisa de Urribarri

Centro Regional de Referencia Bacteriológica

Hospital Universitario de Maracaibo

Facultad de Medicina

Universidad Del Zulia

Maracaibo Venezuela

Resumen

Se determina la frecuencia etiológica por especie y por serotipo de 1369 cepas de *Shigella* aisladas durante el período 1968-1982 de coprocultivos procedentes principalmente de niños con clínica de disentería bacilar. De ellas, 870 (63.55%) son *Shigella flexneri* y 414 (30.24%) son *Shigella sonnei*. El predominio de *Shigella flexneri* se hace en base a los serotipos B2, B1, B3 y B6. Un incremento en los aislamientos de *Shigella sonnei* ocurre en el transcurso del estudio. A *Shigella dysenteriae* corresponden 77 (5.62%) cepas, 15 (19.48%) de ellas son *Shigella dysenteriae* A1 ocurriendo el último aislamiento de este serotipo en 1975. *Shigella dysenteriae* A2 se ha hecho endémico en la región y es responsable en los últimos 8 años del 96.6% de los aislamientos de *Shigella dysenteriae*. *Shigella boydii* es infrecuentemente aislada en nuestro medio (0.58%).

Summary

Etiological frequency for species and serotypes of Shigella in Venezuela

The etiological frequency for species and serotypes of 1369 *Shigella strains* isolated between 1968-1982 from diarrheal feces of children with symptoms of bacillary dysentery is reported. There were 870 (63.55%) *Shigella flexneri* and 414 (30.24%) *Shigella sonnei*. The predominant *Shigella flexneri* serotypes were B2, B1, B3 and B6. An increase of *Shigella sonnei* isolation is registered during the period of the study. There were 77 (5.62%) *Shigella dysenteriae* strains of which, 15 (19.48%) belong to *Shigella dysenteriae* serotype A1, occurring in 1975 the last isolation of this serotype. *Shigella dysenteriae* A2 is endemic in the region, being itself responsible, during the last 8 years for 96.6% of the *Shigella dysenteriae* isolation. *Shigella boydii* is infrequently isolated in this study (0.58%).

Introducción

Las shigelas son responsables del 10% al 20% de los casos de diarrea aguda a nivel mundial. La enfermedad que causa reviste por lo general las características de una infección seria que necesita de ser atendida en el Hospital donde se le diagnóstica en aproximadamente el 20% de pacientes con diarrea que ameritan hospitalización. Aunque la frecuencia de casos de disentería bacilar refleja el nivel sanitario y el desarrollo nutricional de un país, la relativa importancia de la enfermedad permanece constante de un país a otro (10). Epidemias con carácter cíclico de la enfermedad que se producen cada 20 años, han sido comentadas desde principios del siglo XV (14) y han sido confirmadas en este siglo cuando los serotipos de *Shigella* pudieron ser identificados. A comienzos del siglo XX *Shigella dysenteriae* A1 fue el serotipo más importante seguido luego por serotipos de *Shigella flexneri* y más recientemente por *Shigella sonnei* con ciclos de intervalos de 20 a 30 años. Se ha sugerido que toma un cierto número de años para que la inmunidad a la enfermedad alcance un nivel crítico antes que una cepa sea reemplazada por otra (17). El predominio de una determinada especie en un determinado país y sustitución de una especie por otra ha sido reconocida, así en la actualidad en los E.E.U.U. *Shigella sonnei* es responsable del 60% al 80% de los casos y serotipos de *Shigella flexneri* responsable de los casos restantes (6, 9, 16). *Shigella dysenteriae* A1 es con rareza el agente etiológico de la enfermedad en ese país. En Venezuela la enfermedad es endémica del país (21-23) por lo cual hemos creído de utilidad analizar en el presente trabajo la casuística etiológica por especies y serotipos correspondientes a shigelas aisladas en el transcurso de los años 1968-1982.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas - El material de estudio para el presente trabajo está representado por 1369 cepas de *Shigella* aisladas durante el período 1968-1982 de coprocultivos procedentes principalmente de niños con clínica de disentería bacilar. De estas, 808 (59.02%) se aislan de cultivos provenientes de pacientes que recibieron atención médica en el Hospital Universitario de Maracaibo, de ellos 806 proceden de coprocultivos y 2 de hemocultivos, las 561 (40.97%) restantes proceden de aislamientos logrados en otras Instituciones de la localidad, los cuales fueron enviados para su estudio al Centro Regional de Referencia Bacteriológica.

Aislamiento e identificación - Crecimiento de colonias con características compatibles con *Shigella* originado por la siembra directa de las heces o después de su enriquecimiento en Selenito-F, en las placas conteniendo los medios de *Salmonella* *Shigella* Agar (S.S.A.), Xilosa Lisina Dexosic平ato (X.L.D.) Eosina Azul de Metileno (E.M.B.) y MacConkey (M.C.) son seleccionadas para su aislamiento. Cepas enviadas al Centro Regional de Referencia Bacteriológica para corroboración o identificación son sembradas por agotamiento en medios de Agar Sangre Humano (A.S.H.), X.L.D. y M.C. para comprobar pureza del cultivo previo a su siembra en T.S.I. La metodología utilizada para su identificación bioquímica y serológica es con algunas variantes la descrita por Edwards y Ewing (11) y Ewing (12). Para la identificación serológica se utilizan antisueros BBL, Difco y Lee.

Tabla 1 - *Shigella*. 1369 cepas, 1968-1982. Distribución por especie y por año

	1968	1969	1970	1971	1972	1973	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982	Total	%
<i>S. flexneri</i>	20	27	14	27	93	103	92	140	72	66	65	49	54	25	23	870	63.55
<i>S. sonnei</i>	2	4	6	20	25	23	40	69	46	30	22	54	35	14	24	414	30.24
<i>S. dysenteriae</i>	7	9	-	3	10	6	12	5	1	4	8	4	4	2	2	77	5.62
<i>S. boydii</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	2	1	-	3	-	-	1	8	0.58

Tabla 2 - *Shigella flexneri*. 870 cepas, 1968-1982. Distribucion por serotipo y por año

	1968	1969	1970	1971	1972	1973	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982	Total	%
<i>S. flexneri</i>																	
B ₂	10	12	9	9	44	48	45	57	33	25	29	23	26	12	10	392	45.05
B ₁	6	9	1	3	19	30	17	25	25	21	19	14	18	8	3	218	25.05
B ₃	1	5	1	3	11	5	8	29	10	9	2	6	4	1	4	99	11.37
B ₆	3	1	2	7	13	9	12	18	3	5	11	2	5	3	5	99	11.37
B ₄	-	-	1	5	6	11	9	10	1	6	4	4	1	1	1	60	6.89
B ₅	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	2	0.22
Total	20	27	14	27	93	103	92	140	72	66	65	49	54	25	23	870	

Resultados

La Tabla 1 muestra la distribución por especies de 1369 cepas de *Shigella* aisladas durante los años 1968-1982. A la especie *Shigella flexneri* pertenecen 870 (63.55%) de ellas. Le sigue en frecuencia *Shigella sonnei* con 414 (30.24%) cepas. A las especies *Shigella dysenteriae* y *Shigella boydii* corresponden 77 (5.62%) y 8 (0.58%) de los aislamientos. Exceptuando la ausencia de *Shigella dysenteriae* en 1970, en todos los años del estudio se producen aislamientos pertenecientes a esta especie, a *Shigella flexneri* y a *Shigella sonnei*. *Shigella boydii* es la más infrecuentemente en nuestro medio, produciéndose durante los 15 años del estudio sólo 8 (0.58%) aislamientos, el primero de ellos en 1974. La representación gráfica de esta distribución por especies de las 1369 cepas de *Shigella* puede ser apreciada en la Figura 1.

La distribución por serotipos de *Shigella flexneri* puede apreciarse en la Tabla 2. Hay predominio de los serotipos B₂ (392 cepas), B₁ (218 cepas), B₃ (99 cepas) y B₆ (99 cepas), lo cual representa el 45.0%, 25.0%, 11.3% y 11.3% de las cepas aisladas de esta especie. Durante todos los años del estudio hay consistencia de los aislamientos de estos serotipos. Los dos aislamientos logrados a partir de hemocultivo pertenecen al serotipo B₂.

En la Tabla 3 se puede evidenciar la distribución por serotipos de *Shigella dysenteriae*. Se observa un predominio del serotipo A₂ con 42 cepas, el cual representa el 54.5% de los aislamientos logrados para esta especie. Le siguen en frecuencia los serotipos A₁ y A₃ con 15 (19.4%) y 13 (16.8%) aislamientos. Desde el año 1972 el serotipo A₂ se hace endémico de la región observándose persistencia en sus aislamientos anuales, siendo el responsable durante los últimos 8 años del 96.6% de los aislamientos correspondientes a *Shigella dysenteriae*.

Los 8 (0.58%) aislamientos que se producen de *Shigella boydii*, pertenecen a los serotipos C₁, C₂, C₅ y C₁₀ correspondiendo 2 aislamientos a cada uno de ellos.

Discusión

La casuística etiológica de nuestra shigelosis presenta algunas particularidades que merecen ser enfatizadas. Esta frecuencia etiológica es coincidente, en el predominio de los aislamientos que en base a serotipos de *Shigella flexneri* se presenta durante todos los años del estudio, con los reportados por Prieto (21) en un estudio en nuestro medio sobre 58 cepas de *Shigella* aisladas en el período 1968-1969, en el cual el 64% de los aislamientos pertenecen a esa especie y también lo es con los resultados obtenidos por Olarte (20) en México en 1960 donde reporta que el 76% de sus aislamientos corresponden a *Shigella flexneri*. Los resultados presentados muestran que durante el período 1968-1982 la proporción de aislamientos entre *Shigella flexneri* y *Shigella sonnei*, que es la especie que le sigue en frecuencia, es de 2:1. La casuística contrasta en estos hallazgos con los obtenidos en Estados

Unidos y Europa, en donde *Shigella sonnei* es la especie predominante (6, 9, 16). *Shigella sonnei* ha sido aislada más frecuentemente que *Shigella flexneri* en Estados Unidos desde 1968, representando para 1973, 1974, 1975 y 1976 el 83.6%, 75.8%, 64.5% y 62.3% de todos los aislamientos de shigelas reportados por el Center for Disease Control en los años mencionados (2-6). La proporción de aislamientos de *Shigella sonnei* en relación a *Shigella flexneri*, que le sigue en frecuencia, es en ese país de 20:1. El predominio de *Shigella sonnei* también ha sido reportado para Inglaterra, Europa Occidental, Japón y Corea (1, 8, 15, 17). Aún cuando existe el predominio de *Shigella flexneri*, nuestra casuística muestra una tendencia a disminuir la relación de aislamientos entre estas dos especies en base al incremento de *Shigella sonnei* durante los últimos años del estudio. El predominio de *Shigella flexneri* se hace en base a los serotipos B2, B1, B3, B6 y B4 y en este sentido los resultados son nuevamente coincidentes con los reportados por Prieto (21) en el período 1968-1969 y con los de otras casuísticas (2-6).

Tabla 3 - *Shigella dysenteriae*. 77 cepas, 1968-1982. Distribución por serotipo y por año

	1968	1969	1970	1971	1972	1973	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982	Total	%
<i>S. dysenteriae</i>																	
A ₂	1	-	-	-	3	1	8	5	1	4	7	4	4	2	2	42	54.54
A ₁	2	4	-	2	1	2	4	-	-	-	-	-	-	-	-	15	19.48
A ₃	4	5	-	-	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	16.88
A ₄	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	4	5.19
A ₇	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	3.89
Total	7	9	-	3	10	6	12	5	1	4	8	4	4	2	2	77	

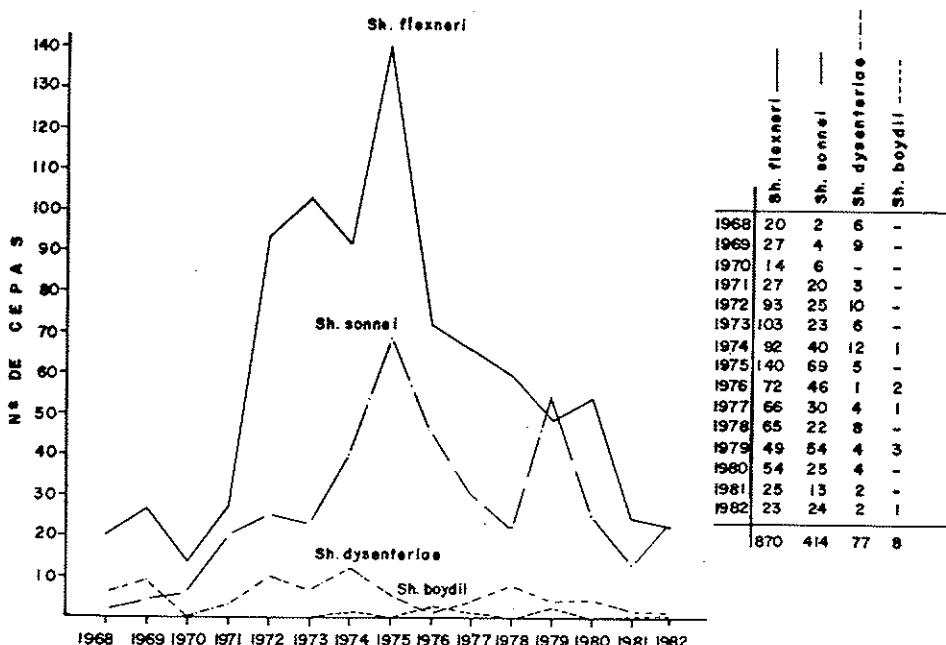
En 1965 Elkin, Solodovnikov & Padalkin (8) en U.R.S.S. describen la incidencia de *Shigella flexneri* en diferentes territorios de ella. Ellos incluyen la incidencia de fiebre tifoidea en las mismas zonas, sugiriendo que la incidencia de ésta última es un buen indicador de la prevalencia de infecciones gastrointestinales de origen hídrico. Los resultados de ese estudio muestran que áreas con altos niveles de fiebre tifoidea tienen más *Shigella flexneri* que *Shigella sonnei*, mientras que aquellas con baja incidencia del bacilo de Eberth muestran una mayor incidencia de *Shigella sonnei*. Hoy entendemos que el predominio de *Shigella sonnei* dentro de un determinado país durante un determinado período de años está aparentemente asociado con su incremento en la industrialización, nivel de desarrollo económico alcanzado y niveles altos en el standard de vida. En este sentido el predominio de *Shigella flexneri* de ésta casuística revela nuestra condición de un país en desarrollo donde alrededor de las grandes ciudades se crea por lo general un cinturón de miseria, en el cual se concentra la población de escasos recursos socio-económicos, con vivienda inadecuada, ausencia o malas condiciones en servicios sanitarios elementales y hacinamiento como elementos importantes.

En relación a *Shigella dysenteriae* los resultados muestran que el 5.62% de los aislamientos pertenecen a ésta especie, a la cual se le reconoce en especial al serotipo A₁ como productor de cuadros severos de shigelosis y de brotes epidémicos extensos. Ello refleja una disminución en los aislamientos de esta especie en nuestro medio en relación a un 27% reportado por Prieto (21), en los años 1968-1969. En los resultados que se presentan se observa que esta especie ha sido relegada a un tercer lugar por *Shigella sonnei*, la cual desde un 9% de aislamientos, para el período mencionado, ha alcanzado cifras del 30.24%. La especie ha mostrado una tendencia a desaparecer en otros sitios y actualmente en algunas casuísticas ocupa porcentajes muy bajos, así para 1964-1968, el Center for Disease Control (2) le asigna el 0.7% de las shigelas aisladas en Estados Unidos durante ese período. En nuestra casuística se observa una disminución de la frecuencia de los aislamientos de los serotipos pertenecientes a esta especie, incluyendo *Shigella dysenteriae* A₁,

es decir, el bacilo de Shiga. Aún cuando este serotipo no se aisla desde 1975 es interesante notar que durante los 15 años de este estudio se producen 15 aislamientos del mismo, ya que este serotipo se caracteriza por la severidad del cuadro clínico y por ser el agente etiológico de brotes extensos de shigelosis en Centro América en los años 1970-1971 (13, 18) y de otro más reducido en México en 1972 (20). Una excepción lo constituye el serotipo A2, el cual es un serotipo catalogado por el Center for Disease Control (7) como infrecuente y reportado solamente en una oportunidad en los años 1968-1969 por Prieto (21) en nuestro medio. Este serotipo se ha hecho endémico de la localidad y es responsable durante los últimos 8 años del 96.6% de los aislamientos correspondientes a *Shigella dysenteriae*.

La baja frecuencia de aislamientos de *Shigella boydii* (0.58%) registrada en esta casuística es también coincidente con otras, así reportes del Center for Disease Control le asignan un 0.8% en las shigelosis en los Estados Unidos (19).

Figura 1 - *Shigella*. 1369 cepas, 1968-1982. Distribución por especie y por año



Referencias Bibliográficas

1. Aoki, Y. - Serological groups of *Shigella* in Japan and neighboring countries. Tropical Medicine, 10:116-126, 1968.
2. Center for Disease Control - *Shigella* surveillance. Annual Summary Rep. 34, 1973.
3. Center for Disease Control - *Shigella* surveillance. Annual Summary Rep. 35, 1974.
4. Center for Disease Control - *Shigella* surveillance. Annual Summary Rep. 37, 1975.
5. Center for Disease Control - *Shigella* surveillance. Annual Summary Rep. 38, 1976.
6. Center for Disease Control - *Shigella* surveillance. Annual Summary Rep. 39, 1977.

7. Center for Disease Control - Morbidity & mortality. Weekly Report, 21:307-309, 1972.
8. Chun, D. - A review of salmonellosis and *Shigella* in Korea. Endem. Dis. Bull. Nagasaki Univ., 6:125-127, 1964.
9. Davies, F.; Farrant, W. & Uttley, A. - Antibiotic resistance of *Shigella sonnei*. Lancet, 2:1157-1159, 1970.
10. Dupont, H. & Pickering, L., eds. - Infections of the gastrointestinal tract: microbiology, pathophysiology and clinical features. New York/London, Plenum Medical Book, 1980.
11. Edwards, P. & Ewing, W. - Identification of Enterobacteriaceae. 3.ed. Minneapolis, Minnesota, Burgess Publishing, p.109-142, 1972.
12. Ewing, W. - Differentiation of Enterobacteriaceae by biochemical reactions. Atlanta, Georgia, U.S. Department of Health, Education and Welfare, Center for Disease Control, Enteric Bacteriology Laboratories, 1970.
13. Gangarosa, E.; Perera, D.; Mata, L.; Mendizabal, C.; Guzman; G. & Reller, B. - Epidemic *Shiga bacillus* dysentery in Central America. II - Epidemiological studies in 1969. Infect. Dis., 122:181-190, 1970.
14. Gettings, H. - Bacillary dysentery. Trans. Soc. Trop. Med. Hyg. (London), 8:111-114, 1914/1915.
15. Gillies, R. - Colicine production as an epidemiological marker of *Shigella sonnei*. J. Hyg. (Camb), 62:1-9, 1964.
16. Jarvis, K. & Scringeour, G. - In-vitro sensitivity of *Shigella sonnei* to trimethoprim and sulfametoazole. J. Med. Microbiol., 3:554-557, 1970.
17. Kostrzewski, J. & Stypulkowska-Misiurewica, A. - Changes in the epidemiology of dysentery in Poland and the situation in Europe. Archivum Immunologiae et Therapie Experimentalis, 16:429-451, 1968.
18. Mata, L.; Gangarosa, E.; Caceres, A.; Perera, D. & Mejicanos, M. - Epidemic *Shiga bacillus* dysentery in Central America. I - Etiologic: investigations in Guatemala, 1969. J. Infect. Dis., 122:170-180, 1970.
19. Nelson, J.; Kusmiesz, H. & Haltalin, K. - Endemic shigellosis: a study of fifty households. Am. J. Epidemiol., 86:683-686, 1967.
20. Olarte, J.; Filloy, L. & Galindo, E. - Resistance of *Shigella dysenteriae* type 1 to ampicillin and other antimicrobial agents: strains isolated during a dysentery outbreak in a Hospital in México city. J. Infect. Dis., 133:572-575, 1970.
21. 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.
22. Prieto, G. - Resistencia a la ampicilina mediada por Factores "R" en *Shigella*. Rev. Fac. Med. (Maracaibo), 6:38-56, 1973.
23. 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.

DETECÇÃO DA PESTE NO ESTADO DA BAHIA, BRASIL

Alzira Maria Paiva de Almeida
 Darcy Pascoal Brasil
 Maria Eliane Bezerra de Melo
 Nilma Cintra Leal
 & Célio Rodrigues de Almeida (Bolsista CNPq)

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

Resumo

Atividade da *Yersinia pestis* é demonstrada, bacteriológica e sorologicamente, nos focos pestosos da Bahia. Inquéritos sorológicos, nos canídeos domésticos, ajudam na detecção da peste dos roedores.

Summary

Observations on plague foci in Bahia State, Brazil

Yersinia pestis activity is proven bacteriologically and serologically in Bahia State plague foci. Testing of canine sera for plague antibody serve as valuable indicator of rodents infection.

Desde 1980, o teste de hemaglutinação passiva, para anticorpos contra a fração antigênica 1A da *Yersinia pestis* (WHO, 447:23-25, 1970), vem sendo empregado no diagnóstico da peste, nos focos do Estado da Bahia. Neste Estado, a área endêmica de peste abrange o Planalto Oriental, Chapada Diamantina, Piemonte da Diamantina, Serra do Formoso e Planalto da Conquista. Analisando a evolução da peste em território bahiano, Araújo, R.S. & Sherlock, I.A., mostram aspectos epidemiológicos, clínicos, terapêuticos e profiláticos no período de 1936 a 1967 ao mesmo tempo em que referem o isolamento da *Yersinia pestis* de diversas espécies de roedores silvestres e comensais. (Rev. Bras. Mal. D. Trop., 21:689-713, 1969 e 23:51-63, 1971).

Em 1974/1975, constatou-se importante recrudescimento da peste na Bahia, justamente quando o sistema de vigilância estava praticamente desativado, em consequência de uma impressão errônea da erradicação ou extinção espontânea dos focos (Informações Epidemiológicas Sucam - Ministério da Saúde, nº 15, 1984).

De 1980 a 1984, foram examinadas, no Laboratório de Peste do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, amostras de soros obtidas durante as investigações realizadas pela Superintendência de Campanhas de Saúde Pública do Ministério da Saúde, nos focos da Bahia, dos casos humanos considerados suspeitos de peste, caracterizados por febre e linfadenite.

Adicionalmente foram examinadas amostras de soro, para estudo retrospectivo de alguns casos com diagnóstico clínico de peste, nos anos anteriores. A partir de 1982, foi também realizada a pesquisa de anticorpos antipestosos, nos roedores comensais e silvestres e, em 1984, teve início a pesquisa sorológica da peste, nos canídeos domésticos. Segundo Rust, J.H. & col. (J. Infect. Dis., 5:522-526, 1971), os carnívoros domésticos se infectam por via oral, pela ingestão de roedores infectados. Enquanto os gatos desenvolvem uma forma grave da infecção, os cães fazem um quadro clínico benigno, raramente fatal. Ambas as espécies produzem rápida

resposta sorológica que pode ser considerada como indicador para o acionamento das medidas de profilaxia e controle, objetivando evitar os surtos humanos.

A Tabela 1 mostra a distribuição das amostras de soro positivas pelo teste de hemaglutinação, por Município, por ano e pela fonte de material.

Três cepas de *Yersinia pestis*, isoladas respectivamente, de um lote de pulgas *Xenopsylla cheopis*, no Município de Feira de Santana, suco bubonático de um paciente do Município de Valente e da medula óssea de uma falange do cadáver, de outro paciente do Município de Poções, apresentam as seguintes características: mobilidade negativa, fermentam a glicose (sem produção de gás) e o manitol, não fermentam a lactose, sacarose nem a glicerina; reduzem o nitrato; não produzem indol, nem H₂S; não hidrolizam a uréia e não possuem a enzima lisina descarboxilase; possuem os fatores de virulência P e W, demonstrados pelo desenvolvimento de colônias pigmentadas (P+), no meio Ágar Vermelho Congo e crescimento confluinte no meio Ágar Oxalato de Magnésio a <28°C, inibido a 37°C (W+) (Bahmanyar, M. & Cavanaugh, D.C. - WHO, Geneva, 1976).

Pelo exposto, verifica-se que está havendo constante atividade de *Yersinia pestis*, nos focos do Estado da Bahia e, à semelhança do que é observado em outros focos (Archibald, W.S. & col. - HSMHA Hlth. Rep., 86:377-380, 1971; Almeida, A.M.P. & col. - II Jornada Científica da Fiocruz, RJ, 1973), nestes os cães domésticos também representam valiosos detectores da infecção.

Tabela 1 - Soros com títulos de anticorpos hemaglutinantes contra a fração antigenica 1A de *Yersinia pestis* ≥1:16

Símbolos: a = 6 cães do mesmo local dos roedores positivados em 1983; b = procedentes da mesma localidade; c = *Rattus rattus frugivorus*

Município	Ano	Ponte		
		Roedor	Canídeo	Humano
Riachão do Jacuípe	1974	-	-	1
Riachão do Jacuípe	1975	-	-	1
Riachão do Jacuípe	1976	-	-	1
Iaçu	1980	-	-	2
Santa Terezinha	1980	-	-	1
Cafarnaum	1981	-	-	1
Conquistá	1982	-	-	2
Poções	1982	-	-	4
Valente	1983	-	-	1
Serrinha	1983	3	-	-
Serrinha	1984	-	14 ^a	2
Poções	1984	1 ^b	3 ^b	3 ^b
Valente	1984	-	3	-
Retirolândia	1984	-	1	-
Totais	-	4 ^c	21	19

ETIOLOGIA DAS DIARRÉIAS AGUDAS EM MANAUS: OBSERVAÇÕES AMBULATORIAIS E NA COMUNIDADE

Lorenny Gimenes Giugliano
 & Rodolfo Giugliano

Divisão de Microbiologia, Alimentação e Nutrição
 Deptº de Patologia Tropical
 Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA
 Caixa Postal 478
 69000 Manaus AM, Brasil

Resumo

Enteropatógenos foram investigados em 309 amostras de fezes diarréicas, de crianças de zero a seis anos de idade: 109 coletadas em ambulatório e 200 obtidas através de visitas domiciliares à comunidades péri-urbanas de Manaus. A mais alta incidência de diarréia foi observada na faixa etária de zero a 5 meses de idade, tanto em ambulatório como na comunidade. Os enteropatógenos mais frequentemente isolados foram *Shigella* sp. nos casos ambulatoriais e *Escherichia coli* enterotoxigênica, na comunidade.

Summary

Etiology of acute diarrhoea in Manaus: comparison between outpatients and community cases

Enteropathogens were identified in 309 samples of acute diarrhoea from children between zero and six years of age. One hundred and nine samples were obtained from outpatients and the remainder was collected by household visits in peri-urban communities of Manaus. The highest frequency of diarrhoea was observed in children in the zero to 5 months age group in both samples. The most frequent enteropathogen isolated from outpatients was *Shigella* spp. and from communities patients was enterotoxigenic *Escherichia coli*.

Introdução

A doença diarréica, especialmente nos primeiros dois anos de vida, é a principal causa de mortalidade, nos países em desenvolvimento. Dados da mortalidade geral registrada nos últimos cinco anos em Manaus mostram que 30% do total de óbitos foram causados por doenças infecciosas, aproximadamente, 82% destas sendo infecções entéricas (1).

Apesar das altas taxas de mortalidade na doença diarréica nesta região ainda são pouco conhecidos vários aspectos desta enfermidade, tais como, frequência, etiologia, sazonalidade e fontes de infecção. A alta incidência de diarréia nesta área, já foi relatada (9) e a etiologia da doença investigada em um pequeno grupo de crianças de zero a um ano de idade, residentes em uma comunidade de baixo nível socio-econômico de Manaus (10). Contudo, o estudo dos agentes causadores de diarréia e suas frequências é muito complexo, uma vez que vários fatores estão envolvidos no problema.

Assim, a frequência de isolamento de cada um dos possíveis agentes etiológicos de diarréia varia, consideravelmente, de acordo com diferentes autores e regiões do mundo (2, 3, 5, 13, 14, 15, 19). Um dos prováveis fatores envolvidos nessa variabilidade é a procedência dos casos diarréicos estudados. Guerrant & col. (12) encontraram *E. coli* enterotoxigênica em 68% dos casos de diarréia, em pacientes hospitalizados, enquanto que frequências bem mais baixas têm sido reportadas em estudos comunitários, variando de 10% a 32% (2, 3, 13, 23). O mesmo ocorre na detecção de rotavírus. Em Belém, Pará foram encontrados rotavírus em 33% dos casos de diarréia aguda em crianças que procuravam atendimento médico (18), enquanto a frequência do agente, na comunidade, varia de 4% a 24% (2, 3, 13).

O objetivo do presente trabalho é relatar os prováveis agentes etiológicos das doenças diarréicas tanto em crianças que procuravam atendimento ambulatorial como em crianças diarréicas residentes em comunidades de baixo nível sócio-econômico da área peri-urbana de Manaus.

Material e Métodos

Amostragem - Trezentas e nove amostras de fezes de crianças com diarréia aguda, na faixa etária de zero a seis anos de idade, foram examinadas quanto a presença de enteropatógenos. Destas, 200 amostras foram coletadas em comunidades de baixo nível sócio-econômico da área peri-urbana de Manaus. As demais 109 amostras foram obtidas de crianças atendidas em 2 hospitais locais (Hospital Infantil Dr. Fajardo e Instituto de Medicina Tropical de Manaus) aos quais convergem principalmente as populações carentes da cidade incluindo-se as residentes nos bairros periféricos visitados no estudo comunitário.

As amostras ambulatoriais foram coletadas por ocasião do primeiro atendimento da criança nos hospitais. As amostras provenientes da comunidade foram obtidas através de inquérito domiciliar sobre a presença de diarréia no momento da visita.

Bacteriologia de fezes - As amostras de fezes foram coletadas em solução tamponada de salina e glicerol. O isolamento e identificação das enterobactérias patogênicas foram feitos segundo Edwards & Ewing (6). Pelo menos cinco cepas de *Escherichia coli* foram isoladas de cada caso, para a determinação da enterotoxigenicidade, capacidade invasora e sorogrupo. Os sorogrupo enteropatogênicos 026, 055, 086, 0111, 0119, 0124, 0125, 0126, 0127 e 0128 foram investigados, através do teste de aglutinação em lâmina, com antisoros específicos (Difco), em todas as cepas dos germes isolados de crianças até três anos de idade.

Determinação da capacidade invasora - Foi adotado o método recomendado por Toledo & Trabulsi (25). As cepas de *E. coli* que não utilizavam lisina foram submetidas a soro-aglutinação em lâmina, usando-se soros hiperimunes (ProBac) preparados contra os sorogrupo invasores de *E. coli* 028ac, 029, 0112ac, 0124, 0136, 0143, 0144, 0152, 0164 e 0167. A confirmação da capacidade invasora das cepas que pertenciam a um destes sorogrupo, foi pelo teste de Sereny (21).

Testes para produção de enterotoxina - A enterotoxina termolábil (LT) foi detectada pela inoculação em cultura de células Vero, de rim de macaco Verde Africano (11). A enterotoxina termoestável (ST) foi detectada por inoculação em camundongos recém-nascidos (4).

Exame parasitológico de fezes - A presença de ovos e cisto, de helmintos e protozoários respectivamente, nas amostras diarréicas foi determinada pelo método de Faust (7).

Resultados

A maioria dos casos de diarréia ocorreram no primeiro ano de vida tanto na comunidade como nos casos ambulatoriais (Tabela 1). A faixa etária mais atingida foi a de 0 a 5 meses de idade, representando aproximadamente, 40% dos casos estudados, em ambas as amostras.

Tabela 1 - Distribuição por faixa etária dos casos de diarréia ambulatoriais e na comunidade em Manaus

Faixa etária (meses)	Casos					
	Ambulatório		Comunidade		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
0 - 5	44	40,4	82	41,0	126	40,8
6 - 11	29	26,6	39	19,5	68	22,0
12 - 23	21	19,3	39	19,5	60	19,4
24 - 35	8	7,3	18	9,0	26	8,4
36 - 71	7	6,4	22	11,0	29	9,4
Todas as idades	109	100	200	100	309	100

Tabela 2 - Enteropatógenos identificados de casos de diarréia ambulatoriais e na comunidade peri-urbana de Manaus

Patógenos	Ambulatório (n = 109)	Comunidade (n = 200)	Total (n = 309)
<i>E. coli</i> enterotoxigênica ST	3	2,8%	25 12,5%
<i>E. coli</i> enterotoxigênica LT	11	10,0%	9 4,5%
<i>E. coli</i> enterotoxigênica ST/LT	1	0,9%	7 3,5%
Total	15	13,8%	56 18,1%
<i>E. coli</i> enteropatogênica	12	11,0%	33 10,7%
<i>E. coli</i> invasora	1	0,9%	5 1,6%
<i>Shigella</i> sp.	23	21,0%	14 7,0%
<i>Salmonella</i> sp.	1	0,9%	9 2,9%
<i>Giardia lamblia</i>	11	10,0%	18 9,0%
<i>Entamoeba histolytica</i>	11	10,0%	21 6,8%
Não detectados	46	42,2%	152 49,2%

Em cerca de 50% do total de casos estudados, um provável agente etiológico foi identificado (Tabela 2). O enteropatogênico, mais frequentemente isolado, das amostras de fezes diarréicas, coletadas nas comunidades, foi *Escherichia coli* enterotoxigênica (EPEC), na frequência de 20,5%, enquanto que, nas amostras ambulatoriais, foi *Shigella* sp. na frequência de 21,0%. Quanto ao tipo de enterotoxina produzida por *E. coli*, predominaram as cepas produtoras de enterotoxina ST, nas amostras de fezes diarréicas, colhidas da comunidade; o inverso ocorreu em relação às cepas produtoras de enterotoxina LT.

Duas espécies de *Shigella* foram isoladas, no total de casos estudados, a saber: *Shigella flexneri* com 9% (28, em 309 casos) e *Shigella sonnei*, com 3% (9, em 309 casos).

E. coli enteropatogênica (EPEC) foi isolada em 11% dos casos ambulatoriais, sendo que sete cepas pertenciam ao sorogrupo 0111, 3 ao 0125, uma ao 0119 e uma ao 055. Das 21 cepas de EPEC isoladas de amostras diarréicas da comunidade oito foram sorogrupo 086, cinco 0125, três 0128, duas 0111, duas 0119 e uma 026.

Das cepas de *E. coli* invasora (EIEC) isoladas, duas pertenciam ao sorogrupo 028, uma ao 029 e uma ao 0143.

Na detecção de enterotoxina LT, em cultura de células Vero, foram determinados em 27 casos (8,7%) cepas de *E. coli* citotoxigênicas, sendo 15 casos (13,8%) ambulatoriais e 12 casos (6,0%) da comunidade.

Foram encontradas associações de enteropatogênicos em 30 dos 157 casos (19,9%) nos quais pelo menos um enteropatogênico foi detectado (Tabela 3). A associação mais frequentemente observada foi *Shigella* sp. e *Entamoeba histolytica* (37,6% do total de associações). Não houve diferenças entre os tipos de associações encontradas nos casos ambulatoriais e na comunidade.

Não foram encontrados helmintos nos casos de diarréia no primeiro ano de vida (Tabela 4). Entretanto, a presença de protozoários nessa faixa etária foi relativamente elevada: *Giardia lamblia*, 6,2% e *Entamoeba histolytica*, 7,2%.

Discussão

A faixa etária mais atingida pela diarréia aguda foi de zero a cinco meses de idade. Este resultado concorda com os dados do estudo longitudinal das diarréias agudas, realizado durante 20 meses em uma comunidade de baixo poder aquisitivo de Manaus, onde as crianças mais jovens apresentaram a mais alta incidência de diarréia (dados a serem publicados). Vários fatores influenciam a frequência de diarréia por faixa etária. Um dos mais importantes é a época do desmame, uma vez que tem sido demonstrado que o leite materno exerce efeito protetor contra as diarréias (8, 16). O estudo de crianças, no primeiro ano de vida em Manaus revelou que somente cerca de 7%, nos primeiros três meses de vida recebiam exclusivamente leite materno e que a maioria das crianças recebia outros alimentos desde as primeiras se-

manas de vida (22). A introdução precoce destes alimentos, na dieta da criança, associada às baixas condições de higiene e saneamento, prevalentes na área, poderia explicar a alta frequência de casos de diarréia, em crianças tão novas.

O enteropatogênico mais frequentemente isolados nos casos ambulatoriais foi *Shigella* sp. enquanto que em comunidades predominou *E. coli* enterotoxigenica. A presença de diarréia muco-sanguinolenta acompanhada de dores abdominais e às vezes febre, nos casos de infecções causadas por agentes invasores, tais como *Shigella* sp. e *E. histolytica*, impressiona os familiares e poderia explicar a maior procura de atendimento médico nesses casos. Por outro lado, vários trabalhos tem relatado o isolamento de ETEC em indivíduos assintomáticos (3, 13, 15, 20, 23) o que explicaria a maior frequência de isolamento destes organismos na comunidade, uma vez que a causa específica de cada caso de diarréia é dificilmente estabelecido e o encontro de um determinado enteropatogênico não é prova conclusiva da etiologia da doença.

Tabela 3 - Associações de enteropatogênicos, encontrados em 30 casos de diarréia aguda em Manaus.

Símbolos: + = Um caso associado com EPEC; * = Um caso associado com Giardia lamblia; ° = Um caso associado com EIEC

Associações de enteropatogênicos	Casos	
	Nº	%
<i>Shigella</i> sp. + <i>E. histolytica</i> *	11	36,7
<i>Shigella</i> sp. + EPEC*	4	13,3
<i>Shigella</i> sp. + Giardia lamblia	1	3,3
<i>Shigella</i> sp. + EPEC	1	3,3
EPEC + <i>E. histolytica</i>	2	6,7
EPEC + Giardia lamblia°	4	13,3
EPEC + <i>Salmonella</i> sp.	1	3,3
EPEC + Giardia lamblia	4	13,3
EIEC + <i>Salmonella</i> sp.	1	3,3
EIEC + Giardia lamblia	1	3,3
Total	30	100

Tabela 4 - Helmintos presentes em 309 casos de diarréia aguda ambulatoriais e na comunidade em Manaus

Helmintos	Ambulatório (n = 109)	Comunidade (n = 200)	Total (n = 309)			
<i>Ascaris lumbricoides</i>	8	7,3%	27	13,5%	35	11,3%
<i>Trichuris trichiura</i>	7	6,4%	14	7,0%	21	6,8%
<i>Ancylostomidae</i>	2	1,8%	6	3,0%	8	2,6%
<i>Strongyloides stercoralis</i>	1	0,9%	2	1,0%	3	1,0%

As associações de enteropatogênicos, nos casos de diarréia aguda, têm sido reportadas por vários autores em frequência comparável às encontradas no presente trabalho (2, 3, 13). Contudo, é notável a alta frequência observada, na associação entre *Shigella* sp. e *E. histolytica*, representando 36,7% das associações de enteropatogênicos. Pacientes com este tipo de infecção mista, em geral apresentam severa entero-colite, caracterizada por copiosa diarréia, febre e pronunciada desidratação (27), o que corroboraria a hipótese da severidade dos sintomas influenciarem as mães a procurarem atendimento médico, uma vez que a frequência desta associação foi mais elevada em pacientes de ambulatório (54,5%) do que na comunidade (26,3%).

A frequência de isolamento de *E. coli* enteropatogênica foi semelhante nas amostras estudadas, predominando os grupos sorológicos 0111, nos casos ambulatoriais e 086, na comunidade. O significado do isolamento destas cepas, em comunidades abertas ainda não é claro, uma vez que estes enteropatogênicos têm sido relacionados com surtos epidêmicos em ambientes fechados e seu mecanismo de patogenicidade permanece obscuro. Contudo, em São Paulo, o estudo de 320 casos de diarréia endêmica, em crianças de 0 a 5 meses de idade, mostrou que *E. coli* enteropatogênica foi o agente mais frequentemente isolado e que os sorotipos 0111ab:H-, 0111ab:H2 e 0119:H6 estão significantemente associados com diarréia nessa faixa etária (24).

Vários estudos têm tentado correlacionar o encontro de *E. coli* citotoxigenicas com a etiologia das diarréias agudas (17, 26). No presente trabalho, *E. coli* cito-

toxigenica ocorreu em aproximadamente 8% do total dos casos estudados. Porém, estes organismos não foram incluídos no quadro geral dos possíveis agentes etiológicos, uma vez que não existe ainda um consenso estabelecido quanto ao papel de tais cepas na patogenia das diarréias agudas.

Assim, este estudo apresenta algumas evidências sobre a importância relativa dos possíveis enteropatogênicos encontrados nos casos de diarréia aguda na infância, de conformidade com a origem das amostras estudadas. Uma vez que tomamos em consideração apenas os casos de diarréia na comunidade e ambulatoriais, é possível que diferenças ainda mais importantes existam em relação à etiologia das diarréias, em pacientes hospitalizados, nos quais não somente a severidade dos casos, mas também o fator infecção intra-hospitalar, deve ser considerado.

Agradecimentos

Os autores desejam expressar sua gratidão pelo apoio recebido do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq e as equipes médicas do Hospital Infantil Dr. Fajardo e do Instituto de Medicina Tropical de Manaus.

Referências Bibliográficas

1. Anuário Estatístico do Brasil. Rio de Janeiro, IBGE, Brasil, 1981.
2. Black, R.E.; Merson, M.H.; Rahman, A.S.M.M.; Yunus, M.; Alim, A.R.M.A.; Huq, I.; Yolken, R.H. & Curnin, G.T. - A two-year study of bacterial, viral, and parasitic agents associated with diarrhoea in rural Bangladesh. *J. Infect. Dis.*, 142:660-664, 1980.
3. Black, R.E.; Brown, K.H.; Becker, S.; Alim, A.R.M.A. & Huq, I. - Longitudinal studies of infectious diseases and physical growth of children in rural Bangladesh. II - Incidence of diarrhoea and association with known pathogen. *Am. J. Epidemiol.*, 155:315-324, 1982.
4. Dean, A.G.; Ching, Y.C.; Williams, R. & Harden, L.B. - Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhoea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.*, 125:407-411, 1972.
5. Donta, S.T.; Wallace, R.B.; Whipp, S.C. & Olarte, J. - Enterotoxigenic *Escherichia coli* and diarrhoeal disease in Mexican children. *J. Infect. Dis.*, 135:482-485, 1977.
6. Edwards, P.R. & Ewing, W.H. - Identification of Enterobacteriaceae. 3.ed. Minneapolis, Burgess Publishing, 1972.
7. Faust, E.C.; Sawitz, W.; Tobie, J.; Odom, V.; Peres, C. & Lincicome, D.R. - Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoa and helminths in fezes. *J. Parasitol.*, 25:241-262, 1939.
8. Feachem, R.G. & Koblinsky, M.A. - Interventions for the control of diarrhoeal disease among young children: promotion of breast feeding. *Bull. World Health Organization*, 63:271-291, 1984.
9. Giugliano, L.G.; Giugliano, R. & Pinheiro, M.F.S. - Bactérias enteropatogênicas em lactentes de um bairro de Manaus, Amazonas. *Acta Amazônica*, 7:395-400, 1977.
10. Giugliano, L.G.; Nakagima, G.S.; Giugliano, R. & Shrimpton, R. - *Escherichia coli* enteropatogênicas isolada em lactentes em Manaus, Amazonas, Brasil. *Rev. Microbiol. (São Paulo)*, 9:198-201, 1978.
11. Giugliano, L.G.; Mann, G.F. & Drasar, B.S. - Response of mammalian cell lines to the toxins of *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.*, 15:531-539, 1982.
12. Guerrant, R.L.; Moore, R.A.; Kirschenfeld, P.H. & Sand, M.A. - Role of toxicogenic and invasive bacteria in acute diarrhoea on childhood. *N. Engl. J. Med.* 293:567-573, 1975.
13. Guerrant, R.L.; Kirchhoff, V.; Shields, D.S.; Nations, M.K.; Leslie, J.; de Souza, M.A.; Araujo, J.G.; Correia, L.L.; Sauer, K.T.; McClelland, K.E.; Trowbridge, F.L. & Hughes, J.M. - Prospective study of diarrhoeal illness in Northeastern Brazil: patterns of disease, nutritional impact, etiologies and risk factors. *J. Infect. Dis.*, 148:986-997, 1983.

14. Gurwith, M.H. & Williams, T.W. - Gastroenteritis in children: a two-year review in Manitoba. I - Etiology. *J. Infect. Dis.*, 136:239-247, 1977.
15. Hughes, J.M.; Roise, J.D.; Barada, F.A. & Guerrant, R.L. - Etiology of summer diarrhoea among the Navajo. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 29:613-619, 1980.
16. Jelliffe, D.B. & Jelliffe, E.F.P. - Human milk in the modern world. Oxford, Oxford University Press, 1979.
17. Konowalchuk, J.; Speirs, J.I. & Stavric, S. - Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 18:775-779, 1977.
18. Linhares, A.C.; Monçao, H.C.; Gabbay, Y.B.; Araújo, V.L.C.; Serruya, C. & Loureiro, E.C.B. - Acute diarrhoea associated with rotavirus among children living in Belém, Brazil. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 77:384-390, 1983.
19. Mol, P.; Brasseur, D.; Henelhof, W.; Kalala, T.; Butzler, J.P. & Vis, H.L. - Enteropathogenic agents in children with diarrhoea in rural Zaire. *Lancet*, 1:516-518, 1983.
20. Reis, M.H.; 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.
21. Sereny, B. - Experimental *Shigella* keratoconjunctivitis: a preliminary report. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 2:293-296, 1955.
22. Shrimpton, R. & Giugliano, R. - Nutrição em lactentes de um bairro de Manaus, Amazonas. *Acta Amazônica*, 7:247-253, 1977.
23. Spencer, H. C., Wells, J.G., Gary, W., Sondy, J., Puhr, N.D. & Feldman, R.A. - Diarrhea in a non-hospitalized rural Salvadoran population: the role of enterotoxigenic *Escherichia coli* and rotavirus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 29:246-253, 1980.
24. Toledo, M.R.F., Alvariza, M.C.B., Murahovshi, J., Ramos, S.R.T.S. & Trabulsi, R.L. - Enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes and endemic diarrhea in infants. *Infect. Immun.*, 39:586-589, 1983.
25. Toledo, M.R.F. & Trabulsi, L.R. - Correlation between biochemical and serological characteristics of *Escherichia coli* and results of the Serény test. *J. Clin. Microbiol.*, 17:419-421, 1983.
26. Wade, W.G., Thom, B.T. & Evans, N. - Cytotoxic enteropathogenic *Escherichia coli*. *Lancet*, II:1235-1236, 1979.
27. WHO Technical Report Series, nº 666. Intestinal protozoan and helminthic infections. Geneva, 1981.

SOROGRUPOS DE *ESCHERICHIA COLI* ENVOLVIDOS EM INFECÇÃO URINÁRIA, EM BOTUCATU SP

Darci Satsuki Aoki Watanabe
 Carlos Alberto de Magalhães Lopes
 Regina Maria Santinho Tosoni Decarlis
 Lourival Antonio Michelin

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

& Augusto Cezar Montelli

Deptº de Clínica Médica
 Faculdade de Medicina UNESP
 Campus de Botucatu

Resumo

Foram sorogrupadas 1113 amostras de *E. coli* originadas de urinoculturas positivas de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, apresentando infecção do trato urinário, no período de 1978-81. Antissoros O de *E. coli* (01ab, 02ab, 04, 06, 07, 08, 09, 010, 011, 018ac e 075) foram preparados a partir de linhagens padrão (técnica de Roschka, modificada). Análise dos dados clínicos obtidos da ficha de solicitação de urinocultura permitiu estabelecer a provável localização e o tipo do processo infecioso no trato urinário: "Assintomático", "Baixo", "Alto" e "Indeterminado". 255 amostras (23%) apresentaram-se rugosas. Entre as 858 restantes, submetidas ao teste de aglutinação em lâmina, 400 (36%) não aglutinaram e 458 (41%) reagiram positivamente. Destas, 307 (67%) apresentaram títulos significativos ($\geq 1:320$), permitindo a caracterização dos respectivos抗原s O. Os sorogrupo mais frequentes foram 06 (38,2%), 018ac (15,6%), 075 (10,5%), 04 (10%), 02ab (9,5%) e 07 (8,8%), perfazendo 92,6% das amostras grupadas. Não houve diferenças significantes quanto aos resultados da sorogrupagem em relação à sintomatologia apresentada pelos pacientes e não foi possível caracterizar a predominância dos sorogrupo, nos diferentes quadros clínicos.

Summary

Escherichia coli serogroups involved in urinary-tract infection in Botucatu SP

1113 strains of *E. coli*, isolated from hospitalized patients with urinary-tract infection, during 1978-1981, were serogrouped. 110 *E. coli* antisera (01ab, 02ab, 04, 06, 07, 08, 09, 010, 011, 018ac and 075) were raised from reference strains by the modified Roschka technique. The clinical data of each patient were reviewed to establish the localization and type of the urinary-tract infection: asymptomatic

bacteriuria, low or high tract infection and indetermined infection. Strains were submitted to the rapid agglutination slide test, being 225 strains (23%) with spontaneous agglutination, 400 (36%) negative and 458 (41%) with positive agglutination. 307 (67%) out of these last strains presented significative titers ($\geq 1:320$), allowing thus the characterization of the O antigens. The most frequent serogroups were: 06 (38,2%), 018ac (15,6%), 075 (10,5%), 04 (10%), 02ab (9,5%) and 07 (8,8%), accounting altogether for 92,6% of all strains studied. There was no significant correlation between *E. coli* serogroups and different localizations and types of urinary-tract infection.

Introdução

Dentre os processos infecciosos mais observados na espécie humana, os do trato urinário assumem elevada importância, sendo a *Escherichia coli* o agente etiológico predominante.

A tipagem sorológico da *E. coli*, proposta por Kauffmann, é baseada na pesquisa dos抗原os O, K e H, os quais se constituem em marcadores sorológicos úteis como instrumento epidemiológico para o estudo das gastroenterites. Entretanto, tal procedimento raramente é efetuado em amostras produtoras de infecção urinária, apesar da prevalência reconhecida de *E. coli*.

Investigadores suecos têm utilizado a tipagem sorológica e a sensibilidade de *E. coli* à ação bactericida do soro, como marcadores para estudar a evolução da infecção urinária, se persistente ou recorrente e como auxiliar na conduta terapêutica (7). Apesar de serem conhecidos 167 sorogrupo O de *E. coli*, a maioria das infecções urinárias é ocasionada por número restrito deles, sendo mais frequentes os 10 primeiros e outros como o 018ac, 050, 062 e 075 (9, 11, 14, 16). A sorotipagem realizada por alguns autores (7, 10) evidenciou que os sorotipos de *E. coli* 02:K1:H4, 04:K12:H5 e 06:K2ac:H1 estavam associados, com alta frequência, à pielonefrite aguda. Tal constatação sugere que alguns sorotipos invadem os rins, mais comumente do que outros.

Considerando a importância das infecções urinárias e a escassez de informações sobre as mesmas em nosso meio, procuramos determinar o sorogrupo das amostras de *E. coli* isoladas de pacientes infectados, estudar algumas características clínicas dos mesmos e correlacionar os dados registrados.

Material e Métodos

Foram selecionadas 1113 amostras de *E. coli*, isoladas de pacientes internados ou atendidos no ambulatório do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, no período 1978-1981, com urinocultura positiva, de acordo com o critério de Kass (5).

Os dados clínicos dos pacientes foram obtidos da ficha padronizada de solicitação de urinocultura, preenchida pelo responsável durante o atendimento do caso. A análise das informações, nela contidas, permitiu estabelecer a provável localização do processo no trato urinário. Assim, para as finalidades desta investigação pudemos classificar os pacientes, segundo o quadro clínico da infecção urinária, em: "Assintomático", "Baixo" (cistite), "Alto" (pielonefrite), "Indeterminado" (quando as informações clínicas disponíveis não possibilitaram a caracterização em um dos quadros anteriores).

Após a identificação bioquímica, procedeu-se a seleção de amostras lisas. Para tanto, colônias aparentemente lisas do meio de MacConkey foram transferidas para ágar inclinado, e após incubação a 37°C durante 24 horas, o crescimento foi suspenso em salina e submetido à autoclavagem a vapor fluente por 1 hora. A seguir, para cada amostra lisa, após resfriamento, efetuou-se testes de aglutinação em lâmina frente aos 11 antissoros: 01ab, 02ab, 04, 06, 07, 08, 09, 010, 011, 018ac e 075

preparados a partir de linhagens padrão (cedidas gentilmente pela Dra. Ida Orskov, do Statens Serum Institut of Copenhagen - Dinamarca), empregando-se a técnica de Roschka modificada, segundo Edwards & Ewing (2). A identificação do sorogrupo foi estabelecida pela aglutinação quantitativa em tubos, considerando-se como título significativo a diluição do antissoro igual ou maior que 1:320, segundo instruções da Difco Laboratories (Detroit, Michigan, USA). Esses procedimentos permitiram classificar as amostras em grupadas, não grupadas e rugosas.

Com o objetivo de relacionar os quadros clínicos dos pacientes com os resultados da sorogrupagem efetuou-se análise estatística dos dados pelo teste da homogeneidade entre proporções, conforme Goodmann (4).

Resultados

Das 1113 amostras de *E. coli* estudadas, 255 (23%) apresentaram-se rugosas e as restantes foram submetidas ao teste de aglutinação em lâmina com os 11 antissoros, obtendo-se os seguintes resultados: 458 (41%) com reação positiva e 400 (36%) sem reatividade. As 458 amostras com reação positiva foram submetidas ao teste de aglutinação quantitativa em tubos; destas, 307 (67%) apresentaram títulos iguais ou superiores a 1:320, permitindo a caracterização dos respectivos sorogrupos. As demais 151 amostras (33%), sem títulos significativos, somadas às 400 amostras sem reatividade foram consideradas como não grupadas (551 amostras).

Pela análise da Tabela 1 constatamos, em ordem decrescente, que os sorogrupos 06, 018ac, 075, 04, 02ab e 07 foram os mais frequentes em nosso meio, respectivamente, com 117 (38,2%), 48 (15,6%), 32 (10,5%), 31 (10%), 29 (9,5%) e 27 (8,8%) amostras, perfazendo 92,6% do total das amostras grupadas.

A Tabela 2 exprime a distribuição das amostras de acordo com os resultados da sorogrupagem e o quadro clínico dos pacientes. Observa-se homogeneidade na distribuição das amostras grupadas, não grupadas e rugosas em relação à sintomatologia apresentada pelos pacientes.

Na Tabela 3, encontra-se a distribuição das amostras de acordo com os sorogrupos e os quadros clínicos. Não foi possível caracterizar sorogrupo(s) significativamente predominante(s) para os diversos quadros clínicos considerados. Os resultados dos sorogrupos 01ab, 08, 09 e 011 foram reunidos em um único grupo atendendo a finalidade da análise estatística.

Discussão

Das 458 amostras (41%) que reagiram positivamente ao teste de aglutinação em lâmina, 307 (67%) revelaram títulos significativos quando submetidos à reação de aglutinação quantitativa em tubos, o que permitiu caracterização definitiva dos respectivos抗原s O. Considerando que a antigenicidade cruzada é bastante frequente entre amostras de *E. coli* e outras enterobactérias, comprehende-se a relevância da titulação, uma vez que a utilização única da prova de aglutinação em lâmina pode gerar a constatação de falsos resultados.

Tabela 2 - Distribuição de amostras de *E. coli* de acordo com os resultados da sorogrupagem e o quadro clínico (Botucatu, 1978-1981). Análise: $\chi^2 = 2,15$ (N.S.)

Tabela 1 - Distribuição do número e do potencial de amostras de *E. coli* isoladas de pacientes com infecção urinária de acordo com o sorogrupo (Botucatu, 1978-1981)

Sorogrupo	Nº	%
06	117	38,2
018ac	48	15,6
075	32	10,5
04	31	10,0
02ab	29	9,5
07	27	8,8
01ab	15	4,9
011	5	1,6
08	2	0,6
09	1	0,3
010	0	0
Total	307	100

Quadro clínico	Amostras		Grupadas		Não grupadas		Rugosas		Total
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Assintomático	48	(27,7)	82	(47,5)	43	(24,8)	173	(100)	
Baixo	104	(25,7)	204	(50,6)	96	(23,7)	404	(100)	
Alto	46	(29,6)	74	(47,9)	35	(22,5)	155	(100)	
Indeterminado	109	(28,6)	191	(50,2)	81	(21,2)	381	(100)	
Total	307		551		255		1113		

Tabela 3 - Distribuição das amostras de *E. coli* de acordo com os sorogrupos e o quadro clínico (Botucatu, 1978-1981). Análise: $\chi^2 = 18,036$ (N.S.). Observação: os sorogrupos 01ab, 08, 09 e 011 foram reunidos em um único grupo para fins de análise

Sorogrupos	06	018ac	075	04	02	07	01ab	011	08	09	Total
Quadro clínico	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº
Assintomático	18(37,8)	4(8,3)	8(16,6)	7(14,5)	4(8,3)	4(8,3)	3(6,2)	0	0	0	48(100)
Baixo	39(37,7)	20(19,2)	10(9,6)	5(4,8)	10(9,6)	11(10,5)	8(7,7)	0	1(0,9)	0	104(100)
Alto	17(37,0)	8(17,4)	2(4,4)	6(13,0)	5(10,8)	5(10,8)	1(2,2)	2(4,4)	0	0	46(100)
Indeterminado	43(39,7)	16(14,6)	12(11,0)	13(11,9)	10(9,2)	7(6,4)	3(2,7)	3(2,7)	1(0,9)	1(0,9)	109(100)
Total	117(38,2)	46(15,6)	32(10,5)	31(10,0)	29(9,5)	27(8,8)	15(4,9)	5(1,6)	2(0,6)	1(0,3)	307(100)

Ujváry & Rantz, citados por Pyles & Glagovsky (14) verificaram que entre amostras de *E. coli* produtoras de infecção urinária, cerca de 50% se relacionavam aos 10 primeiros sorogrupos, fato que ocorreu em 72,3% das amostras deste estudo, entre as quais destacaram-se os sorogrupos: 06 (38,2%), 04 (10%), 02 (9,5%) e 07 (8,8%). Saliente-se que, além do grupo 06, os dois sorogrupos mais frequentes foram o 018ac (15,6%) e o 075 (10,5%), estes últimos relativamente raros nos E.E.U.U., na Europa e não encontrados em Hong Kong (18), o que expressa bem a variação geográfica existente na distribuição dos sorogrupos prevalentes. Em Botucatu, as frequências dos grupos 018ac (15,6%), 04 (10%) e 02 (9,5%) foram relativamente altas, em contraste com os dados obtidos no Rio de Janeiro (13), onde se mostraram bem inferiores: 018ac (2%), 04 (3,1%), 02 (0,0%). Esta comparação de dados de regiões próximas, mesmo considerando metodologia diferente na sua obtenção, põe em evidência a nítida variação de frequência dos principais sorogrupos de *E. coli* produtores de infecção urinária em nosso meio.

Por outro lado, a literatura demonstra, também, resultados semelhantes aos nossos (1, 12, 14, 16), quando se considera que 92,6% das amostras pertenceram aos sorogrupos 06, 018ac, 075, 04, 02 e 07.

As razões pelas quais um número restrito de sorogrupos produzem sistematicamente infecções do trato urinário não são ainda bem conhecidas. Estudos experimentais não demonstraram uma relação significante entre grupos O de *E. coli* e sua habilidade em causar infecções renais (6). Os resultados desta pesquisa caracterizam bem o exposto acima, quando analisamos a distribuição dos quatro grupos mais frequentes (04, 06, 018ac e 075) pelos quadros clínicos considerados: 71% nas infecções "baixas", 72% nas infecções "altas", 77% nas bacteriurias assintomáticas e 77% nos quadros clínicos indeterminados. Também Mahapatro (12) em sua análise, não encontrou relação significante entre os quadros clínicos e os sorogrupos prevalentes (01, 04, 06 e 075) bem como Andersen & col., citado por Mabeck & col. (10), não descobriram correlação entre pielonefrite e grupos O de *E. coli*.

A análise dos dados da Tabela 2, relacionando a sorogrupagem (amostras grupadas, não grupadas e rugosas) com os quadros clínicos, não demonstrou diferenças significantes, o que difere dos resultados obtidos por Lindberg (8), ao constatar produção de pielonefrite, cistite e bacteriuria assintomática, respectivamente, por 1,7%, 6,5% e 45,2% de amostras rugosas e por 7,6%, 5,5% e 10,4% de amostras não grupadas. Este autor verificou, ainda, que os sorogrupos 01, 02, 04, 06, 07, 016, 018ac e 075 foram responsáveis por 31,3% dos casos de bacteriuria assintomática, 58,7% de cistite e 79,8% de pielonefrite.

Até o presente momento, não foi suficientemente esclarecida a relação entre a maior prevalência desses sorogrupos e a produção de infecções do trato urinário. Schwartz & col. (15) justificam tal fato por estarem esses sorogrupos disseminados de forma ampla na natureza, relacionando-se principalmente com a flora intestinal fecal e sua proximidade do trato urinário ("teoria da prevalência"). Por outro lado, vários autores (3, 10, 17), defendem a "teoria especial da patogenicidade", que relaciona a nefropatogenicidade com o antígeno O, o antígeno K, a produção de hemolisina e a capacidade de aderência a vários tipos de células.

Acreditamos que o antígeno O, por si só, não seria capaz de determinar a patogenicidade, uma vez que determinados sorotipos O podem estar geneticamente ligados a outras características que, juntas, definiram as amostras patogênicas. Desta for-

ma, concluímos que a sorotipagem pode se constituir num instrumento útil para o estudo da epidemiologia e da evolução das infecções urinárias, em especial dos processos crônicos e recorrentes, os quais fornecem subsídios valiosos no campo da terapêutica.

Agradecimentos

Os autores expressam os seus agradecimentos à Dra. Ida Orskov pelo envio de amostras padrão e ao Dr. Mário C.L. Ribeiro pela análise estatística.

Referências Bibliográficas

1. Chugh, T.D.; Garg, M.L. & Malik, A.K. - Some biological properties of urinary and faecal *E. coli* isolated from cases of urinary infection. Indian J. med. Res., 58:418-422, 1978.
2. Edwards, P.R. & Ewing, W.H. - Identification of Enterobacteriaceae. 3.ed. Minneapolis, Burgess Publishing, 1972.
3. Evans, D.J.; Evans, D.G. & Nobli, M.A. - Hemolysin and K antigens in relation to serotype and hemagglutination type of *Escherichia coli* isolated from extraintestinal infections. J. clin. Microbiol., 13:171-178, 1981.
4. Goodman, L.A. - On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. Technometrics, 7:247-254, 1965.
5. Kass, E.H. - Bacteriuria and the diagnosis of infections of the urinary tract. Arch. intern. Med., 100:709-714, 1957.
6. Kimball, H.; Turck, M. & Petersdorf, R.G. - The epidemiology of nonenteric *Escherichia coli* infections. III - Relationship of *E. coli* antigens to experimental pyelonephritis. J. Lab. clin. Med., 63:907-913, 1964.
7. Kunin, C.M. - Detection, prevention and management of urinary tract infections. 3.ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1982.
8. Lindberg, U.; Hanson, L.A.; Jodal, U.; Lindin-Janson, G.; Lincoln, K. & Olling, S. - Asymptomatic bacteriuria in schoolgirls. II - Differences in *Escherichia coli* causing asymptomatic and symptomatic bacteriuria. Acta paediat. scand., 64:432-436, 1975.
9. Mabeck, C.E.; Orskov, F. & Orskov, I. - Studies in urinary tract infections. VIII - *Escherichia coli* O:H serotypes in recurrent infections. Acta med. scand., 190:279-282, 1971.
10. Mabeck, C.E.; Orskov, F. & Orskov, I. - Escherichia coli serotypes and renal involvement in urinary tract infection. Lancet, 26:1312-1314, 1971.
11. McGeachie, J. - Serological grouping of urinary *Escherichia coli*. J. clin. Path., 18:428-431, 1965.
12. Mahapatro, R.C. & Nadkarni, M.S. - Escherichia coli serogroups prevalent in urinary tract infections in Bombay. J. Indian med. Ass., 65:189-191, 1975.
13. Oliveira, E.F.R.; Andrade, J.R.C.; Pereira, A.A.; Marques, E.A. & Suassuna, I. - Associação de grupos sorológicos de *Escherichia coli* com infecções urinárias. Rev. Ass. med. bras., 23:217-219, 1977.
14. Pryles, C.V. & Glagovsky, A. - Serological characterization of *Escherichia coli*: study in acute and recurrent urinary tract infections in infants and children. Pediatrics, 36:219-224, 1965.
15. Schwartz, H.; Schriner, H.K.; Post, B. & Ehlers, B. - Correlations of *Escherichia coli* occurring simultaneously in urine and stool of patients with clinically significant bacteriuria: serotyping with group specific O antisera. J. Urol., 101:379-382, 1969.
16. Turck, M. & Petersdorf, R.G. - The epidemiology of nonenteric *E. coli* infections: prevalence of serological groups. J. clin. Invest., 41:1760-1765, 1962.
17. Van Den Bosch, J.F.; Postmay, P.A.R.; Koopman, J.; De Graaff, J. & MacLaren, D.M. - Virulence of urinary and faecal *Escherichia coli* in relation to serotype, haemolysis and haemagglutination. J. Hyg. (Lond.), 88:567-577, 1982.
18. Wong, W.T. & Bettelheim, K.A. - Serotypes of *Escherichia coli* from urinary tract infections in Hong Kong. Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig. A, 236:481-486, 1976.

RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS E ÍONS INORGÂNICOS EM *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* DE PACIENTES HOSPITALIZADOS E NÃO HOSPITALIZADOS

José Augusto Adler Pereira
Luiz Paulo Bravo S.R. Cotrim
& Italo Suassuna

Serviço de Microbiologia e Imunologia
Faculdade de Ciências Médicas UERJ
Av. 28 de Setembro, 87 - Fundos/3º
20550 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Resumo

No estudo da presença de marcadores de resistência a um conjunto de antimicrobianos de uso terapêutico (gentamicina, kanamicina, trimetroprim-sulfametoaxazol, tetraciclina e cloranfenicol), aos íons mercúrio e telurito, em *Klebsiella pneumoniae*, não foram encontradas diferenças significativas decorrentes da origem dos pacientes, isto é, se internados ou se de atendimento ambulatorial. Nos dois grupos, o número de marcadores de resistência foi reduzido, devido, provavelmente, ao uso restrito de antimicrobianos, no período prévio à avaliação.

Summary

Resistance of Klebsiella pneumoniae isolated from hospitalized and non-hospitalized patients to antibiotics and inorganic ions

Resistance markers to some antimicrobials of large clinical use (gentamicin, kanamicin, sulfamethoxazol-trimethoprim, tetracycline and chloramphenicol) and to the mercuric and tellurite ions were searched in *Klebsiella pneumoniae* isolated from hospitalized and non-hospitalized patients. No significant differences were found among fecal strains of *K. pneumoniae* obtained from in or out hospital patients. In both groups of *K. pneumoniae* occurrence of the resistance markers was low and probably associated to the limited use of antimicrobials by the patients preceding the investigation.

As floras microbianas de colonização endógena têm sido reconhecidas como fontes significativas das infecções nosocomiais. Além disso, deve tomar-se em conta a possível transferência intra ou inter-específicas de fatores de resistência entre os microrganismos, dessas floras (Witchitz, J. - Rev. Medicine, 43:2939-2945, 1975).

Klebsiella pneumoniae tem sido um dos agentes de infecção hospitalar mais frequentemente isolados. Tendo-se em conta a frequência de sua colonização intestinal, foi comparado o perfil de resistência de cepas de *K. pneumoniae* isoladas de amostra fecal (junho e julho de 1982) de 20 pacientes ambulatoriais (P.A.), sem nenhuma internação no período de um ano anterior e, de 16 pacientes internados (P.I.), no "Instituto Estadual de Hematologia A.S. Cavalcanti". Em média, seis colônias foram estudadas em cada amostra de fezes, a partir de isolamento em EMB ágar e em ágar "Brolacyn" (Merck). Os isolamentos foram, bioquimicamente, caracterizados (Edwards,

P.R. & Ewing, W.H. - Identification of Enterobacteriaceae. 3.ed. Minneapolis, Burgess Publishing, 1972) e submetidos a testes de sensibilidade, à gentamicina, canamicina, trimetoprim-sulfametoazol, tetraciclina e cloranfenicol, segundo técnica de Bauer & col. (Am. J. Clin. Pathol., 45:493-496, 1966) e avaliada a resistência ao telurito de potássio e ao cloreto mercúrico (Pereira, J.A.A. & Suassuna, I. - 9º Congresso Latinoamericano de Microbiologia, São Paulo, 1983). De acordo com o padrão conjunto de resistência aos antibióticos e a sais inorgânicos, as cepas suspeitas de carregar plasmídeos foram testadas quanto à capacidade de transferência, dos padrões de resistências assinalados, pela conjugação (Gerhardt, P. & col. - Manual of methods for general bacteriology. Washington, D.C., American Society for Microbiology, 1981). A seleção dos transconjugantes foi feita pelo telurito (25 μ g/ml) ou pelo sal mercúrico (10 μ g/ml). O uso terapêutico de antimicrobianos foi, retrospectivamente, avaliado pela consulta aos prontuários dos pacientes.

Klebsiella pneumoniae foi isolada em 13 (65%) dos P.A. e em 14 (87%) dos P.I., atingindo o total de 122 cepas. Não houve diferença, estatisticamente, significativa entre os dois grupos, quanto ao número de marcadores de resistência aos antimicrobianos e aos sais de telúrio e mercúrio. Em um caso de P.I. houve a presença simultânea dos sete marcadores de resistência investigados.

Não foram conseguidos transconjugantes resistentes ao íon mercúrico (10 μ g/ml) pelo estudo de cepas, demonstradamente, resistentes ao mesmo. De cepas originadas em três pacientes diversos (dois P.A. e um P.I.) foi transferida, para *Escherichia coli* receptora, a resistência à tetraciclina e ao telurito; e, em um caso, só a resistência ao telurito. Em três desses quatro casos houve a co-transferência da capacidade de fermentação da lactose.

A permanência no hospital (grupo P.I.) não determinou diferenças aparentes, no padrão de resistência das cepas de *K. pneumoniae* de flora intestinal, apesar de, na rotina bacteriológica, as cepas desta espécie, isoladas a partir de material clínico, de pacientes internados, apresentarem, com aparente frequência, vários marcadores de resistência, em contraste com as cepas de origem ambulatorial. Em cada paciente, a média de marcadores de resistência das cepas aos antimicrobianos foi baixa (1,4 marcadores), fato este que pareceu estar associado ao limitado uso terapêutico dos antimicrobianos investigados nestes pacientes.

INFORMAÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA SBM

ABIFARMA - A realidade da indústria farmacêutica no Brasil. Rio de Janeiro, Abifarma, 36p., 1983.

De acordo com os dados apresentados, nesta publicação da Abifarma, dos cerca de 460 laboratórios que operam no território brasileiro, 141 são associados àquela entidade. Dos associados, 64 são empresas estrangeiras e 77 nacionais, sendo que 4 entre os 5 maiores laboratórios nacionais figuram no quadro associativo da Abifarma.

As empresas associadas à Abifarma são responsáveis pela produção de 90% dos medicamentos consumidos no Brasil.

Na introdução deste opúsculo, há uma série de afirmações que são bastante interessantes:

"A indústria farmacêutica tem características bastante diferenciadas. É extremamente dependente de uma pesquisa básica, onerosa, de resultados aleatórios".

Se observarmos, entretanto a composição de preço de um medicamento, à página 19, não se consegue encontrar nenhuma alínea, na composição de custos, que se refira a gastos com pesquisas. Enquanto isto, entre despesas comerciais fixas e proporcionais, chega-se a 46% do custo-fábrica do medicamento. Uma parcela que é, aliás, superior ao custo industrial do medicamento propriamente dito (isto é, o somatório dos custos de embalagem, matéria prima, mão de obra e gastos gerais de fabricação). Conclui-se, pois que é mais caro para a indústria vender o medicamento do que produzi-lo.

A estrutura de preço dos medicamentos, coerente com a estrutura apresentada pelo secretário executivo do C.I.P. na C.P.I. da indústria farmacêutica (1980/1981) mostra a distorção gritante que há no setor. Acrescentando-se, ao custo fábrica, a margem do varejista, que é de 35% deste custo (Resolução CIP 157/82), conclui-se que o consumidor brasileiro, ao adquirir um medicamento, paga mais pela propaganda e comercialização do que pelo medicamento em si. O custo industrial representa menos de 26% do custo do medicamento no varejo, enquanto que as despesas de propaganda, distribuição e comercialização atingem 60% do preço final.

"Sua promoção se desenvolve através de um diálogo, necessariamente a portas fechadas, com a classe médica. Vive, assim de costas voltadas para o grande público, que é o seu consumidor final".

Esta afirmação dá a impressão de que os responsáveis pela elaboração deste opúsculo, produzido pela Abifarma, não assistem televisão nem ouvem rádio.

"Não é surpreendente, portanto, que a sociedade, por desconhecê-la, a julgue com severidade. Atribua-lhe um gigantismo inexistente, ou a prática de preços excessivos e geradores de lucros desmedidos".

À página 3 do folheto existe uma tabela que mostra a evolução de vendas de 1978 a 1982. Tomando-se por base o valor do mercado em dólares, no ano de 1978, observa-se que no período das vendas apresentaram um aumento médio, em dólares, - portanto deflacionado - superior a 8,3%. À página 5 é mostrada a evolução dos preços de medicamentos em relação à inflação, com a conclusão de que o aumento médio dos preços de medicamentos entre 1976 e 1982, foi de apenas 52,28% do índice inflacionário médio no mesmo período.

Juntando-se as duas informações só se pode chegar a conclusão de que o volume físico de medicamentos vendidos, mais do que dobrou no período considerado.

É de se estranhar que os custos de propaganda distribuição e comercialização de medicamentos ascendam a 60% do que é pago pelo consumidor?

A seguir seguem-se alguns gráficos e tabelas que procuram demonstrar que o preço dos medicamentos tem subido menos do que o custo de vida, que gastos com medicamentos representam apenas 1,43% da despesa familiar (Fonte IBGE) e que o brasileiro médio se encontra na 19ª posição no que diz respeito ao consumo "per capita" de medicamento. Não há, entretanto, informação de que porcentagem do povo brasileiro tem acesso ao mercado de medicamentos.

Procurando mostrar que o número de medicamentos no mercado brasileiro não é excessivo, quando comparado ao de outros países, à folha 12 chama-se a atenção para o fato de que nos Estados Unidos o número de medicamentos à venda atinge a 354.000, enquanto que no Brasil, entre diferentes marcas e apresentações só existem 24.000. O interessante é que para os Estados Unidos usou-se como fonte de referência informações da "Pharmaceutical Manufacturers Association", enquanto que para o Brasil utilizou-se o Brasíndice, publicação de caráter comercial e sem nenhum valor oficial.

Poder-se-ia continuar a analisar as informações fornecidas pela Abifarma no opúsculo. Entretanto, uma avaliação real das informações que são fornecidas, ocuparia um espaço injustificável nesta Revista da SBM.

Na realidade, este folheto produzido pela Abifarma presta um desserviço à indústria farmacêutica por desconsiderar a possibilidade de haver vida inteligente no Brasil.

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

Block, S.S. - Disinfection, sterilization, and preservation. 3.ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1053p., 1983. US\$ 109.50.

Este livro, atualmente em sua terceira edição, é editado pelo professor de Bioengenharia Seymour S. Block do Deptº de Engenharia Química da Universidade da Flórida, com a cooperação de cinquenta e oito renomados especialistas.

A obra é dividida em sete partes: esterilização química e física, anti-sépticos e desinfetantes; aplicações médico-sanitárias; preservativos e protetores; mecanismos de ação; miscelânea; e métodos para testar germicidas. O conteúdo dos 51 capítulos encerra uma revisão coerente da bibliografia existente (estimada em aproximadamente dez mil referências), apresentada de forma coerente, didática e, sempre que possível, conclusiva.

A terceira edição (1983) difere da segunda (1977) por dispor de sete novos capítulos: esterilização pelo óxido de etileno, peróxido de hidrogênio e outros desinfetantes oxidantes; clorohexidine; compostos nitrogenados; pseudomonicidas; epidemiologia e prevenção de infecções hospitalares; e legislação americana sobre gemicidas.

Este livro, se constitui portanto em texto de referência e consulta obrigatória para microbiologistas, farmacêuticos, químicos, engenheiros sanitários, enfermeiros, cirurgiões e administradores hospitalares, interessados na produção, controle de qualidade, comercialização e aplicação de esterilizantes, desinfetantes e anti-sépticos.

Uriel Zanon
Universidade Federal Fluminense
Rua Prof. Hernani de Melo, 101
24000 Niterói RJ

Demain, A.L. & Solomon, N.A., eds. - Handbook of experimental pharmacology. I/II - Antibiotics: containing the beta-lactam structure. New York, Springer-Verlag, vol. 67, Part I - 358p., Part II - 479p., 1983. Part I - US\$ 120.70, Part II - US\$ 143.00.

A descoberta da penicilina por Fleming, em 1929, representou o marco de uma nova era terapêutica, até então desprovida de alternativas úteis para o tratamento das infecções. Hoje, mais que 50 anos depois, o grupo dos antibióticos β -lactâmicos, do qual a penicilina é o protótipo, continua a ser objeto precípuo de estudos de pesquisadores de diferentes áreas do conhecimento, refletindo a importância que essa classe de fármacos representa à quimioterapia moderna. Na verdade, a descoberta de novos tipos de antibióticos β -lactâmicos, na década de 70, mediante triagem de antibióticos mais potentes e de inibidores de β -lactamase, enzima compreendida no principal mecanismo de resistência, veio reascender o interesse por esse campo.

A editora Springer-Verlag, sensível que é ao progresso da ciência e aos assuntos de grande interesse à comunidade científica, não poderia se furtar em publicar obra que versasse sobre campo dos mais frutíferos. Assim é que surgiu a presente obra sobre os antibióticos β -lactâmicos.

Dividida em dois tomos, I e II, o primeiro constituído de 11 capítulos e o segundo, de 6 capítulos, a obra, como é de praxe nessa conceituada editora, prima pelo esmero, tanto no que diz respeito à encadernação, quanto ao que se refere à parte gráfica.

Os capítulos, escritos por especialistas, são abrangentes, muito bem divididos e compreendem vários aspectos dos antibióticos em questão, além da empolgante história de sua descoberta e introdução.

Assim é que a química dos antibióticos β -lactâmicos é esmiuçada em capítulos como o referente às relações entre estrutura química e atividade biológica e o que se reporta à estratégia de síntese total, além de estar inserida em tópicos analíticos, como cromatografia de alto desempenho. Do ponto de vista microbiológico e bioquímico, resultam de importância os diferentes aspectos de modo de ação, enzimas bacterianas que interagem com a classe de quimioterápicos em questão, aperfeiçoamento e preservação dos microrganismos produtores, genética de fungos, bem como de actinomicetos produtores dos referidos antibióticos. Não menos importantes são os capítulos relativos à biossíntese e regulação da biossíntese dos β -lactâmicos. Os princípios bioquímicos e microbiológicos são enfeixados no capítulo de interesse à prática comercial, qual seja o referente à engenharia bioquímica na produção de β -lactâmicos. A avaliação laboratorial in vivo e in vitro de β -lactâmicos clássicos, abarcando os aspectos históricos de sua utilização, também mereceu tratamento proporcional à sua importância. Novos antibióticos β -lactâmicos promissores, considerados não-clássicos, surgiram de novos métodos de triagem, métodos esses explorados no capítulo sobre triagem de novos antibióticos da classe. A farmacologia dos mesmos é discutida em termos de sua farmacocinética, toxicologia e terapêutica, tópicos altamente importantes, não só do ponto de vista acadêmico, como também, e principalmente, clínico.

Cumpre mencionar que todos os capítulos são escritos de modo escorreito e acessível, sendo o texto valorizado mediante auxílio de figuras, tabelas, estruturas químicas, bem como de fotografias bastante elucidativas. Via de regra, os capítulos apresentam resumo, conclusão ou perspectivas futuras, o que facilita sobremaneira a compreensão da matéria abordada como um todo. As referências bibliográficas, em número expressivo, são apresentadas ao final de cada artigo, fornecendo subsídios para os que desejam se aprofundar em tópicos específicos. Completa cada tomo cuidadoso índice analítico.

Em resumo, o conteúdo da obra vem contribuir para a elucidação de vários aspectos concernentes à classe cujo futuro, segundo os próprios editores, "parece mais claro a cada década que passa".

Constitui-se, destarte, em fonte preciosa de consulta para bioquímicos, microbiologistas, químico-farmacêuticos, que militam nessa área, ou pretendem abraçá-la, bem como para farmacêuticos e médicos, que desejam enriquecer seu cabedal de conhecimentos acerca de uma das mais utilizadas e importantes classes de antibióticos.

Elizabeth Igne Ferreira
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
USP
Caixa Postal 30786
01000 São Paulo SP

II ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA

A Sociedade Brasileira de Microbiologia promoveu o II Encontro Nacional de Virologia, nos dias 9 a 13 de novembro de 1984, em São Lourenço-MG, sob coordenação de E.W. Kitajima, da UnB.

A Sociedade vem atuando no sentido de promover o desenvolvimento da virologia brasileira, sob a coordenação de Romain R. Golgher, da UFMG, e a realização dos En-

contros Nacionais de Virologia foi concebida com esta finalidade, através da reunião e intercâmbio de profissionais para: i. discussão de temas relevantes à virologia, como disciplina do conhecimento científico e campo de aplicação tecnológica; ii. conhecimento recíproco de atividade e projetos correntes; iii. diagnóstico e proposição de medidas para o progresso da área; iv. discussão sobre o andamento do Programa Setorial de Virologia (PSV-CNPq/FINEP); e v. o papel da SBM no desenvolvimento da virologia.

Da programação do II Encontro Nacional de Virologia constaram meses redondas, conferências, trabalhos em grupos sobre temas específicos e apresentação de painéis, além de algumas reuniões não programadas inicialmente.

As mesas redondas foram estruturadas de forma a congregar especialistas de diferentes áreas. Cada atividade manteve um tópico comum às áreas da virologia, permitindo maior integração entre os profissionais. Para a coordenação dos trabalhos, foram convidados especialistas que realmente estivessem desenvolvendo atividades dentro dos temas discutidos. Os temas escolhidos foram os seguintes: Programa Setorial de Virologia; Problemas atuais da virologia: pesquisa e programas governamentais; Microscopia eletrônica e virologia; Quimioterapia e imunoterapia; Epidemiologia, diagnose e controle biológico.

As duas conferências foram proferidas, respectivamente, por F. Horaud, do Institute Pasteur, Paris (França), sobre "Utilização de soros monoclonais na diferenciação de amostras de Poliovírus", e por K.S. Kim, da University of Arkansas-Fayetteville (EUA), sobre "Ultraestrutura da infecção por Geminivírus".

Foram organizados sete grupos de trabalho, sob a coordenação de profissionais especialmente convidados, para discussão e avaliação de alguns aspectos importantes da virologia, tais como: ensino de graduação; ensino de pós-graduação; saúde animal; saúde pública; virologia vegetal; virologia básica; e biotecnologia.

As contribuições livres, resultantes de pesquisas recentes nas diferentes áreas da virologia, foram apresentadas sob a forma de painéis. Inscreveram-se cerca de 70 trabalhos, inclusive de profissionais argentinos. A qualidade dos trabalhos demonstrou sensível progresso em relação ao I Encontro.

Além das atividades previstas, foram realizadas reuniões com virologistas argentinos, visando ao estabelecimento de programa de cooperação entre Brasil e Argentina, abrangendo todas as áreas da virologia.

O II Encontro Nacional de Virologia contou com a participação de, aproximadamente, 120 profissionais, entre os quais é preciso destacar a presença de especialistas estrangeiros - Argentina (5), EUA (2), Costa Rica (1), França (1) e Itália (1).

O livro de resumo dos trabalhos apresentados durante o evento serão depositados nas seguintes bibliotecas: BIREME, BINAGRI e Biblioteca Nacional. Não serão reproduzidos para distribuição.

Ao final dos trabalhos, foram definidas datas e responsáveis pela coordenação dos dois próximos Encontros: em 1986, Moacyr Rebello, do Instituto de Biofísica UFRJ e em 1988, J.A. Neves Candeias, do Instituto de Ciências Biomédicas USP.

Ainda por iniciativa da SBM, foram elaborados projetos na área de rotavirus de humanos e biologia de vírus de plantas, aprovados pela FINEP para financiamento, totalizando, aproximadamente, CR\$ 20 bilhões, para execução em dois anos.

Cláudia Avanzi
Sociedade Brasileira de Microbiologia
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
Cidade Universitária USP
05508 São Paulo SP

IUMS - International Symposium on Single Cell Proteins, Paris, January, 28-30, 1981. Paris, Lavoisier, Tec & Doc, 347p., 1983.

A publicação cobre as atividades de um simpósio internacional (Paris, Janeiro de 1981), sob o patrocínio da IUMS (International Union of Microbiological Societies,) ao qual concorreram participantes de 35 países, incluindo os da OPEP (Organização dos Paises Exportadores de Petróleo).

Conferências gerais, contribuições a convite e temática em mesa redonda compõem os 3 capítulos da obra, cujos artigos estão redigidos em inglês (27) e francês (9).

O secretário geral da IUMS e Presidente do Simpósio, Prof. Jacques C. Senez (Marcelha, França) faz interessante introdução retrospectiva sobre o tema de "proteína unicelular".

A restrição (previamente) imposta aos participantes, qual seja o pedido de relatos de experiências ou processos já comprovadamente testados em escala piloto semi-industrial ou industrial, seguramente elevou a qualidade da informação tecnológica intercambiada.

Variados aspectos da problemática de produção, colheita, desidratação e sobretudo consumo de proteína unicelular ou SCP (Single Cell Proteins) são abordados na profundidade desejável e recomendada para um evento de ordem internacional:

- natureza e heterogeneidade de matérias-primas: metano, n-alcanos, metanol, etanol; carboidratos de biomassa (celulose, amidos de mandioca, licor sulfítico, hidrolisados de madeiras, melão de cana); soro de leite, etc.
- problemas nutricionais (avaliação de rações animais) e toxicológicos (consumo humano).
- aceitação pública: a SCP evoluindo de ração animal a alimento humano.
- perspectivas econômicas da SCP
- microrganismos agentes: leveduras (com ênfase para spp. do gênero *Candida*), bactérias (*Methylphilus*, etc), fungos e algas.

Aparece destacado o feito tecnológico pioneiro da British Petroleum que no período de 3 anos produziu mais de 3×10^4 toneladas de SCP, em suas plantas industriais de Lavera (França) e Grangemouth (Inglaterra), envolvendo crescimento de *C. tropicális* e *C. lipopolitica* em n-alcanos, sem qualquer relato de infecções e ou intoxicações.

Artigos descritivos de distintas tecnologias são abordados:

- "Pekilo-SCP", a partir de licor sulfítico (Escandinávia)
- "Fermosin-SCP", produção de proteína unicelular em óleo ou frações de petróleo bruto, com a concomitante deparafinização do substrato, gerando subproduto de maior valor comercial (URSS e Alemanha Oriental).
- "Pruteen", SCP de *Methylphilus* crescido em metanol (Imperial Chemical Industries, Inglaterra)
- SCP de *Torulopsis* crescida em n-alcanos, com rendimento na base de 16,5g de células/litro de fermentado (China)
- SCP de etanol (Aminco, USA).
- SCP de soro láctico (Bel Co., França)
- SCP de melão de cana (Speichim, Cuba)
- "Waterloo-SCP" ou bioconversão direta de resíduos celulósicos em proteína unicelular com o fungo *Chaetomium* (Canadá).

Avanços com a fermentação em fase sólida (URSS), biotecnologia de produção de SCP em cultura contínua e as experiências Indiana, japonesa e romena (a última em associação com firmas japonesas), somadas às diretrizes dos países da OPEP em seus programas de "petro-proteínas" são outros tópicos da publicação.

José Domingos Fontana
Deptº de Bioquímica da UFPR
Caixa Postal 19046
80000 Curitiba PR

IUMS - The International Union of Microbiological Societies: directory, statutes, 1984.

O livro "The International Union of Microbiological Societies" (IUMS) engloba duas partes. A primeira traz uma relação completa dos Comitês, Comissões e Federações, assim como de seus membros. Inicialmente, relaciona a diretoria executiva da IUMS, cujo presidente é P. Gerhart, e das divisões de bacteriologia, micologia e virologia, nas quais figuram L. Rachid Trabulsi (Bacteriologia) e João S. Furtado (Micologia), como conselheiros regionais.

Ela também apresenta os Comitês: ("Economic and applied microbiology, Food microbiology and hygiene, Microbiology and immunological documentation, Microbial, Ecology, Systematic bacteriology (I. Suassuna), Taxonomy of viruses (C.A. de Carvalho Pereira) e Medical microbiology interdisciplinary; Sub-comitês: "Single cell protein, Actinomycetales, Agrobacterium, Rhizobium, Bacillus, Bifidobacteria e Lactobacilli, Brucella, Corynebacterium, Enterobacteriaceae, Gram negative anaerobic rods, Halobacteriaceae, Leptospira, Listeria, Mollicutes, Moraxella and allied bacteria, Neisseriaceae, Nocardia and related organisms, numerical taxonomy, Pasteurellaceae, Phage-typing of Staphylococci, Phototropic bacteria, Pseudomonas and related organisms, Rickettsiales, Spirochaetales, Staphylococci and Streptococci, Vibionaceae, Vertebrate viruses (com 14 grupos de estudo), Invertebrate viruses, Plant viruses, Bacterial viruses, Fungal viruses, virus DATA, Coordination"; Comissões: "Association of Biological Standardization, Society for human and animal mycology, Commission for microbial genetics, Commission on microbiological specifications for foods (com 3 sub-comissões regionais), Mycotoxicology, Taxonomy of fungi, Commission on yeasts and yeasts-like microorganisms (A. D. Panek)" e Federações Internacionais: " for Enteric phage typing (G.A. Costa), for culture collections" (com comitês para "Data coding (J.S. Furtado), to safeguard endangered collections, Education, Patent de depoimentos, Publicity, e Postal and Quarentine regulations".

Finalmente traz a relação das Sociedades dos diversos países, assim como das respectivas diretorias e lista na ordem alfabética com nomes e endereços dos pesquisadores que fazem parte das diretorias, comitês, sub-comitês e comissões das Sociedades.

A segunda parte refere aos Estatutos da IUMS, que foram revisados em agosto de 1982 pela Assembleia Geral e editados em janeiro de 1984 pela Diretoria Executiva. Inclui aspectos relacionados com a Constituição (objetivos e composição, administração, finanças, votações, Emendas ao estatuto) e as "bylaws" (normas).

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

Lauffer, M.A.; Maramorosch, K.; Bang, F.B. & Smith, K.M., eds.- Advances in virus research. New York, Academic Press, vol. 27, 377p., 1982.

O alto padrão em geral atingido nesta série de publicações é mantido no presente volume. A importante contribuição da microscopia eletrônica ao diagnóstico virológico é amplamente discutida por A.M. Field que além de apresentar uma útil classificação morfológica de partículas virais detectáveis em produtos patológicos e em secções de tecidos, passa em revista as técnicas utilizadas e a interpretação dos resultados que firmemente estabelecem a microscopia eletrônica como uma técnica essencial e de larga aplicação principalmente pela rapidez e precisão diagnóstica em virologia. C.H. Huang apresenta uma extensa revisão dos estudos realizados na China sobre o vírus da encefalite japonesa incluindo dados sobre patogenia experimental e natural, ecologia, incluindo a importância de insetos vectores e hospedeiros vertebrados amplificadores e sobre prevenção por controle de mosquitos e vacinação. A susceptibilidade de *Plantago* (tanchagem) a uma grande variedade de vírus de plantas é discutida por J. Hammond realçando o papel de várias espécies de *Plantago* na epidemiologia de diversas viroses afetando plantações economicamente importantes. Os passos iniciais da replicação viral, são revistos por A.G. Bukrinskaya com especial atenção à elucidação dos processos de adsorção e penetração viral que prometem abrir novos caminhos para o estudo a nível molecular de importantes propriedades virais tais como infeciosidade e virulência. Um valioso esforço é feito por D.C. Reanney e Hans-W. Ackermann no sentido de integrar um vasto número de dados sobre propriedades biológicas e físico-químicas de bacteriófagos que tradicionalmente são estudados como entidades isoladas. Resultam numa útil classificação de bacteriófagos e interessantes especulações sobre a sua origem e evolução. Mecanismos de tumo-

rigenese viral são revistos por R.V. Gilden E H. Robin com particular atenção aos vírus das famílias retroviridae e herpesviridae. O papel de gens virais e celulares responsáveis pela transformação e imortalização celular e de fatores hereditários e, imunológicos em neoplasias virais é discutida.

O volume inclui obituários de duas notáveis figuras da virologia: K.N. Smith e F.B. Bang.

Finalmente, deve-se dizer que tendo sido publicados em 1982, certos aspectos dos artigos contidos neste volume carecem de atualização.

Hélio G. Pereira
Instituto Oswaldo Cruz
Caixa Postal 926
20000 Rio de Janeiro RJ

Marshall, K.D., ed. - Advances in microbial ecology. New York, Plenum Press, vol. 7, 223p., 1984. US\$ 39.50.

Este livro é mais um da série dos "Advances", tendo o primeiro sido publicado em 1977, editado por Martin Alexander. Nesta série, são publicadas revisões, enfocando aspectos diversificados e profundos da ecologia de microrganismos, em ecossistemas naturais ou artificiais.

O volume 7 está dividido em quatro capítulos, cada um de autoria de um renomado pesquisador em sua área. R.M. Atlas, da Universidade de Louisville, Kentucky, sobre a diversidade das comunidades microbianas, compreendida como diversidade de espécies, fisiológica e genética. Desta forma, podem ser expressos o potencial de funcionamento ecológico da comunidade, as interações entre os seus membros e até as modificações resultantes de transformações no ambiente biológico ou abiótico.

A ecologia microbiana de solos do deserto é apresentada por J. Skujinš, da Universidade Estadual de Utah. Este autor apresenta conceito das regiões áridas, focalizando a distribuição de diferentes grupos taxonômicos nessas regiões, a biologia da superfície desértica, associações entre microrganismos e plantas e as atividades fisiológicas, além de aspectos microbiológicos da desertificação.

D.B. Nedwell, da Universidade de Essex, Inglaterra, discute a entrada e mineralização de carbono orgânico em sedimentos anaeróbicos. Ele aponta que os sedimentos anaeróbicos e reduzidos são comuns, em lagos e áreas litorâneas que recebem grande entrada de materiais orgânicos. A ênfase do texto está na fisiologia da decomposição e das interações entre microrganismos e na estrutura da comunidade microbiana, revisando assim, uma nova área da microbiologia, que vem sendo estudada intensamente, apenas nesta última década.

Para finalizar, há o capítulo de P.H. Pritchard e A.W. Bourquin, da Agência de Proteção Ambiental, na Flórida, os quais apresentam estudo exaustivo de "Microcosmos", para a avaliação da interação entre poluentes e microrganismos. O Microcosmo é entendido como uma simulação do ecossistema natural, a nível de laboratório, permitindo uma série de estudos sobre o impacto de poluentes.

Trata-se de um livro para especialistas em certas áreas, embora sua leitura também possa ser recomendada aos microbiologistas de um modo geral e aos pesquisadores na área da poluição ambiental. *Advances in Microbial Ecology*, vol. 7, reúne grande quantidade de informação sobre estes tópicos atuais que, dificilmente, poderá ser encontrada em outro livro.

Elke J.B.N. Cardoso
Deptº de Solo, Geologia e Fertilizantes ESALQ/USP
Caixa Postal 9
13400 Piracicaba SP

Simpósio Internacional Sobre Micobactérias de Interesse Clínico

Será realizado em Cordoba (Espanha), de 27 a 28 de setembro de 1985, o Simpósio Internacional sobre Micobactérias de Interesse Clínico, no Colégio Major Universitário Nuestra Señora de la Assunción y Facultad de Medicina.

Entre os temas abordados estarão: imunopatologia da lepra e da tuberculose; métodos modernos de diagnóstico rápido de tuberculose; terapêutica experimental com novos fármacos; sistemas modernos automatizados em micobacteriologia; e novos conhecimentos sobre *M. leprae*.

para maiores informações:

Secretaria do Simpósio Internacional de Micobactérias

Departamento de Microbiología

Facultad de Medicina

Cordoba - 4 ESPAÑA

tel: 29-7122 e 29-8088

Williamson, R., ed. - *Genetic engineering*. New York, Academic Press, vol. 4, 185p., 1983.

O livro, último a ser editado por Robert Williamson e, complementando os anteriores, traz novas revisões sobre aspectos da Engenharia genética. Especificamente as revisões abordam:

1. As técnicas desenvolvidas na manipulação in vitro de sítios de restrição e de mutação localizada, destacando a necessidade de sítios de restrição únicos na construção de vetores; a utilidade dos fagos de fita simples como vetores na mutação localizada e no sequenciamento, e, da síntese artificial de oligonucleotídeos.

2. Aplicação da tecnologia do DNA recombinante na caracterização e expressão de polipeptídeos com função hormonal aonde são discutidos aspectos da informação que foi ganha com a clonagem destas sequências e as perspectivas de melhor utilização das informações as quais necessitariam de um trabalho multidisciplinar.

3. Expressão de genes isolados de eucariotos em *E. coli*, aonde é enfatizado que existem poucos relatos de expressão em altos níveis e, são discutidas alternativas para o problemas quais sejam: outros promotores e construções; aumento da estabilidade do mRNA; uso de outros hospedeiros para o gene clonado, etc.

Em todas as revisões pode ser notada a cuidadosa intenção de apresentar as informações de forma concisa, clara e profunda, o que torna este volume da série, como os demais, valioso tanto para pesquisadores como para os que ensinam.

Creamos que a contribuição desta série, ora acrescida do volume 4, tem sido fundamental na divulgação dos avanços da tecnologia do DNA recombinante e, esperamos que ela continue assim agora com Peter Rigby, como novo editor.

Renato Bonatelli Jr.
Deptº de Genética e Evolução
Instituto de Biologia Unicamp
Caixa Postal 6109
13100 Campinas SP

Fotolitos e Impressão



Avenida Sogaert, 64
Vila dos梅rces São Paulo
Fone: 514-0233
CEP 04298