

Revista de Microbiologia



SBM

Sociedade
Brasileira de
Microbiologia

São Paulo — Brasil

Volume 17 Número 1 Jan.-Mar. 1986

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 unidade internacional (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 milímetro ($m\mu$); nanômetro (nm ; $10^{-9}m$), ao invés de milímetro ($m\mu$); 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, ce um título e resumo em inglês. O resumo na língua do trabalho e o título com resumo na outra língua devem ser datilografados em página separada do restante do texto.

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

Exemplo:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia

São Paulo — Brasil

Conselho Diretor	Luiz Rachid Trabulsi, Italo Suassuna e Wilson Chagas de Araujo
Diretor Executivo	João Salvador Furtado Instituto de Ciências Biomédicas USP Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 Cidade Universitária USP 05508 São Paulo SP
Diretor Associado	Flávio Alterthum Instituto de Química — USP Caixa Postal 20780 01000 São Paulo SP
Assistente de Diretoria	Leila Vasconcellos Sociedade Brasileira de Microbiologia Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 Cidade Universitária USP 05508 São Paulo SP
Aquisição por não-membros	Assinatura anual para quatro números: 2 OTN's para o Brasil: US\$ 25.00 (via marítima) ou US\$ 30.00 (via aérea para o Exterior). Cheques em nome da Sociedade Brasileira de Microbiologia, para o endereço do Diretor Executivo da Revista de Microbiologia.
Acquisition by non-members	Annual subscription: US\$ 25.00 (surface mail) or US\$ 30.00 (air mail). Checks for Sociedade Brasileira de Microbiologia, addressed to the Director's office.
Impressão	Gráfica Editora Hamburg Ltda.

Pertence à:

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

Sociedade Brasileira de Microbiologia

Diretoria	Presidente Marcelo Magalhães Universidade Federal de Pernambuco Cidade Universitária 50000 Recife PE	Vice-Presidente João Salvador Furtado Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 Cidade Universitária USP 05508 São Paulo
	Secretário Geral Milton de Uzeda Instituto de Microbiologia UFRJ Centro de Ciências da Saúde Bloco I — Ilha do Fundão 21941 Rio de Janeiro RJ	Tesoureiro Walderez Gambale Instituto de Ciências Biomédicas USP Deptº de Microbiologia Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 Cidade Universitária USP 05508 São Paulo SP
Objetivos	A Sociedade Brasileira de Microbiologia, fundada em 28 de setembro de 1956, é sociedade civil, sem fins lucrativos, dedicada a agrupar microbiologistas brasileiros; a promover o desenvolvimento da microbiologia através do estímulo à pesquisa científica e suas aplicações, melhorar as qualificações profissionais dos microbiologistas; e manter intercâmbio e fazer aproximação com entidades que visem objetivos semelhantes. Organiza, a cada dois anos, na última semana do mês de julho, o Congresso Brasileiro de Microbiologia e edita a Revista de Microbiologia, com distribuição trimestral. Para informações sobre a SBM, escrever para qualquer membro da Diretoria.	

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

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

Atlas Indústrias Químicas S.A.
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
Dep. de Microbiologia - ICB II - USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 - Cid. Universitária
CEP 05508-900 - São Paulo - SP - BRASIL
Site: www.revmicro.cjb.net

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA
VOLUME 17 JANEIRO-MARÇO 1986 NÚMERO 1
REV. MICROBIOL. (S. PAULO), 17(1)

CONTEÚDO

- | | | |
|---|--|---|
| Peres, C.S.;
Figueiredo, M. da G.;
Vitoratto, E.;
& Perego Jr., L. | 1 Crescimento de bactéria fotossintetizante (BF) anaeróbia em meio constituído de vinhaça | <i>Growth of anaerobic photosynthetic bacteria in vinasse medium</i> |
| Sant'Anna, E.S.;
Teixeira, E.;
& Moretto, E. | 10 Crescimento de <i>Morchella crassipes</i> (Vent) Pers. em meio sintético e vinhaça | <i>Morchella crassipes</i> growth in synthetic and vinasse media |
| Ferraz, C.A.M.;
Balloni, W.;
& Florenzano, G. | 15 Utilização de sub-produtos da indústria alcooleira na obtenção de biomassa de <i>Spirulina maxima</i> . Parte II - Emprego do resíduo da destilação do mosto fermentado (vinhaça) | Utilization of by-products from alcoholic fermentation industry to biomass production of <i>Spirulina maxima</i> . Part II - Use of molasses alcohol distillate waste |
| Almeida, P.F. de;
Oliveira, J.V. de;
& Hayashi, C.M. | 22 Tipificação de <i>Rhodococcus</i> (<i>Corynebacterium</i>) equi de origem bovina, ovina e caprina | Typification of <i>Rhodococcus</i> (<i>Corynebacterium</i>) equi from bovine, ovine and caprine sources |
| Yasuda, P.H.;
Sulzer, C.R.;
Giorgi, W.;
& Soares, M.E.G. | 25 <i>Leptospira biflexa</i> sorotipo <i>ranarum</i> isolado de feto abortado de equino | <i>Leptospira biflexa</i> serovar <i>ranarum</i> isolated from aborted equine foetus |
| Calixto, S.;
Baldassi, L.;
Moulin, A.A.P.;
& Hipólito, M. | 28 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> como agente causal de abcesso em serpente (<i>Bothrops neuwiedi</i>) | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> as a causal agent of snake abscess |
| Serafim, M.B.;
Castro, A.F.P. de;
Colli, I.A.G.;
& Brito, J.R.F. | 31 Detecção de antitoxina contra a enterotoxina termo labil (LT) de <i>Escherichia coli</i> em soro de suínos, através de reações de imuno hemólise | Detection of antitoxin against thermolabile (LT) enterotoxin of <i>Escherichia coli</i> in porcine sera, by immune haemolysis reactions |
| Sargoni, A.E.;
Franco, M.A.;
& Torres, R.A. de | 39 Viabilidad y multiplicación de <i>Listeria monocytogenes</i> cepa Murray frente a antimicrobianos de uso en medios selectivos | Effects of antimicrobial agents of potential utilization in selective media on viability and growth rate of <i>Listeria monocytogenes</i> |

Hofling, J.F.	47 Mecanismos de infecções mistas por microrganismos anaeróbios da cavidade oral	<i>Mechanisms in polymicrobial oral infections</i>
Andrade, J.R.C.; & Rosa, M.R. de S.	53 Aderência e penetração intracelular de <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica clássica em células Hep-2	<i>Attachment and intracellular penetration of classic enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> into Hep-2 cells</i>
Asensi, M.D.; & Hofer, E.	58 Pesquisa de <i>Yersinia enterocolitica</i> em pacientes reumáticos. II - Sorologia	<i>Investigation of <i>Yersinia enterocolitica</i> in rheumatic human patients. II - Serology</i>
Mendonça, C.P.; Solé-Vernin, C.; & Nogueira, M.Z.;	64 Estreptococos beta-hemolíticos e níveis séricos de antiestreptolisina "O" em comunidade rural, Américo Brasiliense SP, 1981	<i>Beta hemolytic streptococci and serum levels of ASO in a rural community, Américo Brasiliense SP, 1981</i>
Informação Técnico-Científica SBM	71	
Anrain, E.	95 Biogás: Pesquisa ou aplicação - perspectivas	

CRESCIMENTO DE BACTÉRIA FOTOSINTETIZANTE (BF) ANAERÓBIA EM MEIO CONSTITUÍDO DE VINHAÇA

Clarita S. Peres

Agrupamento de Biotecnologia
Divisão de Química e Engenharia Química/IPT
Caixa Postal 7141
01000 São Paulo SP, Brasil

Maria da Glória Figueiredo

Gerência de Pesquisa de Tratamento de Resíduos
Cetesb
Av. Prof. Frederico Hermann Jr., 345
05459 São Paulo SP, Brasil

Elsa Vitoratto

Agrupamento de Biotecnologia
Divisão de Química e Engenharia Química/IPT

& Leonardo Perego Junior

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

Resumo

Verifica-se o crescimento de *Rhodopseudomonas palustris* (BF) em meio constituído de vinhaça de caldo misto diluída, suplementado unicamente com 0,5g/l de extrato de levedura. Constatou-se que, ao se atingir a concentração de DQO equivalente a 10.000mg O₂/l, cessa o desenvolvimento da BF. Em valores inferiores de DQO a cepa desenvolveu-se satisfatoriamente.

Summary

Growth of anaerobic photosynthetic bacteria in vinasse medium

The growth of *Rhodopseudomonas palustris*, an anaerobic photosynthetic bacteria, in a medium made up with vinasse and yeast extract (0,5g/l), was verified. It was noticed that the bacteria development stopped when COD value reached 10.000mgO₂/l.

Rev. Microbiol., São Paulo, 17(1):1-9, Jan./Mar. 1986.

Tabela 1 - Composição do meio de cultura sintético para *Rhodopseudomonas palustris*

Componente	Quantidade (g/1 litro de meio)
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	0,5g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,4g
NaCl	0,4g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,05g
$\text{Na} - \text{acetato}$	2,0g
Extrato de levedura	0,5g
K_2HPO_4	1,0g
Solução de micro-elementos*	10,0ml
pH = 6,5	
*Solução de micro-elementos	
EDTA	1,5g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	200,0mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	100,0mg
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	20,0mg
Solução de Hoogland**	6,0ml
** Solução de Hoogland	
AlCl_3	1,0g
KI	0,5g
KBr	0,5g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	7,0g
H_2BO_3	11,0g
ZnCl_2	1,0g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,0g
CoCl_2	1,0g
$\text{SrCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,5g
BaCl_2	0,5g
Na_2MoO_4	0,5g
$\text{NaVO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,1g

Tabela 2 - Características físico-químicas da solução estoque de vinhaça

pH	7,0
DQO (mg/l)	51.950
DBO ₅ (mg/l)	29.800
Sólidos totais (g/l)	69,6
Sólidos voláteis (g/l)	48,8
Carbono (C) (g/l)	18,2
Nitrogênio total (N) (mg/l)	1.200
Fósforo (P) (mg/l)	164
Potássio (K) (g/l)	7,0
Sulfato (SO_4^{2-}) (g/l)	5,4
Nitrogênio amoniacal (N) (mg/l)	5
Ferro (Fe) (mg/l)	56
Glicerol (g/l)	8,6

Introdução

Há vários anos realizam-se intensos estudos, tanto na direção da produção de biomassa microbiana com vistas à sua utilização como ração animal e humana, quanto na direção da redução da carga orgânica poluente de rejeitos industriais, utilizando-se da oxidação biológica (2).

Dentre os estudos realizados que procuram associar essas intenções, ou seja, transformar a carga orgânica poluente de rejeitos industriais em biomassa unicelular, destacam-se por sua particularidade aqueles que se utilizam de microrganismos fotossintetizantes, com especial referência às bactérias fotossintetizantes (BF) em condição de anaerobiose, na medida em que são capazes de assimilar para seu desenvolvimento, matéria orgânica não facilmente metabolizável por microrganismos quimiotróficos (1, 3, 4, 6). Para se promover o crescimento de microrganismos em vinhaça, resultante da destilação do álcool etílico, quase sempre é necessário recorrer-se a correções e suplementações significativas da mesma, para se obter biomassa em concentrações razoáveis.

O trabalho realizado teve por objetivo estudar o crescimento de *Rhodopseudomonas palustris* em meio de cultura constituído de vinhaça. Tal crescimento se faz à custa do consumo da carga poluente do meio, constituindo-se portanto, também em um processo de depuração do rejeito. Esta carga poluente foi sempre expressa em termos de Demanda Química de Oxigênio (DQO).

Material e Métodos

Microrganismos - Utilizou-se uma cultura com predominância de *Rhodopseudomonas palustris*, gentilmente cedida pelo Centro di Studi dei Microrganismi Autotrofi di Firenze, Itália, mantida em frascos Erlenmeyers completamente preenchidos com meio de cultura sintético, vedados e estocados em estufa de 35°C, iluminada internamente. Procedia-se ao repique quinzenal da cultura.

Meio de cultura - Meio sintético - A composição do meio de cultura encontra-se na Tabela 1 (1). As soluções são esterilizadas em autoclave a 121°C e 1 sobre-atmosfera de pressão, por 20 minutos e misturados no momento do uso, conforme o indicado na mesma tabela.

Meio de cultura de vinhaça - A vinhaça de caldo misto foi obtida junto à Usina Santa Elisa, Sertãozinho, SP, na forma concentrada (densidade relativa = 60°Brix).

Após ser diluída 10 vezes em volume, procedia-se o ajuste do pH a 7,0 sendo então clarificada por aquecimento a 121°C e 1 sobre atmosfera de pressão por 30 minutos. Desprezavam-se os sólidos decantados. A caracterização físico-química da solução estoque encontra-se na Tabela 2.

Tabela 3 – Resultados obtidos no ensaio 1

Alimen- tação	Tempo (d)	Composição				Porcen- tagem de corte (%)	Massa seca (g/l)	DGO (mg/l)	pH
		Vinhaça (ml)	Extrato de levedura (ml)	Aqua deio- nizada (ml)	Total (ml)				
1º	0					0,10	1.700	6,80	
	1					0,60	-	7,70	
	2					0,93	-	8,00	
	3					0,95	-	8,16	
	4					0,95	-	8,80	
	5					0,86	-	6,80	
	6					0,92	280	6,95	
	6	111	26,3	282,7	420	-	0,82	2.850	6,87
	7					1,53	1.700	6,87	
	8					1,70	1.050	6,86	
	9					1,65	970	7,01	
	11					1,61	930	7,27	
	12					1,93	910	7,90	
2º	13					2,25	-	-	
	14					1,77	900	6,95	
	14	132	31,3	636,7	800	-	1,51	3.300	-
	15					1,77	2.700	6,68	
	16					2,12	1.300	6,85	
	17					2,20	1.250	7,46	
	18					2,38	1.650	7,48	
	19					2,41	1.350	7,00	
	21					2,40	1.250	7,50	
	21	148	35	617	800	-	2,16	3.550	7,37
3º	22					2,20	3.150	7,05	
	23					2,73	2.600	6,75	
	24					2,90	1.850	7,23	
	25					3,15	1.550	7,97	
	26					2,90	1.550	6,96	
	27					2,90	1.650	7,17	
	27	148	35	377	560	20	2,60	3.600	7,17
4º	28					3,18	2.500	7,96	
	29					3,10	2.250	7,18	
	30					3,14	2.350	7,24	
	31					3,03	2.450	7,32	
	32					2,93	1.800	7,80	
5º	32	221	35	304	560	20	2,82	5.500	7,48
	33					2,84	3.850	6,60	
	34					2,83	4.200	6,95	
	35					3,35	3.450	7,60	
	36					3,48	3.350	7,30	
	37					3,60	2.650	7,48	
	38					3,48	2.450	7,47	
	39					3,30	2.650	8,07	
	40					3,31	2.500	7,51	
	40	148	35	937	1120	40	2,50	4.350	6,60
6º	41					2,70	3.500	6,71	
	42					2,85	2.750	6,85	
	43					2,90	2.650	7,76	
	46					2,74	2.000	7,30	
7º	47					2,82	2.450	7,50	
	47	219	35	306	560	20	2,61	6.100	7,51
	48					3,09	4.850	6,90	
	50					3,26	2.800	7,40	
	53					3,21	2.650	-	

Tabela 3 (continuação) - Resultados obtidos no ensaio 1

Alimen- tação	Tempo (d)	Vinhaça (ml)	Composição			Porcen- tagem de corte (%)	Massa seca (g/l)	DQO (mg/l)	pH
			Extrato de levedura (ml)	Água deio- nizada (ml)	Total (ml)				
89	53	219	35	306	360	20	3,22	6.450	6,96
	55						3,32	5.700	6,94
	56						3,36	4.750	7,50
	60						3,85	3.250	7,70
	61						3,68	3.350	7,86
	62						3,77	3.400	7,40
99	62	215	35	870	1120	40	2,56	6.750	7,40
	63						2,77	5.500	6,70
	64						2,84	5.600	6,86
	67						3,30	3.200	7,54
	68						3,38	3.300	7,70
	69						3,19	3.300	7,56
109	70	633	50	967	1650	-	3,06	10.000	6,97
	71					volume	3,26	11.250	5,80
	72					de	3,28	9.500	6,21
	74					meio	3,17	11.350	6,80
	76					4000ml	3,08	10.350	6,83
	78						3,04	-	7,20
119	78	211	50	1739	2000	50	1,89	-	6,60
	80					volume	1,78	8.450	6,55
	81					de	1,88	8.600	7,04
	82					meio de	1,81	7.050	7,06
	84					4000ml	1,86	7.650	7,17
	85						1,75	6.150	7,30
87	87						2,25	6.500	7,28
	89						2,30	5.950	7,30
	91						2,49	6.950	7,60
	92						-	7.000	7,70
	94						2,64	7.550	7,77
	96						2,70	6.050	7,06

O meio de cultura de vinhaça era preparado por diluição de uma aliquote conveniente, da solução estoque, com água deionizada, de acordo com o nível de DQO necessário e suplementado com volume de suspensão de extrato de levedura a 40g/l, suficiente para se obter 0,5g/l no interior da dorna (Tabelas 3 e 4).

Execução de ensaios - Foram realizados dois ensaios em paralelo, sendo um com meio de vinhaça (ensaio 1) e outro com meio sintético (ensaio 2), ambos em fermentadores de bancada New Brunswick (equipamento obtido com apoio financeiro da FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), equipados com reatores de vidro com 5l de volume nominal, com frequência de agitação de 400rpm, temperatura de 35°C e intensidade de iluminação de 3 Klux ao nível da parede da dorna, proveniente de 4 lâmpadas fluorescentes de 15W cada, simetricamente colocadas em posição vertical ao seu redor. Estes fermentadores não dispõem de equipamento para limpeza intermitente de lado interno de sua parede, como seria desejável num trabalho deste tipo (1).

A partida de ambos os ensaios foi feita com um volume inicial de meio sintético igual a 2,13l e concentração inicial de bactérias igual a 0,10g/l. Este inóculo foi obtido por simples centrifugação da suspensão de manutenção da BF. A DQO inicial do meio foi de 1.700mg/l. Decorridos 6 dias de experimentação iniciou-se a adição periódica de meio de cultura aos fermentadores. Até o 21º dia, o volume dos reatores foi aumentado até 2,8l, resultado de três alimentações, descontando-se o volume retirado dos fermentadores para amostragem nesse período, sendo este o volume de trabalho fixado, exceto quando indicado (Tabelas 3 e 4). A partir do 27º dia a alimentação dos reatores foi feita pelo processo de cortes, cuja composição e volume estão expressos nas Tabelas 3 e 4.

Cabe frisar que todas as alimentações, na forma de cortes ou não, foram feitas com meio de vinhaça no ensaio 1 e meio sintético no ensaio 2, ambos sempre suplementados com extrato de leveduras, de modo a manter a concentração de 0,5g/l, no interior da dorna.

Periodicamente eram retiradas amostras de 50 ou 100ml para execução das análises de acompanhamento. Na retirada de amostras tomou-se sempre a precaução de fazer fluir nitrogênio na cabeça do reator, para eliminação do oxigênio atmosférico. Os volumes de amostras eram computados por ocasião da execução dos cortes.

Métodos analíticos - A separação das células de BF do meio de cultura se fez por filtração em membrana Millipore (diâmetro de poro = 0,22µm). As células retidas eram então lavadas 2 vezes com água destilada e secas a 105°C, por 2h. No filtrado realizavam-se as determinações de pH e DQO (5).

Resultados

Os resultados obtidos encontram-se nas Tabelas 3 e 4 e Figuras 1 e 2.

Tabela 4 – Resultados obtidos no ensaio 2

Alimen- tação	Tempo (d)	Composição			Porcen- tagem de corte (%)	Massa seca (g/l)	DQO (mg/l)	pH
		Meio Sin- tético (ml)	Extrato de levedura (ml)	Total (ml)				
	0					0,09	1.650	6,80
	1					0,52	–	7,50
	2					0,95	–	7,87
	3					1,00	–	8,35
	4					0,99	–	8,77
	5					0,89	–	7,12
	6					1,00	210	7,26
	6	484	20	504	–	0,75	1.100	7,00
	7					1,09	220	7,46
19	8					1,16	220	6,92
	13					1,20	340	–
	14					1,13	310	6,55
29	14	676	23	699	–	0,93	650	6,55
	16					–	240	7,06
29	18					1,29	350	7,80
	20					1,23	–	7,40
	21					1,25	240	7,28
39	21	648	28	676	–	1,19	720	7,08
	23					1,33	380	7,04
	25					1,42	340	7,77
	27					1,28	–	6,97
49	27	504	28	532	20	–	–	6,90
	29					1,42	470	7,11
	31					1,43	630	7,36
	32					1,38	490	7,50
59	32	532	28	560	20	1,18	960	7,23
	34					1,46	330	7,07
	36					1,41	490	7,48
69	36	532	28	560	20	1,21	1.450	7,48
	37					1,52	930	7,07
	40					1,70	370	7,28
	41					1,80	410	7,56
79	41	532	28	560	20	1,50	1.400	7,10
	43					1,92	760	7,60
	46					1,85	460	7,60
	47					2,05	630	7,70
89	47	532	28	560	20	1,71	1.200	7,40
	49					2,07	630	7,86
	50					2,10	420	7,67
99	50	532	28	560	20	1,86	1.050	7,66
	51					1,97	700	7,53
	53					2,10	750	7,60
	55					2,00	550	7,59
	56					1,85	510	7,86
	57					2,13	630	7,80
109	57	532	28	560	20	1,76	810	7,80
	60					1,79	–	7,46
	61					1,70	500	7,72
	62					1,85	520	7,50
119	62	532	28	560	20	1,63	1.250	7,50
						1,64	630	7,47
						1,76	450	7,40

Tabela 4 (continuação) – Resultados obtidos no ensaio 2

Alimen- tação	Tempo (d)	Composição			Porcen- tagem de corte (%)	Massa seca (g/l)	DQO (mg/l)	pH
		Meio Sin- tético (ml)	Extrato de levadura (ml)	Total (ml)				
12º	64	532	28	560	20	1,69	1.150	7,46
	67					1,76	560	7,52
	68					1,79	440	7,72
	70					1,61	500	7,80
	70	1019	31	1052	-	1,54	1.100	7,60
	71				volume de meio	1,50	1.000	7,55
13º	72				de 3500	1,60	780	7,66
	74				ml	1,71	490	7,70
	75					1,69	450	7,57
	76					1,70	530	7,50
	76	311	39	350	-	1,59	950	7,50
	77				volume de	1,70	640	7,48
14º	78				meio de	1,84	540	7,76
	80				3500ml	1,84	560	7,40
	81					1,77	520	7,60
	82					1,71	720	7,68
	83					-	-	-
	83	881	19	900	79,4	0,89	1.250	7,30
15º	85				volume de	1,33	270	7,94
	87				meio de	1,40	340	8,15
	87	650	-	650	-	0,98	760	7,47
	89				volume de	1,20	300	7,89
	91				meio de	1,10	380	8,03
	92				2000ml	1,05	330	-
17º	92	779	21	800	-	0,85	1.100	8,11
	94				volume de	1,26	480	7,73
	96				meio de	1,20	440	7,85
					2500ml			

Discussão

A partir dos resultados obtidos, calculou-se o fator de conversão de substrato em massa celular (Y_x/s). Considerou-se substrato a DQO consumida no intervalo de tempo em questão e os dados foram obtidos, a partir da interpolação dos resultados expressos nas Figuras 1 e 2.

O exame dos resultados mostra que na fase inicial dos ensaios (até 6º dia), onde se utilizou apenas meio sintético, ocorreu grande desenvolvimento celular proporcionado pela abundância de luz e existência de substrato facilmente assimilável pelas BF (acetato de sódio). Este era o objetivo desta fase e, como esperado, ocorreu grande redução da DQO do meio.

A partir do momento em que se iniciou a adição da vinhaça ao meio de ensaio 1 (1º alimentação) ocorreu uma queda significativa tanto no valor de Y_x/s como no consumo de DQO disponível, o que é justificável, já que os componentes da vinhaça provavelmente não são tão facilmente assimiláveis como o acetato de sódio. Em seguida, a DQO inicial de cada alimentação foi sendo gradativamente aumentada até atingir 3500mg/l (21º dia). Concomitantemente observou-se aumento na concentração celular tal que ocasionou a diminuição na penetração da luz no reator, tanto pela concentração celular de "per si", como principalmente pelo aumento da espessura da camada de células aderidas à parede do reator.

A partir do 27º dia as alimentações, no ensaio 1, passaram a ser feitas por processo de cortes, sendo que a quantidade de vinhaça introduzida no sistema era determinada pela DQO inicial que pretendia atingir.

Na 4ª e 5ª alimentações o volume de corte foi de 20%, mas a DQO inicial foi aumentada nesta última para 5500mg/l. A concentração celular continuou aumentando e o consumo de DQO cresceu com o aumento da DQO inicial, porém o decréscimo do fator de conversão mostra que a eficiência da cultura estava diminuindo (Tabela 5).

Tabela 5 - Dados interpolados e parâmetros calculados no ensaio 1.
 Símbolos: $Yx/s = \frac{\text{Massa seca produzida}}{\text{DQO consumida}}$
 (fator de conversão)

Tempo (dias)	Massa seca final (g/l)	Massa seca inicial (g/l)	DQO inicial (g/l)	DQO final (g/l)	Yx/s
0-6	0,95	0,10	1,70	0,30	0,61
6-14	1,75	0,80	2,90	0,90	0,48
14-21	2,40	1,50	3,30	1,30	0,45
21-27	3,00	2,15	3,55	1,50	0,42
27-32	3,15	2,65	3,60	1,35	0,36
32-40	3,45	2,80	5,50	2,40	0,21
40-47	2,80	2,50	4,30	2,25	0,15
47-53	3,25	2,60	6,10	2,55	0,18
53-62	3,75	3,20	6,45	3,30	0,17
62-70	3,35	2,60	6,75	3,20	0,21
70-78	3,05		10,40	10,40	zero
78-96	2,70	1,90	8,50	6,60	0,42

Tabela 6 - Dados interpolados e parâmetros calculados no ensaio 2.
 Símbolos: $Yx/s = \frac{\text{Massa seca produzida}}{\text{DQO consumida}}$
 (fator de conversão); * = Valores não interpolados porque o sistema não atingiu equilíbrio

Tempo (dias)	Massa seca final (g/l)	Massa seca inicial (g/l)	DQO inicial (g/l)	DQO final (g/l)	Yx/s
0-6	1,00	0,10	1,70	0,20	0,60
6-14	1,20	0,75	1,10	0,25	0,53
14-21	1,25	1,00	0,60	0,25	0,71
21-27	1,40	1,20	0,70	0,35	0,57
27-32	1,40	1,20	-	0,50	-
32-36	1,45	1,15	0,95	0,40	0,55
36-41	1,75	1,20	1,45	0,40	0,52
41-47	2,00	1,50	1,40	0,50	0,56
47-50	2,10	1,70	*	*	*
50-57	2,05	1,85	1,10	0,50	0,33
57-62	1,80	1,80	0,80	0,50	zero
62-64	*	*	*	*	*
64-70	1,70	1,70	1,15	0,50	zero
70-76	1,70	1,50	1,10	0,50	0,33
76-83	1,80	1,70	0,95	0,50	0,22
83-87	1,40	0,85	1,25	0,30	0,58
87-92	1,10	0,95	0,70	0,30	0,38
92-96	1,25	0,80	1,10	0,40	0,64

Verifica-se facilmente que até este estágio o valor da DQO final do meio estabilizou-se em valores sempre crescentes a cada alimentação, o que indica parte dos componentes de vinhaça não eram assimilados pela BF e se acumulavam no reator. Tentou-se corrigir este fato aumentando-se o volume de corte e diminuindo-se a DQO inicial (6ª alimentação) mas os resultados obtidos foram discretos, indicando que a substituição de meio deverá ser maior que aquela realizada.

Entre 7ª e 9ª alimentações (47 a 70 dias) aumentou-se a DQO inicial para cerca de 6500mg/l O₂/l e o sistema se estabilizou num valor médio de 53% de redução de DQO e com fator médio de conversão de 0,19g cel/g DQO.

Na 10ª alimentação aumentou-se bastante a DQO inicial (10400mg/l) e o simples exame da Figura 1 mostra que as BF não conseguiram se desenvolver no meio, embora tenham sobrevivido por 8 dias. Isto ficou demonstrado na 11ª alimentação quando a DQO inicial foi diminuída para 8500mg/l e a cultura voltou a se desenvolver, após 6 dias de adaptação a este nível de DQO.

No ensaio 2, onde se utilizou sempre meio sintético e volume de corte de 20%, o sistema se mostrou mais estável com menor acúmulo de DQO residual e fatores de conversão em média superiores aos obtidos no meio de vinhaça. Deve-se levar em consideração que as concentrações celulares obtidas foram sempre inferiores àquelas do ensaio 1 e a espessura da camada de células aderidas à parede do reator foi significativamente menor, o que possibilitou melhores condições de aproveitamento da iluminação do sistema.

Conclusões

Os resultados permitidos permitem constatar: 1. Nas condições adotadas a cepa de BF conseguiu se desenvolver em meio com até 8500mg/l de DQO. 2. Não se pode prever até o momento o uso de vinhaça "in natura" (DQO entre 15000 e 70000mg/l) para desenvolvimento de BF, porém a vinhaça mostrou ser um bom constituinte de meio de cultura e incomparavelmente mais econômico que o meio sintético. 3. O processo de cortes se mostrou eficiente, indicando que há boas possibilidades de adoção de processos contínuos de fermentação.

Figura 1 – Resultados obtidos no ensaio 1

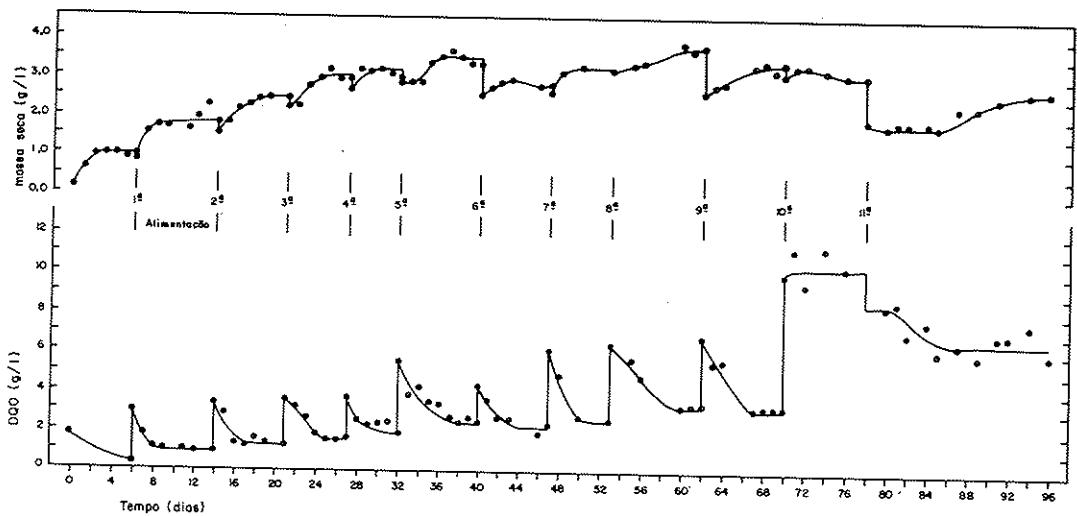
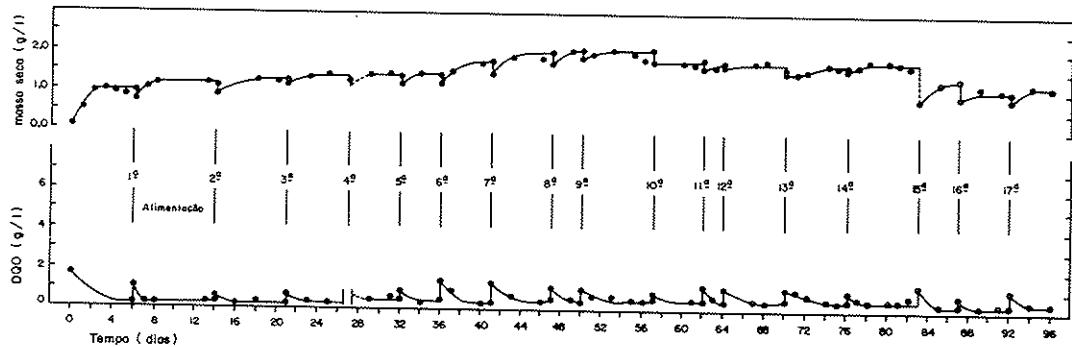


Figura 2 – Resultados obtidos no ensaio 2



Agradecimentos

Este trabalho contou com o apoio financeiro do Deptº de Ciências Exatas e Tecnologia - DCET da Secretaria de Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia do Estado de São Paulo - SICCT. Agradecemos também a valiosa colaboração dos Profs. Flávio Alterthum do Instituto de Química da USP e Willibaldo Schmidell Netto da Escola Politécnica da USP, e do técnico Nilton de Moraes Bloisi da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Referências Bibliográficas

1. Balloni, W.; Materassi, R.; Filpi, C.; Vincenzini, M.; Ena, A. & Florenzano, G. - Il metodo di trattamento a batteri fotosintetici delle acque di scarico. Firenze, CNR-AQ/2/21, 1982.

2. Carioca, J.O.B. & Arora, H.L. - Biomassa: fundamentos e aplicações tecnológicas. Fortaleza, Universidade Federal do Ceará, 1984.
3. Kobayashi, M.; Fujii, K.; Shimamoto, I. & Maki, T. - Treatment and re-use of industrial wastewater by phototrophic bacteria. *Prog. Water Tech.*, 11:279-284, 1978.
4. Kobayashi, M. & Kurata, S. - The mass culture and cell utilization of photosynthetic bacteria. *Process Biochem.*, 13:27-30, 1978.
5. Oxigen Demand (Chemical). In: - Standard methods for the examination of water and wastewater. 14.ed. Washington, DC. American Public Health Association, p.550-554, 1975.
6. Shelef, G.; Solder, C.J. - Algae biomass: production and use. Amsterdam, Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1980.

CRESCIMENTO DE *MORCHELLA CRASSIPES* (VENT) PERS. EM MEIO SINTÉTICO E VINHAÇA

Ermanni Sebastião Sant'Anna
 Evanilda Teixeira
 & Eliane Moretto

Deptº de Ciéncia e Tecnologia de Alimentos
 Centro de Ciéncias Agrárias UFSC
 Caixa Postal 476
 88000 Florianópolis SC, Brasil

Resumo

O presente trabalho apresenta os resultados obtidos no estudo comparativo do cultivo de micélio de *Morchella crassipes* (Vent) Pers. em meio sintético e vinhaça. No processo fermentativo foi utilizado 1 litro de ar/litro de meio/minuto, temperatura de 25°C, pH 4,5 e 5,0 para o meio sintético e vinhaça, respectivamente, a vinhaça utilizada no processo após a esterilização e resfriamento foi suplementada com solução de uréia a 20% (15ml/litro de meio). Verificou-se a relação entre o tempo de fermentação, a variação do pH, o consumo de açúcares redutores totais (ART, g/100ml de meio) e o rendimento micelial (micélio seco g/100ml de meio) nas fermentações realizadas em ambos os meios. Observou-se que o rendimento em meio sintético contendo 5,0% de ART foi inferior ao obtido com a vinhaça apesar desta apresentar, apenas 1,065%. Com relação ao aroma, o micélio obtido em meio sintético apresentou forte odor à mofo e em meio de vinhaça odor à bagaço de cana fermentado.

Summary

Morchella crassipes growth in synthetic and vinasse media

A comparative study on *Morchella crassipes* growth in synthetic and vinasse media was carried out. The experiments were at 25°C, pH 4,5 and 5,0, and aeration of 1 liter of air/1 liter of medium/minute, and a 20% urea solution (15ml/liter of medium), after sterilization and cooling, both to synthetic and vinasse medio. Time of fermentation, pH change, total reducing sugar (TRS) consume (g/100ml of medium) and mycelium yielding relation were set up. Yielding from a 5% TRS synthetic medium was less than that from vinasse with 1,065% TRS. Flavor from vinasse medium mycelium was better than that from the synthetic on.

Introdução

Vários autores (2, 3, 10, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 24) têm discutido em seus trabalhos, a possibilidade do uso de micélio de cogumelos na alimentação humana, seja como fonte de proteínas e vitaminas ou mesmo como complemento aromatizante

em sopas e alimentos desidratados. Dentre os microrganismos estudados para este fim encontram-se várias espécies de *Marchella* (*M. hortensis* B., *M. crassipes* (Vent) Pers., *M. hibrida* Sow ex Fr., *M. esculenta* Fr.), de *Agaricus* (*A. campestris* L. ex Fr., *A. bisporus* (Lange) Sing), de *Tricholoma* (*T. nudum* (Bull. ex Fr.) Kummer), de *Boletus* (*B. granulatus* L. ex Fr., *B. luteus* L. ex Fr., *B. edulis* Bull. ex Fr.) (2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 16, 17), cujas condições de crescimento é característica de cada espécie.

O micélio desenvolvido em meio líquido aerado cresce de forma semelhante à pequenas esferas, cujo diâmetro varia dependendo da intensidade da agitação, aeração e concentração de açúcar do meio. Em frascos de agitação as esferas apresentam um diâmetro de aproximadamente 0,125 polegadas, semelhante à ova de peixes, já em frascos aerados sem agitação, os grumos são maiores e seu diâmetro fica em torno de 1,0 polegada. A cultura contém numerosos corpos semelhantes aos esporos secundários que foram descritos por Kligman (12) e Humfeld (10). O crescimento rápido destas culturas parece ser resultado da germinação e crescimento dos esporos secundários. Após 48 horas o cordão micelial fragmenta-se e a 72 horas os fragmentos tornam-se abundantes no meio e cada fragmento individual serve como um novo núcleo de crescimento (24). A produção de esporos secundários está relacionada com a velocidade de agitação do meio (25). Humfeld & Sugihara (10) trabalhando com *A. campestris* em fermentador com 5% de inóculo, observaram intensa esporulação 15 horas após a inoculação.

O maior problema, até o presente, é o desenvolvimento em cultura submersa de um aroma de cogumelos no micélio, de intensidade suficiente e boa aceitabilidade pelos consumidores. Amostras de *A. campestris*, desenvolvidas em meio líquido foram cozidas e submetidas a um painel de teste. Os comentários mais favoráveis foram que o micélio possuía um aroma semelhante à noz, queijo ou apenas agradável (13). Já outros indivíduos preferiram amostras de cogumelos naturais às do micélio. O micélio desenvolvido em meio sólido possui um odor característico que não é detectável no micélio desenvolvido em meio líquido (13).

O objetivo do presente trabalho é o de comparar o crescimento de micélio de *M. crassipes* em fermentador utilizando como substrato meio sintético (10) e vinhaça suplementada com uréia e definir possibilidades de utilização do mesmo.

Material e Métodos

Métodos microbiológicos - A cultura de *M. crassipes* foi cedida pelo Centraalbureau voor Schimmelcultures, sem codificação e mantida à 25°C em ágar extrato de malte com 5% de glicose. A composição do meio sintético foi a mesma utilizada por Humfeld & Sugihara (10).

Tabela 1 - Relação entre o tempo de fermentação (hora), a variação do pH, o consumo de açúcares redutores totais (ART, g/100ml de meio) e o rendimento micelial (g/100ml de meio) na fermentação do meio sintético e vinhaça em fermentador pela *Marchella crassipes*

Tempo de fermentação (hora)	pH (meio sintético)	pH (vinhaça)	ART (g/100ml de meio sintético)	ART (g/100ml de vinhaça)	Micélio seco (g/100ml de meio sintético)	Micélio seco (g/100ml de vinhaça)	Rendimento total % (meio sintético)	Rendimento total % (vinhaça)
0	4,5	5,0	1,065	1,065	0,0925	0,1985		
12	4,4	5,2	1,030	1,661				
24	4,1	5,2	0,990	0,330				
36	3,9	5,6	0,910	0,072				
48	3,6	5,7	0,563	0,000				
60	5,0	5,7	0,210	0,000				
72	6,6	5,7	0,000	0,000				
96	8,1	5,7	0,000	0,000	0,440	1,5242	41,35	61,98

Tabela 2 - Composição centesimal dos micélios de *Morchella crassipes* desenvolvidos em meio sintético (11) e vinhaça

Composição centesimal (em peso seco)	Micélio desenvolvido em meio sintético %	Micélio desenvolvido em vinhaça %
Unidade	7,64	8,46
Cinzas	25,42	18,79
Lipídios	7,94	9,40
Fibra	2,48	5,31
Proteína	43,84	26,34
Fração Nifext	12,68	31,70

O micélio desenvolvido em meio sólido (tubos de ágar extrato de malte com 5% de glicose inclinado, medindo 2x20cm de diâmetro), é raspado da superfície com uma espátula estéril e levado a um desintegrador contendo água destilada estéril (100ml para cada 5 tubos). O material foi finamente triturado em alta rotação (3500rpm) durante dois minutos. Em seguida, com auxílio de uma pipeta estéril de ponta larga, transfere-se 10ml do micélio desintegrado para frascos aerados contendo 300ml de meio, sintético ou vinhaça. Uma intensa massa micelial é desenvolvida e esta é levada ao desintegrador de forma similar ao descrito anteriormente, a qual servirá de inóculo para o fermentador.

Fermentação - A fermentação transcorreu nas seguintes condições: 1 litro de ar/litro de meio/minuto, temperatura de 25°C, agitação 800rpm, pH 4,5 para meio sintético e 5,0 para a vinhaça. A quantidade de inóculo utilizada neste experimento foi da ordem de 0,5% do volume total do meio (300ml/6000ml de meio). A vinhaça utilizada foi esterilizada a 121°C durante 15 minutos e resfriada à 25°C, quando então foi suplementada com uma solução de uréia a 20% (15ml/litro de vinhaça). Os experimentos foram realizados em fermentador construído na Universidade Federal de Santa Catarina. O referido fermentador dispõe de controle de temperatura, de pH, de agitação e do volume de ar incorporado.

Métodos analíticos - O pH foi determinado através de um potenciômetro Methrom Herisau, os açúcares redutores totais (expressos como glicose) segundo Somogy (23). Na massa micelial desidratada foram feitas as seguintes análises: umidade, cinzas, fibra, lipídios, segundo as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (11), o nitrogênio total foi determinado pelo método da Association of Official Agricultural Chemists (1), cuja multiplicação pelo fator 6,25 nos fornece a proteína. A fração nitrogenada não protéica (NIFEXT) foi obtida pela diferença das demais frações em relação a 100g do produto.

Discussão dos Resultados

Na Tabela 1 observa-se o comportamento do pH durante o crescimento do micélio de *M. crassipes* em meio sintético e vinhaça. No meio sintético ocorre na queda do pH de 4,5 (inicial) até 3,6 nas primeiras 48 horas de fermentação. Na vinhaça uma característica bem diferente foi observada, o pH apresentou um aumento constante de 5,0 até 5,7 onde a partir de 48 horas de fermentação não ocorre mais variação (formação de platô). A queda do pH observado no crescimento do micélio em meio sintético pode ser explicada devido à degradação da glicose à ácido glucônico pelas enzimas presentes nesta espécie (9).

Já o aumento pode ser explicado de duas formas distintas, quando a uréia apresenta-se como a única fonte de nitrogênio: a primeira refere-se à capacidade do micélio em transformar a uréia excedente de suas necessidades nutricionais em amônia, a segunda está relacionada com a autólise do micélio e consequente liberação de proteínas, aminoácidos básicos e amônia (16, 17).

Com relação ao consumo de açúcares redutores totais, o comportamento foi similar em ambos os meios, diferindo apenas no tempo em que houve o esgotamento do mesmo. No meio sintético os açúcares redutores totais foram totalmente consumidos em 72 horas de fermentação, enquanto que na vinhaça demorou apenas 48 horas.

Analisando os dados apresentados na Tabela 1, observa-se que o micélio produzido em vinhaça apresentou um rendimento de 61,98% (pelo seco), enquanto que o obtido em meio sintético foi apenas 41,31%. Com base nos resultados citados na literatura com diversas espécies de fungos superiores (2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 16, 17) sugere-se que o principal fator que influencia na produção de micélio é a relação carbono:nitrogênio presente no meio de cultura. A relação utilizada neste trabalho foi 8,7:1 em meio sintético e 12,4:1 na vinhaça. O micélio desenvolvido em vinhaça apresentou melhor rendimento embora a quantidade inicial de inóculo ter sido diferente. Isto provavelmente deve-se a uma relação C:N mais adequada.

A Tabela 2 apresenta a composição centesimal (peso seco) do micélio de *M. crassipes* desenvolvido em meio sintético e vinhaça. Os valores obtidos em ambos os meios são similares com exceção do teor de proteína, que para o micélio obtido em meio sintético foi de 43,84% enquanto que em vinhaça apresentou apenas 26,34%. O inverso ocorreu com a fração nifext, o micélio obtido em vinhaça apresentou 31,7% de fração nitrogenada não protéica enquanto que em meio sintético apenas 12,68%.

Conclusões

1. A vinhaça pode ser utilizada como substrato para produção de micélio de cogumelos desde que, seja enriquecido com substâncias que fornecam nitrogênio necessário à elaboração de proteínas pela espécie em questão.
2. O micélio cresce em várias faixas de pH, sendo este característico para cada espécie frente a um determinado meio de crescimento.
3. O melhor rendimento (produção de micélio) foi obtido com vinhaça.
4. O aroma desenvolvido no micélio produzido em meio sintético e vinhaça não corresponderam aos dados citados na literatura.

Agradecimentos

Os autores agradecem a FINEP pelo apoio financeiro.

Referências Bibliográficas

1. Association of the Official Agricultural Chemists - A.O.A.C. - Official methods of analysis. 13.ed. Whashington, 1980.
2. Block, S.S. - Mushroom mycelium: experiments with submerged culture. Agricultural and Food Chemistry, 1:890-893, 1953.
3. Block, S.S. - Developments in the production of mushroom mycelium in submerged culture. J. Bioch. and Microb. Tech. and Engin., 2:243-253, 1960.
4. Dijkstra, F.I.; Overbeck, R.C. & Davidson, R.S. - Factors affecting the growth of morel mushroom mycelium in submerged culture. J. Agric. Food Chemistry, 11:158-162, 1963.
5. Eddy, P.D. - Production of mushroom mycelium by submerged cultivation. J. Food Science and Agric., 9:644-649, 1958.
6. Falange, H. - Production of mushroom mycelium as a protein and fat source in submerged culture in medium of vinasse. Appl. Microbiol., 10:572-576, 1962.
7. Ghosh, A.K. & Segupta, S. - Studies on biochemistry of higher fungi. II - Submerged growth of a few mushroom in syntetic media. J. Food Science and Technol., 15:237-242, 1978.
8. Ghosh, A.K. & Segupta, S. - Influence of some growth factors on the production of mushroom mycelium in submerged culture. J. Food Science and Tecnol., 19:57-60, 1982.
9. Haehn, H. - Bioquímica de los fermentaciones. Madrid, 1956.
10. Humfeld, H. & Sugihara, T.F. - Mushroom mycelium production by submerged propagation. Food Technol., 355-356, 1949.

11. Instituto Adolfo Lutz - Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 2.ed. São Paulo, 1976.
12. Klieman, A.M. - Secondary spores in the mycelium of the cultivated mushroom, *Psalliota campestris* Fr. Am. J. Botany, 29:304-308, 1942.
13. Litchfield, J.H.; Overbeck, R.C. & Davidson, R.S. - Factors affecting the growth of morel mushroom mycelium in submerged culture. J. Food Chemistry and Agric., 11:153-162, 1963.
14. Litchfield, J.H.; Vely, V.G. & Overbeck, R.C. - Nutrient content of morel mushroom mycelium: amino acid composition of the protein. J. Food Science, 28:741-743, 1963.
15. Litchfield, J.H. - Nutrient content of morel mushroom mycelium: B-vitamin composition. J. Food Science, 29:690-691, 1964.
16. Litchfield, J.H. - Submerged culture of mushroom mycelium. In: - Peppler, H.J., ed. - Microbial technology. New York, p.144-170, 1967.
17. Litchfield, J.H. - Submerged culture of morel mushroom mycelium. Food Technol., 21:159-161, 1967.
18. Litchfield, J.H. - Morel mushroom mycelium as a food flavoring material. Biotech. and Bioengin., 9:289-304, 1967.
19. Litchfield, J.H. - The production of fungi. In: - Mateles, R.J. & Tennenbaum, S.R., eds. Cambridge, Mit Press, p.309-329, 1968.
20. Litchfield, J.H. - Production of single-cell protein for use in food or feed. In: - Peppler, H.J. & Pelman, D., eds. 2.ed. New York, Academic Press, p.109-146, 1969.
21. Martin, A.M. - Submerged production of *Agaricus campestris* mycelium in prot extracts. J. Food Science, 48:206-207, 1983.
22. Olson, B.H. & Johnson, N.J. - Factors producing high yeast yields in synthetic media. J. Bacteriol., 57:235-246, 1949.
23. Somogyi, M. - A new reagent for the determination of sugar. J. of Biol. Chemistry, 160:61-69, 1945.
24. Sugihara, T.F. & Humfeld, H. - Submerged culture of the mycelium of various species of mushroom. Appl. Microbiol., 2:170-172, 1954.

**UTILIZAÇÃO DE SUB-PRODUTOS DA INDÚSTRIA ALCOOLEIRA NA
OBTENÇÃO DE BIOMASSA DE SPIRULINA MAXIMA. PARTE II - EMPREGO
DO RESÍDUO DA DESTILAÇÃO DO MOSTO FERMENTADO (VINHAÇA)***

Carlos Augusto Montenegro Ferraz

Eugenio Aquarone

Margareth Krauter

Deptº de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP

Caixa Postal 30786

01051 São Paulo SP, Brasil

Waldemaro Balloni

& Gino Florenzano

Centro di Studio dei Microrganismi Autotrophi do CNR

Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica

Università di Firenze

Piazzale delle Cascine, 27

Firenze Italia

Resumo

Em laboratório, com luz artificial, o emprego de resíduo da destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar (vinhaça), como fonte de nutrientes para *Spirulina maxima*, resultou em crescimento comparável ao verificado em culturas de referência, crescidas em meio mineral definido. A carga orgânica inicial (500mg O21-1 de DB05) sofreu redução de até 95% e de até 74% na DQO, após quatro dias de cultivo.

Summary

Utilization of by-products from alcoholic fermentation industry to biomass production of Spirulina maxima. Part II - Use of molasses alcohol distillate waste

At laboratory scale and under artificial light, the utilization of molasses alcohol distillate waste as nutrient source to *Spirulina maxima* yield a similar growth of the cyanobacterium as compared to control cultures. Simultaneously at the fourth growth day there was a reduction of 95% in the BOD (biochemical oxygen demand) and 74% in the COD (chemical oxygen demand).

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

Introdução

A indústria açucareira teve sempre um papel importante na economia brasileira, obtendo durante o século XVII praticamente o monopólio mundial da produção. Mas, a partir do desenvolvimento da cana-de-açúcar na América Central e da beterraba na Europa, a produção declinou sensivelmente passando a atender quase exclusivamente o mercado interno até o inicio do século XX. O interesse na produção em larga escala retornou a partir da crise do petróleo em 1973, quando o etanol, que era um subproduto da indústria açucareira, passou a ser acrescentado à gasolina (5% V/V), poupando divisas na importação do petróleo. A porcentagem da mistura foi sendo aumentada progressivamente, acompanhada por modificações tecnológicas na indústria automobilística. Atualmente a maior parte dos automóveis novos comercializados no Brasil, utiliza exclusivamente etanol como combustível (7, 15).

A safra de 1982/1983 forneceu 171×10^6 ton. de cana-de-açúcar, representando $9,5 \times 10^6$ ton. de açúcar e 5×10^9 litros de álcool etílico. Após a colheita, lavagem, moagem, clarificação do mosto e evaporação, obtém-se o açúcar cristalizado. O melão, resultante da produção do açúcar, apresenta cerca de 55% de açúcares fermentáveis e normalmente é diluído com água, até a concentração de 20°Brix, antes da fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae*. Após a fermentação alcoólica obtém-se um mosto fermentado, com cerca de 7,5% de álcool, separando-se as leveduras por centrifugação. O álcool é então destilado e retificado até a concentração aproximada de 96°GL. Para misturar à gasolina, o álcool é desidratado até à obtenção de álcool anidro (-99,7% álcool/peso).

O principal efluente, que fica na fabricação do álcool, é o resíduo da coluna de destilação, denominado restilo ou vinhaça. Normalmente, produz-se de 12 a 13 litros de vinhaça por litro de etanol destilado, resultando, da safra 1982/1983, cerca de $6,0 \times 10^10$ litros de vinhaça. Este resíduo é altamente poluente, com elevados teores de DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) e DQO (Demanda Química de Oxigênio) se comparado ao obtido com resíduos amiláceos, conforme Tabela 1 (8, 10).

Deve-se levar em consideração que as características desse resíduo são influenciadas não apenas pelas condições de fabricação adotadas em cada usina, mas além disto pela disponibilidade de água.

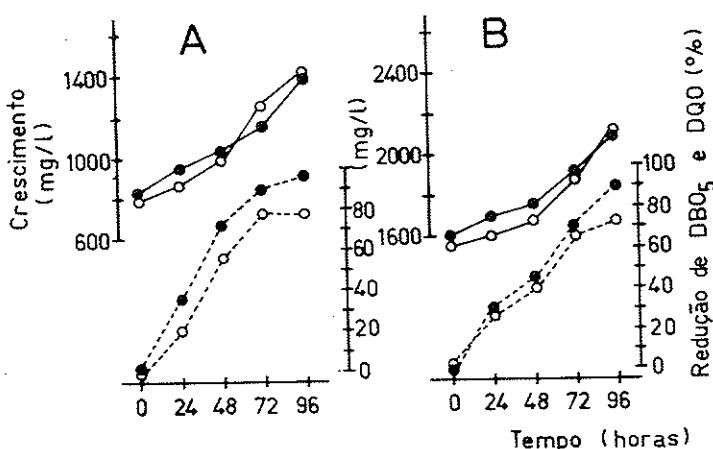
Existem diversos métodos de utilização de vinhaça. Os físicos preconizam a evaporação, com consequente concentração dos nutrientes, servindo como fertilizante agrícola. Os métodos biológicos são geralmente do tipo anaeróbico, uma vez que o objetivo principal é a redução da carga poluente, com simultânea obtenção de sub-produtos úteis, como gás metano, oriundo da biodigestão de restilo. Devido ao enorme volume de tal resíduo parece útil a busca de diferentes aplicações para o mesmo que, em conjunto, minimizem significativamente o problema poluente. Como o Brasil é um país com médias climáticas elevadas, alta incidência de radiação solar, amplo território e abundância de mananciais de água potável, pensou-se no emprego de vinhaça como fonte de nutrientes para obtenção de biomassa, de origem fotossintética. A cultura maciça de microalgas, bactérias fotossintéticas e cianobactérias tem sido motivo de estudo desde a década de 1950, principalmente nos EUA, Japão, Israel e Itália, visando a obtenção de biomassas de elevado valor nutricional, a partir de substratos economicamente convenientes (1, 3, 5, 8, 9, 13).

O programa de colaboração internacional em curso, a nível de CNR e CNPq, entre o Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Universidade de São Paulo e o Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi dell' Università di Firenze, prevê o emprego de microrganismos fotossintéticos anoxigênicos (bactérias da família *Rhodospirillaceae*) e oxigênicos (cianobactérias do gênero *Spirulina*), na depuração de tais resíduos para obtenção de águas depuradas e produção de biomassa com elevado conteúdo protéico, para ração (4, 6, 12).

O presente trabalho, realizado no Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi di Firenze (Itália), contém os resultados obtidos em laboratório com luz artificial, com o emprego de vinhaça, como fonte de nutrientes, para a cultura de *Spirulina maxima*.

Figura 1 - Crescimento de *Spirulina maxima* em vinhaça (resíduo da coluna de destilação) em relação ao crescimento em meio mineral.

Símbolos: o---o = Redução de DQO (%); •---• = Redução de DBO₅ (%); •—• = Crescimento em vinhaça; o—o = Crescimento em meio mineral



Material e Métodos

Spirulina maxima 4mX, da coleção do Centro di Studio dei Microrganismi Autotrophi, Firenze, Itália (Figura 6), foi cultivada em meio mineral próprio (3, 4).

A vinhaça foi fornecida pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo, Brasil, apresentando: DBO₅ - 24.000mg O₂^{l-1}, DQB - 34.000mg O₂^{l-1}, nitrogênio (K-jeldhal) - 3,1g l⁻¹ e pH 4,5. Foi feita a clarificação, antes do uso nas culturas fotossintéticas, pela adição de cloreto de sódio (10g l⁻¹) e hidróxido de sódio (40% M/V), até atingir pH 12,0. Com isto, o material orgânico em suspensão floacula e se precipita, obtendo-se um sobrenadante com redução aproximada de 50% na DBO₅. A quantidade inicial de vinhaça utilizada nos experimentos era tal que fornecesse 500mg O₂^{l-1} de DBO₅.

Figura 2 - Crescimento de *Spirulina maxima* com vinhaça (resíduo da coluna de destilação) e meio mineral

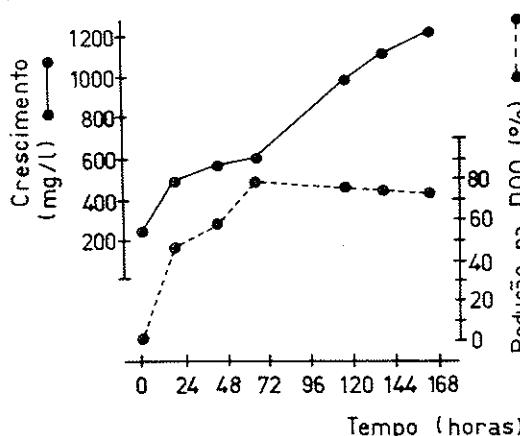


Figura 3 - Crescimento de *Spirulina maxima* com vinhaça (resíduo da coluna de destilação)

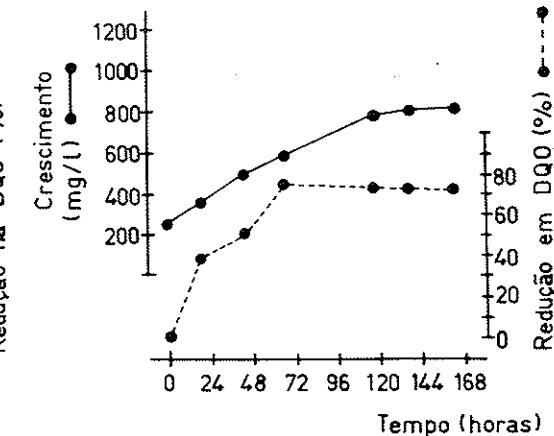
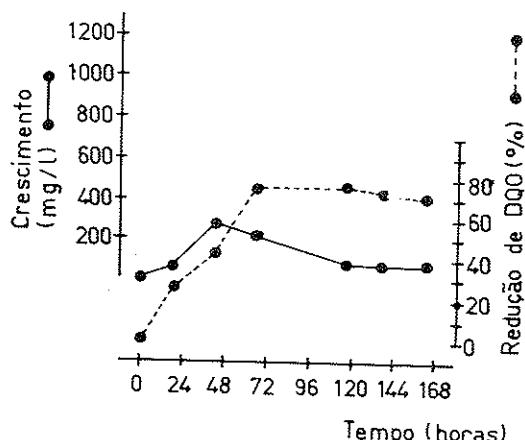


Tabela 1 - Composição química do resíduo da destilação da fermentação alcóolica do melaço de cana-de-açúcar (vinhaça) (11)

Parâmetro	Resíduo da destilação (vinhaça)
pH	3,8 - 5,0
Sólidos totais (g l^{-1})	21 - 85
Sólidos dissolvidos (g l^{-1})	4 - 31
Oxigênio dissolvido (mg l^{-1})	zero
DBO ₅ (20°C) (mg l^{-1})	13.000 - 26.000
DQO (dicromato) (mg l^{-1})	15.000 - 37.000

Figura 4 - Depuração da vinhaça (resíduo da coluna de destilação) pelo crescimento heterotrófico



Condições de cultivo - Todos os experimentos foram executados em tanques abertos (Figura 5) de $0,13\text{m}^2$ e $6,5\text{l}$ de capacidade. A cultura era mantida a 5cm, pela adição de água destilada, a fim de repor as perdas ocasionadas pela evaporação. A circulação da cultura era mantida por pás rodantes, com frequência de 15 ciclos/minuto. A temperatura do sistema foi mantida $30 \pm 1^\circ\text{C}$, sob iluminação constante, com lâmpadas incandescentes (1000W) que forneciam, na superfície do líquido, cerca de $100\text{m E s}^{-1}\text{m}^{-2}$ (P.A.R.).

Avaliação do crescimento - A biomassa foi coletada por filtração (Sartorius^R 8 μm de diâmetro), lavada duas vezes com solução de cloreto de sódio (2,5%) e, em seguida, com água destilada, para remoção dos sais. A amostra era então secada, até peso constante, em estufa a 105°C .

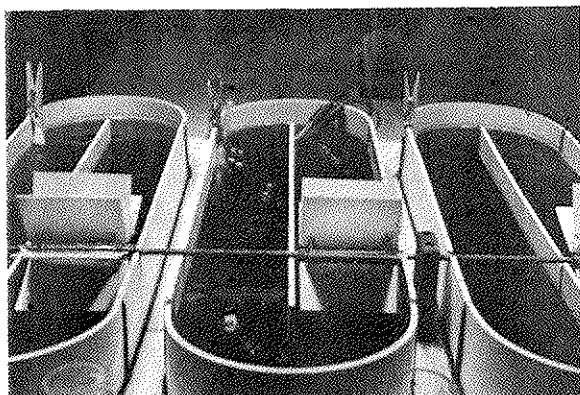
Medidas da carga orgânica - A DBO₅ foi feita pelo método da incubação a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ por 5 dias e a DQO executada pelo método do dicromato (11).

Correção do pH - Nos tanques contendo apenas meio mineral, para referência, a correção do pH foi feita pelo acréscimo de anidrido carbônico. Nos tanques com vinhaça, a correção do pH foi feita pelo acréscimo de ácido mineral (HCl 1N). Em ambos os sistemas manteve-se o pH entre 9,5 e 10,0 (3).

Resultados e Discussão

Os dados comparativos, ao crescimento de *S. maxima* em vinhaça e meio mineral, são fornecidos na Figura 1. A diferença entre os dois gráficos está na quantidade celular inicial, sendo 800mg l^{-1} na Figura 1A e de 1600mg l^{-1} na Figura 1B. O comportamento foi bastante semelhante nos dois casos, apresentando significativa redução na DQO, entre 70% e 75% e na DBO₅, entre 90% e 95%.

Figura 5 - Tanques abertos para cultivo de *Spirulina maxima*, de 0,13m² e capacidade de 6,5L



O crescimento, em presença de vinhaça, foi proporcional em meio mineral, embora não tivesse havido adição de anidrido carbônico, para correção do pH, indicando que a ação heterotrófica bacteriana foi suficiente para suprir os nutrientes limitantes.

Quando se utilizou inóculo menor (800mg l^{-1} - Figura 1A), a redução final de DBO₅ e DQO foi ligeiramente superior, provavelmente devida à menor formação de produtos extracelulares.

Spirulina maxima é uma cianobactéria fotoautotrófica que assimila poucos compostos orgânicos mais complexos (17). Portanto, a depuração da carga orgânica da vinhaça ocorre através da associação com bactérias heterotróficas, normalmente agregadas à superfície externa de *Spirulina*, ou presentes no meio. O material orgânico é convertido em anidrido carbônico e minerais, pela respiração bacteriana; o CO₂ e os minerais são fotoassimilados pela cianobactéria, gerando oxigênio, utilizado pelas bactérias (cocos e bacilos gram positivos) na oxidação dos substratos orgânicos.

Deste processo interativo já estudado em lagoas de oxidação (9, 14, 16) resulta uma biomassa de qualidade superior, com simultânea utilização do resíduo poluente.

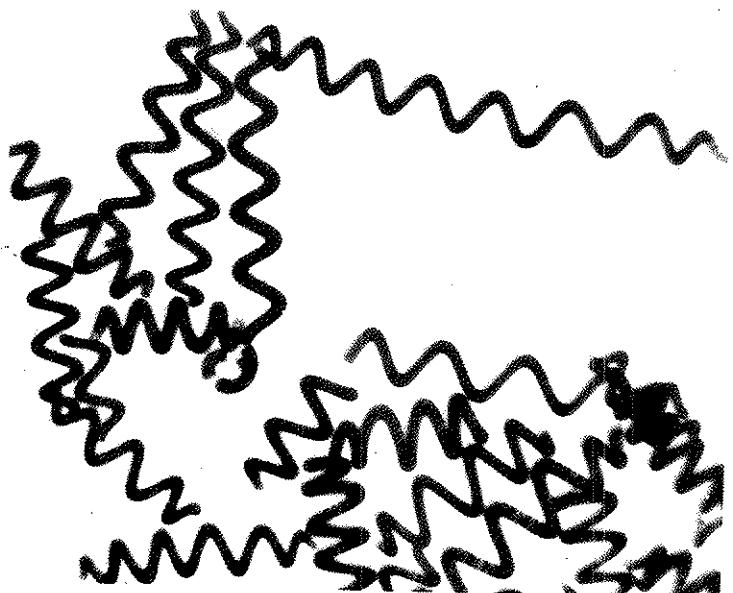
Prosseguindo com os experimentos, a fim de se verificar a influência de carbonato e bicarbonato em associação com vinhaça, no crescimento de *S. maxima*, o resíduo foi diluído com meio mineral. Os dados correspondentes estão nas Figuras 2 e 3. Enquanto o processo depurativo ocorre (72h iniciais), o crescimento de *S. maxima* é constante, passando a declinar devido à diminuição da mineralização dos compostos orgânicos. Na presença de meio mineral o crescimento de *S. maxima* e a redução da DQO foram semelhantes aos obtidos com vinhaça. Isto indica que a assimilação das fontes de carbono não foi limitante no processo interativo com as bactérias, mesmo quando a redução da DQO se estabiliza; observa-se continuidade do crescimento celular, mantido, desta feita, pelo "pool" de HCO₃⁻ e CO₃⁼.

Para avaliar a participação heterotrófica, no processo depurativo, utilizou-se um tanque contendo vinhaça, na ausência de meio mineral e sem inóculo de *S. maxima*. Como inóculo, utilizou-se o filtrado (membrana celulósica de 0,45mm de porosidade) de uma cultura de *S. maxima*, crescida em meio mineral. Com isto, separou-se uma parte das bactérias que normalmente estão associadas a cianobactérias. O volume de cultura filtrado foi dez vezes superior ao utilizado para inocular os experimentos anteriores. Admitiu-se que apenas 1/10 das bactérias heterotróficas, associadas à camada mucilaginosa, que envolve *S. maxima*, passaria para o filtrado. Os dados estão na Figura 4, observando-se nítido aumento da população bacteriana até cerca de 36h, passando a declinar, paralelamente à estabilização da redução de DQO.

Conclusões

Os resultados obtidos deverão ser confirmados em planta piloto e em condições naturais de luz e temperatura no Brasil. Todavia, demonstram ser possível o emprego da vinhaça diluída e clarificada, como fonte de nutrientes, para a obtenção econômica de biomassa de *S. maxima*, dando-se uma destinação nobre a um resíduo altamente poluente.

Figura 6 - *Spirulina maxima*, 4mX, da coleção do Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi, Firenze, Italia



Referências Bibliográficas

1. Akiba, T.; Fukinbara, T. & Have, E. - Algal treatment of molasses alcohol distillate waste. *J. Ferment. Technol.*, 45:637-642, 1967.
2. Balloni, W.; Florenzano, G. & Materassi, R. - Lineamento di un nuovo metodo di trattamento biologico degli effluenti di zuccherificio. *L'Industria Saccarifera Italiana*, 6:137-144, 1976.
3. Balloni, W.; Materassi, R.; Filpi, 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.
4. Ferraz, C.A.M.; Aquarone, E.; Florenzano, G.; Balloni, W. & Tredici, M. - Utilização de sub-produtos da indústria alcooleira na obtenção de biomassa de *Spirulina maxima*. Parte I - Emprego do anidrido carbônico. *Rev. Microbiol.* (S. Paulo), 16:179-187, 1985.
5. Florenzano, G. & Materassi, R. - La coltura delle microalghe come processo di sintesi di proteine. In: - Atti del VII Simposio Internazionale di Agrochimica sur la Sintesi Biologica delle Proteine, Salamanca, 1968.
6. Florenzano, G. - Le proteine delle microalghe a destinazione alimentare. *Riv. It. Sost. Grasse*, 52:11, 1975.
7. Jackson, E.A. - Brazil's national alcohol programme. *Process Biochem.*, 11:29-30, 1976.
8. Kosaric, N.; Nguyen, H.T. & Bergougnon, M.A. - Growth of *Spirulina maxima* algae in effluents from secondary waste-water treatment plants. *Biotechnol. Bioeng.*, 16:881-896, 1974.
9. Materassi, R. & Tomaselli, L. - I processi algali nel riciclo fotosintetico dei rifiuti. In: - Atti XIX Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia. Catania, 5-8 giugno, 1980.
10. Monteiro, C.E. - Brazilian experience with the disposal of waste water from the sugar cane and alcohol industry. *Process Biochemistry*, 10:33-41, 1975.
11. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry. 12.ed. Washington, William Horwitz, 1980.
12. Oron, G.; Shelef, A. & Levi, A. - Growth of *Spirulina maxima* on cow-manure wastes. *Biotechnol. and Bioeng.*, 21:2169-2173, 1979.

13. Oswald, W.J. - Complete waste treatment in ponds. In: - Prog. 6th Int. L. Water Poll. Res. Conf., 1972.
14. Paoletti, C.; Vicenzini, M.; Bocci, F. & Materassi, R. - Composizione biochimica generale delle biomasse di *Spirulina platensis* e *Spirulina maxima*. In: - Atti del Convegno di Prospettive della coltura de *Spirulina* in Itália. Firenze, 1980.
15. Shalef, G.; Moraine, R.; Meydan, A. & Sanbank, E. - Combined algae production waste-water treatment and reclamation systems. In: - Microbial energy conversion. London, Pergamon Press, 1977.
16. Silvestrini, G. - Brazile: zucchero amaro. Qual Energia, 6:61, 1983.
17. Tomaselli, L. Pelosi, E. & Paoletti, C. - Fotoassimilazione di composti organici in *S. platensis* e *S. maxima*. In: - Atti del XVIII Congresso Nazionale della Società Italiana de Microbiologia, Fiuggi Terme, 1978.

**TYPIFICATION OF RHODOCOCCUS (CORYNEBACTERIUM) EQUI FROM
BOVINE, OVINE AND CAPRINE SOURCES**

Paulo Fernando de Almeida

Centro Nacional de Pesquisas de Caprinos
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Caixa Postal 10
62100 Sobral CE, Brasil

Jair Vicente de Oliveira
& Celina Missae Hayashi

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Cidade Universitária
79100 Campo Grande MS, Brasil

Summary

There exists considerable discrepancy in the literature as to the most important biochemical and colonial morphological criteria to be used for the identification of *Rhodococcus equi*. In the present study using *R. equi* from non-equine sources, we found the most important criteria for identifying this organism to be synergistic hemolytic reactions with beta toxin of *S. aureus* and with the organisms *L. monocytogenes*, *C. pyogenes* and *C. pseudotuberculosis*.

Resumo

Tipificação de *Rhodococcus (Corynebacterium) equi* de origem bovina, ovina e caprina

Existe considerável discrepância na literatura com relação aos principais critérios bioquímicos e de morfologia das colônias empregados para a identificação do *Rhodococcus equi*. Utilizando cepas de *R. equi* de origem bovina, ovina e caprina, concluímos que os critérios mais importantes para a identificação destas cepas foram as reações de hemólise sinérgica observadas com a toxina beta de *S. aureus* e com os organismos *L. monocytogenes*, *C. pyogenes* e *C. pseudotuberculosis*.

Corynebacterium equi has been described since 1923 as the etiologic agent of foal pneumonia. Only recently however, has *R. equi* been isolated from individual cases as a pathogen in other species, e.g. caprine (Whitford, H.W. & Jones, L.P. - S. West Vet., 27:261-262, 1974) cattle (Almeida, P.F. & col. In: - Resumos do XIX Cong. Bras. Med. Vet., Belém, 1984; Woolcock, J.B. & Rudduck, H.B. - Aust. Vet. J., 49:319, 1973), sheep (Roberts, D.S. - Aust. Vet. J., 33:21, 1957) and in humans (Golub, B.G. & col., Ann. Intern. Med., 66:1174-1177, 1967).

Criteria for identifying this organism has been somewhat less than satisfactory as reflected in the recent change of names from *Corynebacterium equi* to *Rhodococcus equi* (Goodfellow, M. & Alderson, G. - J. Gen. Microbiol., 100:99-122, 1977). There exists discrepancies in the literature as to the most important criteria adopted for laboratory identification of this organism. Although nitrate reduction has been suggested as a useful criteria (Multimer, M.D. & Woolcock, J.B. - Vet. Microbiol., 6:331-338, 1981) for example, there seems to be both nitrate negative (Whitford, H.W. & Jones, L.P. - S. West Vet., 27:261-262, 1974) as well as nitrate positive (Morse, E.V. - Cornell Vet., 40:49-55, 1950) strains. Similarly, various authors have reported the occurrence of both urease positive (Marsh, J.C. & von Graevenitz, A. - Cancer, 32:147-149, 1973) as well as urease negative strains (Whitford, H.W. & Jones, L.P. - S. West Vet., 27:261-262, 1974). Also, depending on the methodology used both hydrogen sulfide producing and non-producing *R. equi* have been described (Barton, M.D. & Hughes, K.L. - Vet. Bull., 50:65-80, 1980). Whether these variations represent different biotypes or are reflective of the species from which the organism originated is not yet known.

The objective of this paper was to study biochemical and cultural characteristics as well as synergistic hemolytic reactions of *R. equi* with beta toxin of *S. aureus* and with the organisms *L. monocytogenes*, *C. pyogenes* and *C. pseudotuberculosis*.

Bacterial strains of *R. equi* were isolated from three cases of bovine omphalophlebitis, one case of bovine matitis, one case of ovine lymphadenitis and one case of caprine pneumonia. All bacterial strains were cultured in brain heart broth (Difco) and incubated aerobically at 37°C for 24 hours. Identification of *R. equi* was based on morphological, cultural, biochemical and hemolytic synergistic reactions using standardized bacteriological procedures. The following biochemical tests were performed as outlined by Carter (Carter, G.R. - Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology, 4.ed., USA, Charles C. Thomas, chap. 21, 1984): catalase, oxidase, nitrate reduction, glucose oxidation, hydrogen sulfide and indol production using sulfide indol motility medium, urease (Urea broth base - Oxoid or urea agar base-Difco, supplemented with filter sterilized urea solution to a final concentration of 2%). Proteolytic activity was studied using Loefflers'medium, casein agar and nutrient gelatin. Synergistic hemolytic reactions were performed by streaking the suspect *R. equi* at right angles and through the following: beta toxin of *S. aureus*, or colonial streak growth of *L. monocytogenes*, *C. pyogenes* and *C. pseudotuberculosis* on blood agar base containing 5% sheep erythrocytes. Positive synergistic reactions were identified as areas of increased hemolytic activity (Fraser, G. - J. Path. Bact., 88:43-53, 1964).

Morphologically, all strains were Gram positive, nonmotile and coccoid to coccobacillus type organisms. Colonies of all strains were mucoid, coalescent, nonhemolytic and developed a pink pigment. This pink pigment was especially observable when starch agar was used. Biochemically all strains were catalase positive, oxidase negative, and did not produce H₂S and indol, lacked proteolytic activity and failed to oxidize glucose. All four bovine strains were nitrate negative and urease positive. In contrast, the ovine and caprine strains were nitrate positive and urease negative. All strains potentiated hemolysis produced by the beta toxin of *S. aureus* as well as participated in synergistic hemolysis with *L. monocytogenes*, *C. pyogenes* and *C. pseudotuberculosis*.

Various authors have described considerable variations in the colonial morphology of *R. equi*, which are thought to be due to either colonial dissociation with development of rough variants (Jensen, H.L. - Proc. Linn. Soc. N.S.W., 59:19-61, 1964) or due to differences in culturing methods (Barton, M.D. & Hughes, K.L. - Vet. Bull., 50:65-80, 1980). In the present study, we found colonial morphology to be in accordance with the findings of Multimer & Woolcock (Multimer, M.D. & Woolcock, J.B. - Vet. Microbiol., 6:331-338, 1981) who observed only slight colonial variations.

Biochemically, these strains reacted to those of the literature (Multimer, M.D. & Woolcock, J.B. - Vet. Microbiol., 6:331-338, 1981), with several differences. The ovine and caprine strains were nitrate positive and all four bovine strains were negative even after 15 days of incubation. These negative tests were confirmed by attempts to reduce residual nitrate with zinc. Thus, similar to *C.*

pseudotuberculosis there seems to be nitrate positive as well as nitrate negative strains. Some authors (Multimer, M.D. & Woolcock, J.B. - Vet. Microbiol., 6:331-338, 1981) suggested that nitrate reduction should be used as a major criteria for the identification of *R. equi*. However, careful analysis of their work reveals strains of equine and non-equine origin which were nitrate negative. Furthermore, nitrate reduction has been recorded by others to be variable (Jensen, H.L. - Proc. Linn. Soc. N.S.W., 59:19-61, 1934) to negative (Woolcock, J.B. & Rudduck, H.B. - Aust. Vet. J., 49:319, 1973).

There also was a difference in the ability of these organisms to hydrolyse urea. Whereas the four bovine strains were urease positive the ovine and caprine strains were negative. Again various authors have noted variability in the ability of *R. equi* to hydrolyse urea (Natarajan, C. & Nilakantan, P.R. - Indian J. Anim. Sci., 44:329-333, 1974). Some authors have noted isolates which totally lacked the ability to hydrolyse urea (Lacerda, J.P.G. & Veiga, S.M., USP, 6321-327, 1959), whereas others reported isolates consistently positive for urease activity (Marsh, J.C. & von Graevenitz, A. - Cancer, 32:147-149, 1973).

A consistent finding with our *R. equi* isolates were their positive synergistic hemolytic reactions with beta toxin of *S. aureus* and with the organisms *C. pyogenes*, *Listeria monocytogenes* and *C. pseudotuberculosis*. It should be noted that we also found positive synergistic hemolytic reactions with strains of *L. monocytogenes* that were not hemolytic alone.

Although the incidence of *R. equi* infection in cattle, ovine and caprine is probably low the possibility of *R. equi* as a causative agent should not be overlooked. Proper bacteriological criteria need to be developed to identify its presence.

**LEPTOSPIRA BIFLEXA SOROTIPO RANARUM ISOLADO DE FETO ABORTADO
DE EQUINO**

Paulo H. Yasuda

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

Catherine R. Sulzer

FAO/WHO Collaborating Center for the Epidemiology of
Leptospirose
Centers for Disease Control
Atlanta Ga., USA

Waldir Giorgi
& Margareth E. Genovez Soares

Instituto Biológico de São Paulo
Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252
Caixa Postal 7119
01000 São Paulo SP, Brasil

Summary

Leptospira biflexa serovar ranarum isolated from aborted equine foetus

The isolation from an aborted equine foetus of serovar *ranarum*, belonging to the group of saprophytic leptospires is related. Probably this is the first isolation of this serovar from warm blood animal. Some taxonomic aspects of pathogenic and non pathogenic leptospires are discussed.

Resumo

É relatado o isolamento do sorotipo *ranarum*, pertencente ao grupo de leptospires saprófitas, de feto abortado de eqüino. Provavelmente é o primeiro isolamento dessa variedade sorológica a partir de um animal de sangue quente. Aspectos taxonómicos entre leptospires patogénicas e não patogénicas são discutidos.

Introdução

A leptospirose equina tem merecido pouca atenção tanto no exterior como entre nós (3, 4, 6, 11). Animais silvestres, suíos, bovinos e os cães têm sido objetos de estudos mais intensivos e constantes. Dos raros levantamentos soro-epidemiológicos em eqüinos, no Brasil, a prevalência é do sorotipo *pomona* (1, 9).

Na literatura, até 1973, são citados, nessa espécie, apenas 11 isolamentos de leptospires, todas elas patogénicas (4, 11). Em 1976, na Argentina, Myers (7) isolou, dos rins de 15 de 72 eqüinos abatidos em matadouro, três amostras patogénicas e 12 saprófitas. Pelo exposto, julgamos interessante relatar o isolamento do sorotipo *ranarum*, não patogénico (5) de um feto abortado de eqüino.

Tabela 1 - Resultados da soroaglutinação microscópica da amostra 84-48008 com alguns soros padrão da *Leptospira biflexa*

Antissoros	Título homólogo	Título 84-48008
semearanga	6.400	800
patoe	1.600	800
São Paulo	6.400	1.600
ranarum	6.400	3.200
codice	1.600	negativo

Material e Métodos

Isolamento - A leptospira foi isolada dos rins de feto equino, recém abortado, procedente do Município de Diadema, São Paulo. A técnica empregada foi a da obtenção de pequenos fragmentos de tecido renal pela punção com uma pipeta tipo Pasteur e posterior inoculação no meio de Fletcher (8).

Identificação sorológico - A identificação foi feita no Laboratório de Lepto-*spiro-*ses do "Center for Disease Control", Atlanta, Ga. USA, tendo recebido o número 84-48008 e seguiu a metodologia e critérios adotados e descritos por Sulzer & Jones (12).

Resultados

Os resultados da sorotipagem preliminar revelaram reações negativas contra os seguintes antissoros padrão: ballum, canicola, icterohaemorrhagiae, bataviae, grippotyphosa, pyrogenes, autumnalis, pomona, wolffi, australis, javanica, celledoni, djasiman, borincana, cynopteri, tarassovi, andamana, butembo, panama e shermani.

Tais resultados indicavam que a amostra 84-48008 não apresentava relação antigenica com os sorotipos da espécie *Leptospira interrogans*, ou seja, com o grupo das leptospires consideradas patogênicas. Uma segunda bateria composta de soros padrão da *L. biflexa*, não patogênicas, foi então utilizada (Tabela 1).

Após a sorotipagem preliminar a amostra 84-48008 foi submetida à absorção cruzada de aglutininas. Este teste revelou que a amostra tipada era semelhante ao sorotipo ranarum, ou seja, somente contra o ranarum a reação se comportou dentro dos critérios que definem os sorotipos de leptospires (12). Apresentamos na Tabela 2 os resultados dessa reação.

Discussão

Atualmente a família Leptospiraceae está constituída por apenas duas espécies: *L. interrogans*, com 172 sorotipos patogênicos, distribuídos em 19 sorogrupo e a *L. biflexa*, com 65 sorotipos saprófitos, em 38 sorogrupo (5).

Tabela 2 - Resultados da reação de absorção cruzada de aglutininas entre a amostra 84-48008 e o sorotipo ranarum

Antissoros	Tratados com	Antígenos	Título	% residual de aglutininas
84-48008	salina	84-48008	6.400	
84-48008	salina	ranarum	12.800	
ranarum	salina	ranarum	12.800	
ranarum	salina	84-48008	3.200	
84-48008	84-48008	84-48008	100	
84-48008	84-48008	ranarum	200	3,12
84-48008	ranarum	ranarum	400	6,25
84-48008	ranarum	84-48008	400	6,25
ranarum	ranarum	ranarum	100	
ranarum	ranarum	84-48008	100	0,78
ranarum	84-48008	84-48008	100	0,78
ranarum	84-48008	ranarum	100	0,78

O sorotipo *ranarum*, ora isolado, está classificado como saprófita. Embora não tenhamos maiores informações a respeito do presente, como dados clínicos e sorológico-s da mãe e histopatológicos de feto, não é possível concluir que ele tenha sido a causa do abortamento. No entretanto, o simples encontro desse sorotipo nos rins do feto nos leva a questionar os critérios laboratoriais utilizados para caracterizar as leptospiras em patogênicas e saprófitas. Reforçemos com os dados apresentados por Myers (7) que isolou 12 amostras saprófitas de eqüinos. Outros relatos envolvendo leptospiras não patogênicas foram feitos como o isolamento do sorotipo *andamana* de um caso humano, no Brasil (2) e de roedores, em Israel (10).

Um amplo estudo sobre a taxonomia de leptospiras, empregando a técnica de hibridização de DNA, demonstrou como complexa é a família *Leptospiraceae* (P.H. Yasuda, dados em publicação). Trabalhando com 38 sorotipos patogênicos, representativos dos 19 sorogrupo, pode-se distinguir sete grupos genéticos. Dentro dos critérios adotados na técnica de hibridização de DNA, cada um desses grupos genéticos poderá vir a se constituir em espécies diferentes de *L. interrogans*. Estudando, também, oito sorotipos de saprófitos, estes se distinguiram em seis outros grupos genéticos. Não houve homologia de DNA entre as leptospiras patogênicas e saprófitas. Tais resultados revelam, a nosso ver, a precariedade dos atuais critérios taxonômicos aplicados às leptospiras e, também, que o grupo das saprófitas parece ser muito mais complexo, geneticamente, do que *L. interrogans*, pois oito sorotipos saprófitos formaram seis grupos genéticos.

Referências Bibliográficas

1. Cordeiro, F.; Ramos, A.A. & Batista Jr., J.A. - Aglutininas antileptospira em soros de eqüinos de Minas Gerais. *Pesq. Agrop. Bras. Ser. Vet.*, 9:45-48, 1974.
2. Correa, M.O.A.; Hyakukate, S.; Natale, V.; Tiriba, A.C. & Galvão, P.A.A. - Leptospiroses humanas ainda não assinaladas no Brasil. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 6:71-74, 1964.
3. Correa, M.O.A. & Mearim, A.B. - Leptospiroses no Brasil: levantamento bibliográfico de 1917 a 1970. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 31:87-101, 1971.
4. Galton, M.M., ed. - Leptospiral serotype distribution lists according to host and geographic area. Atlanta, Ga., U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Center for Disease Control, 1966.
5. Johnson, R.C. & Faine, S. - Family II - *Leptospiraceae*. In: - Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore, Williams & Wilkins, 1984.
6. Mearim, A.B. & Correa, M.O.A. - Leptospiroses no Brasil: levantamento bibliográfico de 1971 a 1977. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 37:131-140, 1977.
7. Myers, D.M. - Serological studies and isolations of serotype hardjo and *Leptospira biflexa* strains from horses of Argentina. *J. Clin. Microbiol.*, 3:548-555, 1976.
8. Santa Rosa, C.A. - Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 1:97-109, 1970.
9. Santa Rosa, C.A.; Castro, A.F.P.; Silva, A.S. & Teruya, J.M. - Nove anos de leptospirose no Instituto Biológico de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 29/30:19-27, 1967/70.
10. Shenberg, E.; Lindenbaum, I.; Dikken, H. & Torten, M. - Isolation of a saprophytic leptospiral serotype *andamana* from carrier rats in Israel. *Trop. Geogr. Med.*, 27:395-398, 1975.
11. Sulzer, C.R., ed. - Leptospiral serotype distribution lists according to host and geographic area: July 1966 to July 1973. U.S., Atlanta, Ga., Department of Health, Education and Welfare, Center for Disease Control, 1975.
12. Sulzer, C.R. & Jones, W.L. - Leptospirosis: methods in laboratory diagnosis. U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Centers for Disease Control, 1980.

PSEUDOMONAS AERUGINOSA COMO AGENTE CAUSAL DE ABCESO EM SERPENTE (*Bothrops neuwiedi*)

Sofia Calixto

Seção de Venenos
Instituto Butantan
Av. Vital Brasil, 1500
05504 São Paulo SP, Brasil

Lucia Baldassi
Aurelia A.P. Moulin
& Marcio Hipólito

Seção de Bacteriologia Animal
Instituto Biológico
Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1252
04014 São Paulo SP, Brasil

Resumo

Ocorrência de abcesso bucal em serpente (*Bothrops neuwiedi*) mantida em cativeiro, que servia como doadora de veneno, causado por *Pseudomonas aeruginosa*. O fenômeno patológico verificou-se após a manobra de extração do veneno, motivado provavelmente, por solução de continuidade da mucosa oral, ocorrida durante o manejo. É destacada a importância deste agente bacteriano como causa de doenças em animais de sangue frio.

Summary

Pseudomonas aeruginosa as a causal agent of snake abscess

Occurrence of mouth abscess in a captive brazilian snake (*Bothrops neuwiedi*) used as a poison donator. The disease happened after the poison extraction, caused by an injury of the oral mucous membranes. The importance of this bacterium as a pathogen for cold blood animals is emphasized.

Introdução

Pseudomonas aeruginosa já foi considerada como o mais frequente agente gram negativo presente em serpentes portadoras de infecções na cavidade oral e interpretada como invasor oportunista (4).

Já foram relatadas manifestações clínicas variadas em processos patológicos registrados em serpentes, especialmente estomatites, broncopneumonias, septicemias e abcessos de localização diversa (11). Dentre os agentes responsabilizados pelos autores, destaca-se *Pseudomonas aeruginosa*.

Em inquérito anatopatológico realizado no Brasil (2) há referência a alterações das primeiras porções do aparelho digestivo verificadas em serpentes mantidas em cativeiro. Posteriormente (5), foi descrita uma epizootia que acometeu 70% de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*, determinando uma estomatite com lesão inclusiva das glândulas veneniferas e levando à morte, considerável número de animais.

O presente trabalho relata o aparecimento de abcesso que se desenvolveu na mucosa oral de uma serpente macho, adulto, proteroglifa, *Bothrops neuwiedi*, na região adjacente à presa do veneno, após a manobra rotineira de extração do veneno. No espaço de tempo de 48hs, o abcesso atingiu grandes proporções, chegando a comprometer todo o palato, a ponto de impedir que o animal pudesse fechar a fenda bucal.

Material e Métodos

Coletou-se, com auxílio de zaragatoa esterilizada, amostra de pus fluido e inodoro, de tonalidade amarelo-esverdeada, que foi semeado em placas contendo ágar sangue e ágar Mac Conkey, as quais foram incubadas à 37°C por 24hs, em estufa bacteriológica.

Do crescimento obtido, após a incubação, foram preparados esfregaços de várias colônias, corados pelo método de Gram. Concomitantemente, repicou-se as colônias para tubos contendo caldo simples, a partir dos quais, após incubações nas mesmas condições citadas, foram semeadas placas contendo ágar sangue e ágar cetrinide, pela suspeita de tratar-se de *Pseudomonas* e, incubou-se a 37°C por 24hs.

A identificação da espécie foi feita pelos testes de produção de piocianina, fermentação de salicina, sacarose, xilose, maltose, lactose, manita, glicose e amido; presença de urease, catalase e nitroreduktase além da produção de indol utilização do citrato, ornitina e arginina.

Resultados e Discussão

Observou-se crescimento e presença de coloração esverdeada nos tubos contendo caldo simples, que se apresentou solúvel em clorofórmio. Verificou-se a presença de catalase e ausência de urease. O citrato, a ornitina e arginina, foram utilizados. Não houve produção de indol e o nitrato foi reduzido a nitrito com produção de gás.

Diversos são os agentes bacterianos capazes de infringir danos a animais de sangue frio. De forma bastante frequente, a patogenicidade do gênero *Pseudomonas* assume aspectos de relevância, atingindo, não unicamente os répteis, mas também, com igual frequência, os peixes, moluscos e crustáceos (3, 6, 7, 8, 12).

Paralelamente, compromete também outras espécies aquáticas, inclusive as de sangue quente, como mamíferos marinhos. Nestes últimos, destaca-se a celulite cutânea com características supurativas graves, ocorridas em lesões marinhas das ilhas Galápagos (10). *Pseudomonas chlororaphis* foi citada como agente bacteriano de grande importância na patologia do pescado (7).

Entre algumas doenças comumente verificadas em enguias, crustáceos, peixes não salmonídeos criados em fazendas marinhas, foi destacada a presença de *Pseudomonas* (12), *Pseudomonas fluorescens* e *Edwardsiella tarda*, foram isoladas de tilápias que adoeceram em criação de escala comercial (8).

Sem dúvida, o confinamento imposto aos animais criados em cativeiros, seja em jardins zoológicos, serpenteários ou viveiros de finalidade exploratória comercial, favorece o surgimento de doenças, não só pelo simples confinamento e aglomeração populacional, mas principalmente porque as novas condições de vida artificial ficam marcadamente modificadas quando comparadas aos ecossistemas existentes nos "habitats" naturais para cada espécie.

Estes fatos já foram assinalados em patologias observadas em serpentes, com destaque para aspectos de "stress" ocasionados pelo cativeiro e pelo manejo intensivo a que são submetidos esses animais (2). Também foi assinalada que a simples variação de temperatura de água, já representa uma influência decisiva no surgimento de infecções não específicas em diversos tipos de peixes (3).

Considera-se que os representantes do gênero *Pseudomonas* podem ser encontrados como componentes da flora normal da cavidade bucal de serpentes e que devem ser considerados como agentes oportunistas (1, 4, 9). A epizootia (6) já descrita refere-se a animais de criadouros artificiais onde observou-se índices de mortalidade de até 100%. Entre os agentes causais e oportunistas *Pseudomonas fluorescens* assumiu papel de relevância (6).

Figura 1 - Aspecto da boca mostrando o aumento do volume no local do abscesso

A presente investigação evidencia que o manejo periódico, durante a extração do veneno, agiu como fator desencadeante do processo infeccioso, visto que as lesões da mucosa oral ocorreram com frequência após este tipo de manobra, estabelecendo uma porta de entrada para numerosos agentes bacterianos, componentes habituais da flora bucal, entre os quais os do gênero *Pseudomonas* têm papel destacado.



Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. Robert E. Weaver do "Center for Disease Control, Atlanta, Georgia, US", pela confirmação do diagnóstico.

Referências Bibliográficas

1. Andre, P.G.; Coney, D.A.; McGregor, D.; Roberts, R.J. & Young, H. - Acute haemorrhagic septicaemia in captive europeans eels (*Anguilla vulgaris*): a clinical and parasitological study. *Vet. Rec.*, 90:726-772, 1972.
2. Belluomini, H.E.; Saliba, A.M. & Abe, S.A. - Inquérito anatomo-patológico em serpentes dos gêneros *Crotalus* e *Bothrops* (serpentes, viperidae, crotalinae). *Mem. Inst. Butantan*, 40/41:123-12, 1976-1977.
3. Bisset, K.A. - The effect of temperature on non-specific infections of fish. *J. Path. Bact.*, 58:251-258, 1960.
4. Draper, C.S.; Walkert, R.D. & Lawer, H.R. - Patterns of oral bacterial infections in captive snakes. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 179:1223-1226, 1981.
5. Furlanetto, R.S.; Belluomini, H.F.; Iizuka, H. & Rosa, R.R. - Epizootis provocada por um bacilo difteroídeo em serpentes mantidas em biotério. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 10:139-143, 1979.
6. Gatti, R.; & Nigrelli, D.A. - Haemorrhagic septicaemia in cat fish: pathogenicity of the strains isolated and reproducibility of the disease. *Object Docum. Vet.*, 5:61-68, 1984.
7. Hatai, K.; Egusa, S.; Nakajima, M. & Chicahata, H. - *Pseudomonas chlororaphis* as a fish pathogen. *Bull. Jap. Sec. Scien. Fish*, 41:1203-1223, 1975.
8. Myashita, T. - *Pseudomonas fluorescens* and *Edwardsiella tarda* isolated from a desiseased tilapia. *Fish Pathol.*, 19:45-50, 1984.
9. Page, L.A. - Experimental ulcerative stomatitis in King snakes. *Cornel Vet.*, 51:258-266, 1961.
10. Rand, C.S. - Nodular suppurative cutaneous cellulitis in a Galapago sea lion. *J. Wildlife Dis.*, 11:325-329, 1975.
11. Soveri, T. - Observations of bacterial diseases of captive snakes in Finland. *Nord Veter.*, 36:38-42, 1984.
12. Stuart, N.C. - Diseases of farmed fish non-salmonids including eels and crustaceans. *Vet. Rec.*, 112:150-153, 1983.

DETECTION OF ANTITOXIN AGAINST THERMOLABILE (LT) ENTEROTOXIN OF *ESCHERICHIA COLI* IN PORCINE SERA, BY IMMUNE HAEMOLYSIS REACTIONS

Marlene Braide Serafim
Antonio F. Pestana de Castro
Isildinha A.G. Colli

Deptº de Microbiologia e Imunologia
Universidade Estadual de Campinas
Cidade Universitária
13100 Campinas SP, Brasil

& José R. Feitosa Brito

Centro Nacional de Pesquisas de Suínos e Aves
EMBRAPA
89700 Concórdia SC, Brasil

Summary

Samples of paired sera collected from 69 piglets of different litters were examined for the presence of *Escherichia coli* thermolabile (LT) enterotoxin antibodies by the passive immune haemolysis (PIH) and single radial immune haemolysis (SRIH) tests. Fifteen samples were negative in both tests whereas 47 did not show any increase in the LT-antitoxin levels. Seven paired sera presented some increase in the LT-antitoxin levels. The negative results obtained with 15 paired sera indicate a probable susceptibility of the respective piglets to infection by LT⁺ *E. coli* strains. The decrease of LT-antitoxin levels in most samples of paired sera suggest that antitoxin has been transmitted to the piglets via colostrum. Our findings show that immune haemolysis reactions may be used to evaluate the *E. coli* anti-LT passive humoral immunity among young piglets.

Resumo

Detectão de antitoxina contra a enterotoxina termo labil (LT) de Escherichia coli em soro de suínos, através de reações de imuno hemólise

Amostras de soros pareadas, coletadas de 69 leitões recém-nascidos, de diferentes leitegadas, foram examinadas quanto a presença de anticorpos anti-enterotoxina termolábil (LT) de *Escherichia coli*, pelos testes de imuno hemólise passiva (PIH) e imuno hemólise radial (SRIH). Quinze amostras foram negativas em ambos os testes enquanto 47 não mostraram nenhum aumento no nível de antitoxina LT. Sete amostras pareadas de soros apresentaram algum aumento no nível de anti-LT. Os resultados negativos obtidos com 15 soros pareados indicam uma provável susceptibilidade dos respectivos leitões a infecções por amostras de *E. coli* LT⁺.

A diminuição nos níveis de antitoxina LT em muitas das amostras de soros pareados sugere que esses anticorpos foram transmitidos via colostro. Nossos achados mostram que as reações de imuno hemólise podem ser usadas na avaliação da imunidade passiva humoral anti-LT de *E. coli* em suínos recém-nascidos.

Introduction

Strains of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) producing thermolabile (LT) enterotoxin are often involved as etiological agents of diarrhoea among pigs (7, 8, 9, 21, 23).

Several experiments, using "in vivo" models, with respect to the challenge of newborn piglets from vaccinated and unvaccinated gilts with LT positive ETEC have confirmed that protection of the offspring may be conferred by anti-LT (3) and K88 (17), K99 (13) and 987P (16) antibodies received from their mothers. Also, non-immune piglets develop specific antibodies against these virulence factors after natural infection (15, 24).

Taking these facts into consideration, it is obvious that the detection of LT antibodies in porcine paired sera should be extremely important not only as a means to evaluate the immune status of young newborn piglets as well as to make a retrospective diagnostic of colibacillosis by measuring serological conversion. As far as anti-LT detection is concerned, techniques using tissue culture assays (12, 24), microtiter radioimmunoassay (6) and neutralization of LT activity by the ileal loop assay (1, 18) have been often used. However, most of these tests are troublesome and require special facilities. Therefore, simple serological tests for detection of LT antitoxin such as those based on immunohaemolysis reactions are missing and have not yet been tried before with porcine sera.

In this paper, we present a comparison between the PIH and SRIH tests for the detection of LT antitoxin in samples of porcine paired sera.

Materials and Methods

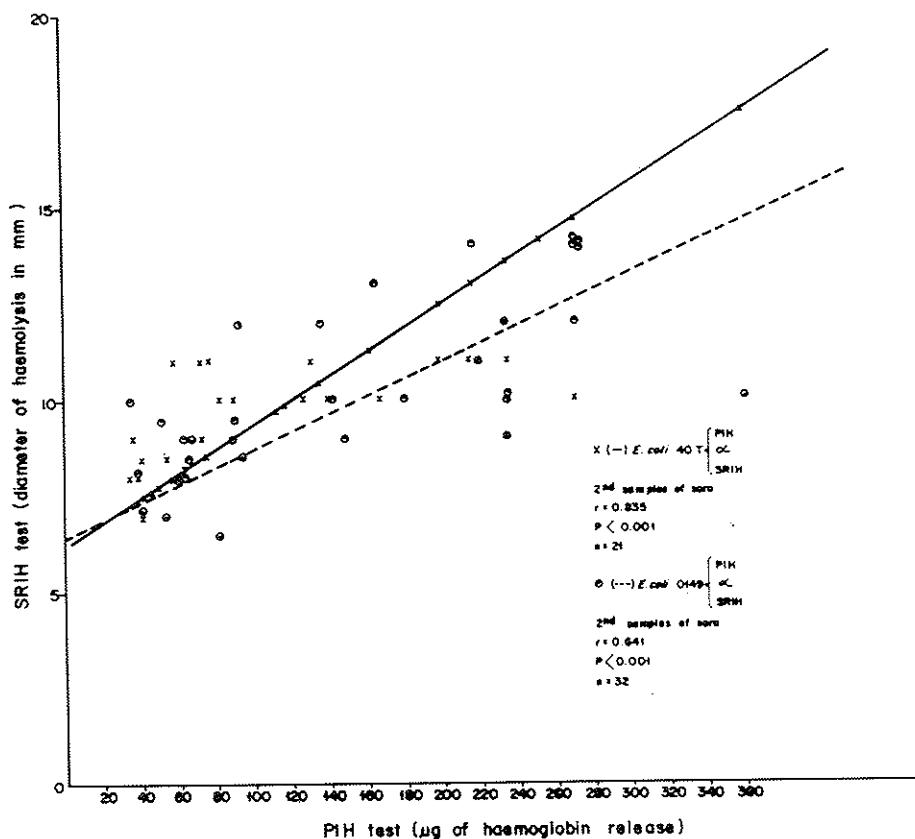
Sera - Samples of paired sera were collected from 69 piglets of different litters without evident diarrheal illness, taken from piggeries in the region of Concórdia, SC, Brasil. The first (1st) samples of sera were collected around the 10th day after birth and the second ones (2nd) 25 days later. After the addition of sodium azide (1:20000), the specimens were frozen and sent to our laboratory at Campinas, SP.

Absorption of sera - Samples of sera were diluted 1:4 in veronal buffered saline plus Ca and Mg ions (VBS) (2). After inactivation at 56°C for 30min, samples of sera were exhaustively absorbed with sheep red blood cells (SRBC) (19).

For the preparation of crude LT enterotoxin the following ETEC strains were used: a. strain *E. coli* 40T (human source) serotype O78:H12, LT⁺, STA⁺ (L.R. Trabulsi, Escola Paulista de Medicina, SP, Brazil) and b. strain *E. coli* 0149/8 (porcine source), serotype O149: H10, LT⁺, STA⁺ (David E.S.N. de Barcellos, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Porto Alegre RS, Brazil). As a negative control (LT⁻), *E. coli* K12 (Werner Maas, University of New York, U.S.A.) was used.

Preparation of crude LT enterotoxin - For all immunohaemolytic reactions only crude LT enterotoxin preparations were used. For this purpose, the two strains of ETEC and *E. coli* K12 were grown in 10ml of casamino acids-yeast extract (CAYE) medium (4) in 125ml erlenmeyer flasks. These were incubated at 37°C, with shaking at 150rpm for 18hr. To each flask 1.0ml of polymyxin solution (2.2mg/ml) in 0.04M phosphate buffered saline (PBS), pH 6.7, was then added and shaking continued for an additional 15 min-period. Supernatants recovered after centrifugation at 12000xg for 30min were considered as crude enterotoxin preparations for use in the immunehemolysis reactions for the detection of LT antitoxin (4).

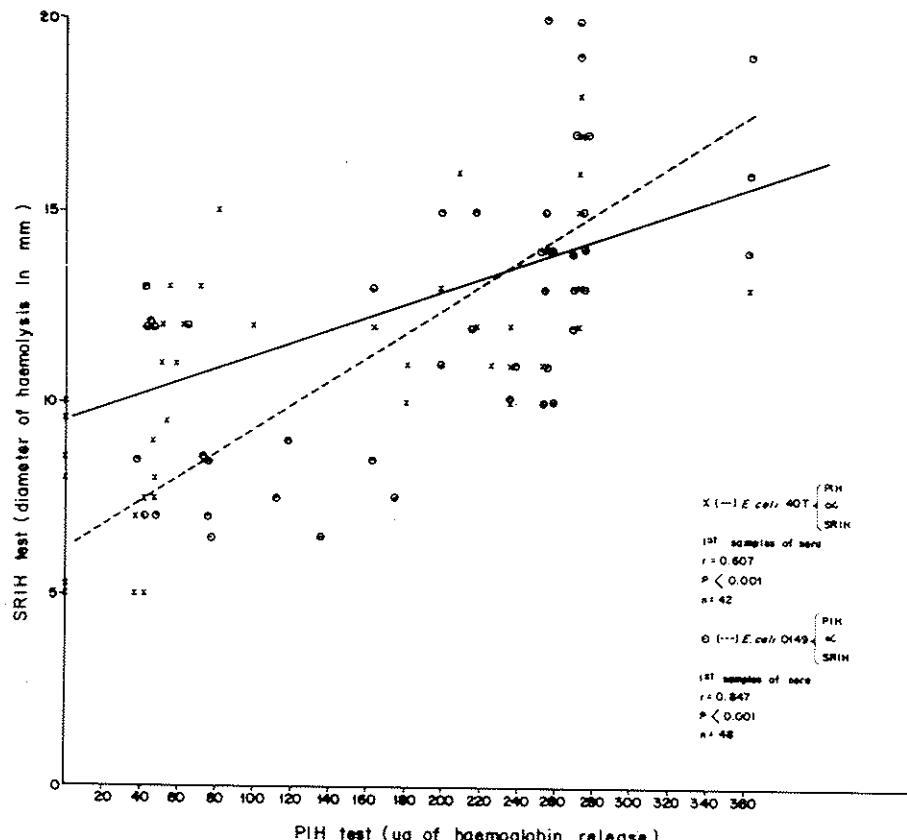
Figure 1 - Correlation between the results of the first samples of paired sera from piglets, examined by the passive immune haemolysis and single radial immune haemolysis tests, carried out with SRBC sensitized by crude LT preparations from strains 40T (human origin) and 0149/8 (porcine origin)



Passive immunehemolysis (PIH) test - The performance of the PIH test was similar to that previously described (2, 19).

Modifications were introduced to adapt the test for the detection of LT antibodies instead of LT enterotoxin. Briefly, 100 μl of standardized suspensions of SRBC (19) were mixed with equal amounts of crude LT enterotoxin preparations diluted 1:2 with VBS from either strains 40T or 0149/8, giving the complexes SRBC - 40T and SRBC - 0149/8. Mixtures were placed at 37°C for 30min, washed twice and then resuspended in 200 μl of VBS. One hundred ml absorbed sera, diluted 1:4 was added to the sensitized SRBC - 40T and SRBC - 0149/8 and incubation carried out at 37°C for 30min. Afterwards, 100 μl of guinea-pig complement, diluted 1:10, was added to the tubes and incubation continued at the same temperature for 1hr. To each tube 3.6ml of VBS was then added. After centrifugation at 2000xg for 10min, the supernatants were carefully removed and the A420 values recorded. Any reaction giving A420 values <0.17 (>30mg of haemoglobin release) was considered positive (4). SRBC were also treated similarly with polymyxin-release extracts from *E. coli* K12 and served as a negative control for the reaction.

Figure 2 - Correlation between the results of the second samples of paired sera from piglets, examined by the passive immune haemolysis and single radial immune haemolysis tests, carried out with SRBC sensitized by crude LT preparations from strains 40T (human origin) and 0148/8 (porcine origin)



Single radial immune hemolysis (SRIH) test - In this test SRBC were also sensitized with crude LT enterotoxin preparations of the known LT⁺ strains and extracts prepared from *E. coli* K12. Samples of paired sera, after absorption with SRBC were diluted 1:4 with VBS and used in the reactions in place of the cholera antitoxin, as described in the original paper (20). Briefly, to 0.5ml of 10% suspensions of washed SRBC, equal volumes of crude LT- enterotoxin preparations of either 40T (SRBC - 40T) or 0149/8 (SRBC - 0149/8) were added. A similar procedure was adopted for the sensitization of SRBC with *E. coli* K12 extracts.

Mixtures were incubated in water-bath at 37°C for 15min and then centrifuged at 2000xg for 30min. Then, pellets of the sensitized SRBC were resuspended in 1ml of VBS (final concentration of SRBC equal to 5%). Volumes of 0.3ml of each sensitized SRBC preparation were added to each tube (13 x 130) containing 2.7ml of molten agarose, diluted in VBS, at pH 7.4 giving a final concentration of 1%. The contents of the tubes were mixed vigorously, poured on to common glass microscope slides and then cooled. Two wells, A and B, 2.5cm apart and 5mm in diameter, were punched in the SRBC agarose. Special care was taken to make these wells along the longitudinal midline of the microscope slide.

Table 1 - Number and respective percentage of positive and negative samples of paired sera for LT antitoxin as detected by the PIH and SRIH tests.

Símbolos: PIH test = Passive immune haemolysis test; SRIH test = Single radial immune haemolysis test; $X^2 A = 10.12$ ($p < 0.001$); $X^2 B = 5.56$ ($p < 0.01$); $X^2 C = 1.93$ ($p > 0.05$); $X^2 D = 6.48$ ($p < 0.05$)

antigens	PIH test				SRIH test			
	1 st samples of sera (A)		2 nd samples of sera (B)		1 st samples of sera (C)		2 nd samples of sera (D)	
	+ (%)	- (%)	+ (%)	- (%)	+ (%)	- (%)	+ (%)	- (%)
40T	44(81.4)	10(8.5)	27(50)	27(50)	48(88.8)	6(11.1)	26(48.1)	28(51.8)
0149/8	53(98.1)	1(1.85)	38(70.3)	16(29.6)	51(94.4)	3(5.5)	38(70.3)	16(29.6)
Total	97	11	65	43	99	9	64	44

Twenty-five microliters of the first sample serum under test was added to well A, and an equal volume of the 2nd sample of paired serum was added to well B. This procedure was repeated for all paired sera under study. The slides were kept at 4°C for 24hr after which 2ml of guinea-pig sera, diluted 1:10 was pipetted over the surface of the gel.

The slides were incubated at 37°C in a wet chamber for 6hr. The excess of complement was then removed and the diameter (in mm) of the haemolytic zones was measured in two dimensions to the nearest 0.5mm. Any zone haemolysis around the wells (5mm Ø) in the SRBC - agarose gel was considered as a positive reaction, unless non-hemolysis was obtained with the SRBC sensitized with extracts from *E. coli* K12.

Results

Fifteen (21.73%) of the 69 paired sera collected from piglets from the region of Concórdia SC, Brazil were negative in the PIH and SRIH tests carried out with SRBC-40T and SRBC-0149/8. The remaining samples showed at least one positive reaction either in the PIH or SRIH tests (Table 1).

It may be observed that with most sera there was a considerable decrease in the number of positive PIH and SRIH tests carried out with the second samples of sera. Table 1 also shows that for the first and second samples of paired sera the results obtained in the PIH test carried out with SRBC-40T and SRBC-0149/8 varied considerably. Thus for first samples of sera $X^2 = 10.12$ ($p < 0.001$) and for the second ones $X^2 = 5.56$ ($p < 0.01$) both being significant, suggesting that the results of this test, when used for detecting anti-LT, were however dependent on the origin of the *E. coli* strain used to prepare the crude extracts for SRBC sensitization. Results of the SRIH test were also dependent on the extracts used to sensitize SRBC, when examining the second samples of paired sera, i.e. $X^2 = 6.48$ ($p < 0.05$). However, results of the SRIH test carried out with the first samples of paired sera, apparently were not influenced by the origin of sensitizing enterotoxin preparation ($X^2 = 1.93$, $p > 0.05$).

The correlation between the results of the PIH and SRIH tests carried out with the first samples of paired sera, SRBC-40T and SRBC-0149/8 is shown in Figure 1. It can be observed that there is a positive correlation when the same crude enterotoxin preparation was used to sensitize SRBC used in both tests. Similar results were observed for the PIH tests carried out with the second samples of paired sera (Figure 2).

Table 2 shows the results obtained with 7 samples of paired sera whose reactions with the second samples presented either some increase of the haemoglobin release or of the diameter of haemolysis in relation to the respective PIH and SRIH tests performed with the first samples of sera.

Table 2 - Results of the PIH an SRIH test, with paired sera which showed an increase in the amount (μg) of haemoglobin release (PIH test) and/or in the diameter (mm) of haemolysis (SRIH) test, between the 2nd and 1st samples of sera.

Symbols: PIH = Passive immune haemolysis; SRIH = Single radial immune haemolysis; * = μg of haemoglobin release in the PIH test; ** = Diameter of haemolysis in the single radial immune haemolysis test

Paired	PIH test				SRIH test			
	1 st samples		2 nd samples		1 st samples		2 nd samples	
	40T	0149	40T	0149	40T	0149	40T	0149
Sera								
4174	-	41.44*	108.10	68.46	-	-	-	9
4130	198.19	198.19	126.12	243.23	13**	15	10	10
4136	-	55.85	-	93.69	-	-	8	8.5
4144	36.03	37.83	-	44.09	7	8.5	-	-
4158	162.16	257.25	270.27	270.27	12	14	10	14
4162	216.21	252.25	90.09	270.27	16	20	10	14
4165	41.44	61.26	-	90.09	-	-	-	9.5

Discussion

With most samples of paired sera examined both the PIH and SRIH tests revealed a marked decrease of either the haemoglobin release or the diameter of haemolysis, respectively. This fact suggests that most LT antitoxin detected in the samples of paired sera was not probably due to active infection by LT+ *E. coli*. It is likely that such LT antitoxin levels present in the sera tested had been transmitted to the piglets through the ingestion of the colostrum of their respective dams. Experiments in Concórdia, SC, Brazil (unpublished data), demonstrated that most cases of porcine colibacillosis were caused by ETEC producing only STa enterotoxin.

A few paired sera (Table 2) showed a slight increase in the LT antitoxin as detected by the assays used, but this was not sufficiently high to characterize a 4-fold serological conversion as would be expected in cases of active colibacillosis caused by LT+ *E. coli* strains.

SRBC-0149/8 (Table 1) independent of the sera and test considered, was much more sensitive for the detection of LT-antitoxin in porcine sera than SRBC-40T. The inclusion of the latter strain (40T) of human origin to sensitize SRBC for use in the assay was to show that, despite using crude LT preparations for SRBC, the immunehemolytic reactions were specific for LT antitoxin. This specificity was reinforced by the fact that none of the paired sera showed positive reactions with SRBC sensitized with crude preparations from the non-enterotoxigenic *E. coli* K12 strain. A higher number of positive PIH and SRIH tests carried out with SRBC-0149/8 (porcine origin) in relation to SRBC-40T (human origin) can probably be explained by antigenic differences which have been recently demonstrated between, human and porcine preparations of purified LT (5, 10, 11).

Results obtained with the first samples of sera (Figure 1) as well as those with the respective second ones (Figure 2) show a significant positive correlation between the results of the tests. Therefore it would be possible to use either one. As a matter of fact, this conclusion could already be drawn from Table 1.

In conclusion, tests can be extremely useful to evaluate the passive protection of young piglets conferred by the colostrum received from their dams, either immunized with LT- enterotoxin vaccines or by previously natural infection with LT+ *E. coli* strains. In the present investigation 15 (21.73%) of the paired sera showed no detectable LT antitoxin, whatever the test used, suggesting that unless these piglets, had had K88 antibodies in their sera, they were probably unprotected against colibacillosis caused by LT+ strains of *E. coli*.

Otherwise, both immunohaemolytic reactions can be useful tools to make a retrospective diagnosis of porcine colibacillosis caused by LT+ *E. coli*. We feel that the SRH test, as demonstrated in this paper, may be recommended for its simplicity, reproducibility and sensitivity.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP). The authors are indebted to Dr. Ladislav Sodek for his critical review of the manuscript.

References

1. Anrén, C.M. & Svennerholm, A.L. - Synergistic protective effect of antibodies against *Escherichia coli* enterotoxin and colonization factors antigens. *Infect. Immun.*, 38:74-79, 1982.
2. Castro, A.F.P. de; Serafim, M.B.; Gomes, J.A. & Gatti, M.S.V. - Improvements in the passive immune hemolysis test for assaying enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Jour. Clin. Microbiol.*, 12:714-717, 1980.
3. Dorner, F.; Mayer, P. & Leskova, R. - Immunity to *Escherichia coli* in piglets: the role of colostral antibodies directed against heat-labile enterotoxin in experimental neonatal diarrhea. *Zentralbl Veterinaermed*, 27:207-221, 1980.
4. Evans Jr., D.J. & Evans, D.G. - Direct serological assay for the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* using passive immune hemolysis. *Infect. Immun.*, 16:604-609, 1977.
5. Geary, S.J.; Marchlewicz, B.A. & Finkelstein, R.L. - Comparison of heat-labile enterotoxins from porcine and human strains of *Escherichia coli*. *Infec. Immun.*, 36:215-220, 1982.
6. Greenberg, H.B.; Levine, M.M.; Merson, M.H.; Sack, R.B.; Sack, D.A.; Valdesuso, J.R.; Nalim, D.; Hoover, D.; Chanock, R.M. & Kapikian, A.Z. - Solid-phase microtiter radioimmunoassay blocking test for detection of antibodies to *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Jour. Clin. Microbiol.*, 9:60-64, 1979.
7. Gyles, C.L. & Barnum, D.A. - A heat-labile enterotoxin from strains of *Escherichia coli* enteropathogenic for pigs. *Jour. Infect. Dis.*, 120:419-426, 1969.
8. Gyles, C.L. - Discussion: heat-labile and heat-stable forms of the enterotoxin from *Escherichia coli* strains enteropathogenic for pigs. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 176:314-322, 1971.
9. Gyles, C.L. - The enterotoxin plasmids of *Escherichia coli*. *Jour. Infect. Dis.*, 130:40-49, 1974.
10. Honda, T.; Takeda, Y. & Miwatani, I. - Isolation of special antibodies which react only with homologous enterotoxins from *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 34:333-336, 1981.
11. Honda, T.; Tsuji, T.; Takeda, T. & Miwatani, T. - Immunological nonidentity of heat-labile enterotoxins from human and porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 34:337-340, 1981.
12. Klipstein, F.A.; Engert, R.F. & Clements, J.D. - Development of a vaccine of cross-linked ST-IT that protects against *Escherichia coli* heat-labile and heat-stable enterotoxins. *Infect. Immun.*, 37:550-557, 1982.
13. Moon, H.W.; Nagy, B.; Issacson, R.E. & Orskov, I.C. - Occurrence of K99 antigen on *Escherichia coli* isolated from pigs and colonization of pig ileum by K99+ enterotoxigenic *E. coli* from calves and pigs. *Infect. Immun.*, 15:614-620, 1977.
14. Moon, H.W.; Kohler, E.M.; Schneider, R.A. & Whipp, S.C. - Prevalence of pillus antigens, enterotoxins types and enteropathogenicity among K88-negative enterotoxigenic *Escherichia coli* from neonatal pigs. *Infect. Immun.*, 27:222-230, 1980.

15. Morgan, R.L.; Isaacson, R.E.; Moon, H.W.; Brinton, C.E. & To, C.C. - Immunization of suckling pigs against enterotoxigenic *Escherichia coli* induced diarrheal disease by vaccination dams with purified 987P or K99 pili: protection correlates with pilus homology of vaccine and challenge. *Infect. Immun.*, 22:771-777, 1978.
16. Nagy, B.H.; Moon, H.W.; Isaacson, R.E.; To, C.E. & Brinton, C.E. - Immunization of suckling pigs against enteric enterotoxigenic *Escherichia coli* infection by vaccinating dams with purified pili. *Infect. Immun.*, 21:269-274, 1978.
17. Nagy, L.K.; Mackenzie, T. & Bharucha, Z. - In vitro studies on the antimicrobial effects of colostrum and milk from vaccinated and unvaccinated pigs on *Escherichia coli*. *Res. Vet. Sc.*, 21:132-140, 1976.
18. Sack, R.B.; Jacobs, B. & Mitra, R. - Antitoxin responses to infection with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Jour. Infect. Dis.*, 129:330-335, 1974.
19. Serafim, M.B.; Castro, A.F.P. de; Reis, M.H.L. dos & Trabulsi, L.R. - Passive immune hemolysis for the detection of heat-labile enterotoxin produced by *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 24:606-610, 1979.
20. Serafim, M.B.; Castro, A.F.P. de; Leonardo, M.B. & Monteiro, A.R. - Single radial immune hemolysis test for detection of *Escherichia coli* thermolabile enterotoxin. *Jour. Clin. Microbiol.*, 14:473-478, 1981.
21. Simões, M.O.; Castro, A.F.P. de; Serafim, M.B. & Portugal, M.A.S.C. - Produção de enterotoxinas e resistência a drogas em colibacilos isolados de suínos com diarreia. *Rev. Microbiol. (São Paulo)*, 13:135-142, 1982.
22. Smith, H.W. & Gyles, C.L. - The relationship between two apparently different enterotoxins produced by enteropathogenic strains of *Escherichia coli* of porcine origin. *Jour. Med. Microbiol.*, 3:387-401, 1970.
23. Smith, H.W. - Neonatal *Escherichia coli* infections in domestic mammals: transmissibility of pathogenic characteristics. *Ciba Foundation Symposium*, 1976.
24. Whipp, S.C. & Donta, S.T. - Serum antibody to *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin in cattle and swine. *Amer. Jour. Vet. Res.*, 37:905-906, 1976.

VIABILIDAD Y MULTIPLICACIÓN DE LISTERIA MONOCYTOGENES CEPA MURRAY FREnte A ANTIMICROBIANOS DE USO EN MEDIOS SELECTIVOS

Alba Ester Sargoni
 Mirta Aurora Franco
 Ramón Alberto de Torres

Deptº de Microbiología e Inmunología
 Orientación Microbiología
 Facultad de Farmacia y Bioquímica
 Universidad de Buenos Aires
 Junín 956-4º Piso
 1113 Capital Federal
 Argentina

Resumen

Se han efectuado estudios comparativos de velocidad de crecimiento, cosecha máxima y duración de la fase de adaptación de poblaciones de *Listeria monocytogenes* (CCMA 29454, ATCC 15313) a 37°C, en medios de cultivo líquidos conteniendo concentraciones variables de antimicrobianos con diferente espectro de acción. Concentraciones de 160 μ g/ml de ácido nalidíxico, 80 μ g/ml de ácido pipemídico, 40 μ g/ml de ácido oxolínico, 0.8U/ml de bacitracina y 200U/ml de nistatina, constituyen límites confiables que permiten la sobrevivencia y multiplicación de *Listeria monocytogenes* y ejercen una importante acción inhibitoria sobre el crecimiento de gran parte de la flora habitual de materiales normalmente septicos. Es de importancia la potencial capacidad selectiva de diversas asociaciones de los agentes ensayados en la formulación de medios de cultivo destinados a un enriquecimiento de *Listeria monocytogenes*, que posibilite su aislamiento a partir de cultivos mixtos.

Summary

Effects of antimicrobial agents of potential utilization in selective media on viability and growth rate of Listeria monocytogenes

Kinetics of growth of *Listeria monocytogenes* were established at 37°C in liquid culture media with and without several concentrations of antimicrobial agents which were selected by having a wide range of antibacterial activity. Results indicated that 160 μ g/ml of nalidixic acid; 80 μ g/ml of pipemicidic acid; 40 μ g/ml of oxolinic acid; 0.8U/ml of bacitracin or 200U/ml of nystatin represented confiable upper limits that allow *L. monocytogenes* 29CCM-454 to survive and grow. All the antimicrobials tested showed an important inhibitory action on most of the accompanying flora present in normally septic samples. It is remarkable the potential selective ability of different associations of the tested agents for construction of a culture media to be used for *L. monocytogenes* enrichment in order to attain its isolation from mixed flora.

Introducción

Es difícil determinar la incidencia y/o prevalencia real de la infección con *Listeria monocytogenes* tanto en humanos como en patología animal, dada la dificultad para establecer un diagnóstico de certeza.

En pruebas serológicas se producen reacciones cruzadas con diversas bacterias, principalmente *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* grupos B y C, *Streptococcus viridans* y algunas especies de *Corynebacterium* (1). Además, no existe una metodología de probada eficiencia para el aislamiento selectivo de *Listeria monocytogenes* a partir de materiales biológicos normalmente sépticos. Los esquemas propuestos se basan en el enriquecimiento a 4°C (7, 9), el empleo de agentes químicos inhibidores de la flora Gram negativa (18) o la combinación de ambos tratamientos (16), seguidos por el aislamiento en medios gelificados complejos y/o selectivos.

Agentes selectivos tales como telurito de potasio, ácido acético, azida sódica (10), derivados de la furacina (19), feniletanol, glicina y cloruro de litio (2) han sido utilizados como constituyentes de medios selectivos con éxito relativo y ninguno se ha instituido en forma concreta como técnica índice. También fueron empleados quimioantibióticos como penicilinas, cloranfenicol (14, 20), polimixina B (4) y ácido nalidíxico (3).

En el presente trabajo se compara el crecimiento de *Listeria monocytogenes* cepa Murray 53-XXIII (cepa tipo) en diferentes condiciones nutricionales y se estudia la influencia que ejercen concentraciones variables de inhibidores químicos con diferentes espectro de acción sobre dicho crecimiento. Los agentes probados, inhibidores de bacterias Gram negativas, fueron: ácido nalidíxico, ácido oxoliníco y ácido pipemídico. El estudio incluye además, bacitracina y nistatina, compuestos activos contra bacterias Gram positivas y hongos, respectivamente.

Materiales y Métodos

Cepa bacteriana - *Listeria monocytogenes* cepa Murray 53-XXIII (CCMA 29454, ATCC 15313, NCTC 10357), considerada cepa tipo, conservada mediante pasajes en agar base sangre contenido 0.2% de glucosa.

Para la preparación de inóculos se efectuaron cultivos estáticos de 10-12 horas de incubación a 35°C, en caldo triptosa fosfato.

Medios de cultivo - Los medios líquidos complejos probados fueron: caldo eugon (Britania), caldo dextrosa (Britania), caldo tripteína soja (Britania) y caldo triptosa fosfato (Difco).

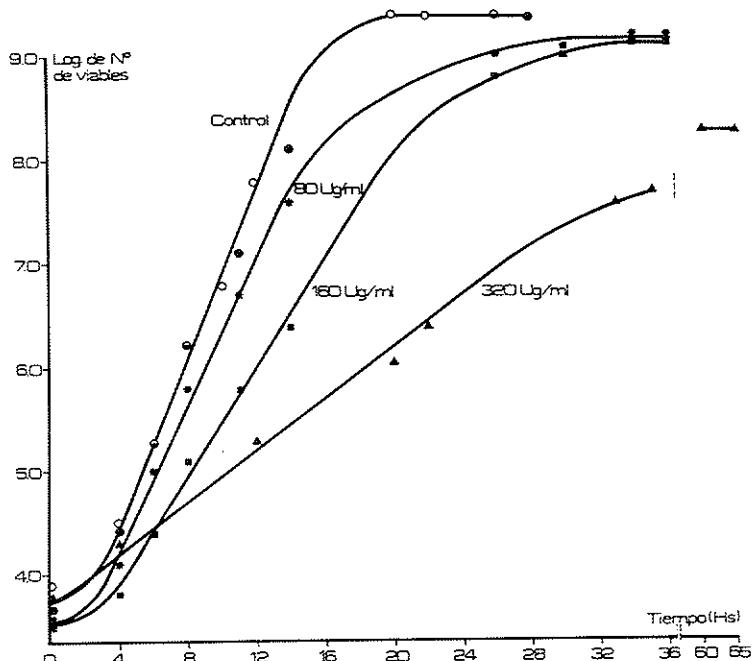
Para efectuar el recuento de unidades formadoras de colonias se empleó agar base sangre (Britania) adicionado con 0.2% de glucosa.

Agentes químicos - Los agentes químicos empleados fueron: ácido nalidíxico (Farmacéutica Argentina S.A.), ácido oxoliníco (Argentia SACIFY), ácido pipemídico (Volpino SACI), bacitracina zinc (John Wyeth S.A.) y nistatina (Merck Sharp y Dohme). En el momento de ser usadas se prepararon soluciones de cada droga de las siguientes concentraciones: ácido nalidíxico: 20mg/ml, ácido oxoliníco: 20mg/ml y ácido pipemídico: 16mg/ml, todas ellas en NaOH 0.1N; bacitracina zinc: 80U/ml en HCl 0.1N y nistatina: 10000U/ml en dimetilsulfóxido.

Curvas de crecimiento - Se utilizaron frascos de 250ml de capacidad contenido 50ml de caldo triptosa fosfato. Para lograr las concentraciones finales de antimicrobianos indicadas en cada experiencia, se incorporaron asepticamente volúmenes adecuados de cada una de las soluciones de los agentes químicos, previamente esterilizadas por filtración. Los medios de cultivo así preparados fueron inoculados con aproximadamente 1×10^4 bacterias/ml e incubados en forma estática en baño de agua a 37°C ± 0.2. A diferente tiempos, durante la incubación, se retiraron aliquotas y se cuantificaron las unidades formadoras de colonias (UFC/ml). Todas las experiencias se efectuaron por duplicado y los valores expresados representan los promedios de los valores individuales.

Figura 1 - Efecto de diferentes concentraciones de ácido nalidíxico sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* cepa Murray en caldo triptosa fosfato a 37°C.

Símbolos: -○- = Control correspondiente a ácido nalidíxico 320 μ g/ml; -●- = Control correspondiente a ácido nalidíxico 80 y 160 μ g/ml



Cuantificación de UFC/ml - Se efectuaron diluciones adecuadas de los cultivos en solución salina (NaCl 0.85%), las que fueron diseminadas, por triplicado, sobre agar base sangre conteniendo 0.2% de glucosa. Al cabo de 48 horas de incubación a 35°C, se contaron las colonias macroscópicamente visibles y se calcularon las UFC/ml.

Resultados

Elección del medio de mayor eficiencia en el crecimiento de *Listeria monocytogenes* - El análisis comparativo de la evolución de las observancias de cultivos de *L. monocytogenes* en caldo dextrosa, caldo eugon, caldo tripteína soja y caldo triptosa fosfato (datos no presentados), no reveló diferencias significativas respecto a los tiempos de duplicación de la masa bacteriana. Sin embargo la absorbancia máxima correspondiente a la fase estacionaria temprana fue mayor en los cultivos en caldo triptosa fosfato (CTP). Este medio de cultivo fue seleccionado para los estudios de influencia de agentes antimicrobianos sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* en fase líquida.

Efecto de ácido nalidíxico, ácido oxolínico y ácido pipemídico sobre la cinética de crecimiento de *Listeria monocytogenes* - Se realizaron cultivos de *L. monocytogenes* a 37°C en CTP, conteniendo concentraciones finales de 20, 40 y 80 μ g/ml de ácido oxolínico; 80, 160 y 320 μ g/ml de ácido nalidíxico y 40, 80 y 160 μ g/ml de ácido pipemídico. Paralelamente, se efectuaron cultivos en ausencia de antimicrobianos y controles del diluyente respectivo.

Los resultados obtenidos se grafican en las Figuras 1, 2 y 3.

De ellas surge que:

1. El NaOH en las concentraciones presentes no modifica el crecimiento.
2. El aumento de las concentraciones de cualquiera de los compuestos probados produce una disminución significativa de la velocidad máxima de crecimiento y un alargamiento de la fase de adaptación, que resultan en un aumento del tiempo necesario para alcanzar la cosecha máxima. La velocidad de crecimiento es afectada significativamente por concentraciones mayores que 80 μ g/ml de ácido pipemídico, 320 μ g/ml de

ácido nalidíxico y 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ácido oxoliníco. Además, con concentraciones de 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ácido oxoliníco y 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ácido pipemídico se observa una prolongada fase de latencia. Luego de 48 horas de incubación, medios conteniendo 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ácido nalidíxico, 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ácido pipemídico y 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ácido oxoliníco permiten obtener una cosecha máxima similar a la de los controles respectivos. Concentraciones mayores, si bien permiten un crecimiento significativo de *L. monocytogenes*, requieren tiempos mayores para alcanzar el valor máximo del control. Así, la cosecha máxima se alcanza alrededor de las 65 horas con concentraciones de 320 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ácido nalidíxico y 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ácido pipemídico y se requieren incubaciones de hasta 80 horas con concentraciones de 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ácido oxoliníco.

Efecto de bacitracina - Se ensayaron concentraciones de 0,8 y 1,6 U/ml de bacitracina en CTP a 37°C. Se efectuaron controles en ausencia del antimicrobiano con y sin el diluyente empleado.

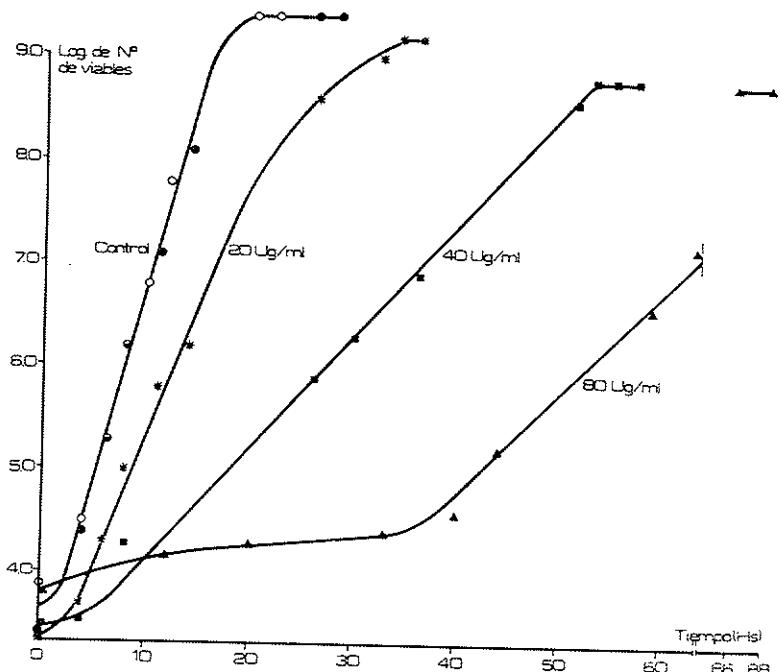
De los resultados obtenidos, que se grafican en la Figura 4, surge que el diluyente empleado no afecta el crecimiento de *L. monocytogenes*.

La bacitracina en las concentraciones probadas afecta significativamente la velocidad de crecimiento de *L. monocytogenes* y en concentración de 1,6U/ml se observa además, una prolongada fase de latencia (22 horas aproximadamente).

A las 48 horas, con 0,8U/ml de bacitracina se alcanza una cosecha máxima prácticamente similar a la del control respectivo, mientras que con concentraciones de 1,6U/ml se requieren aproximadamente 56 horas.

Figura 2 - Efecto de diferentes concentraciones de ácido oxoliníco sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* cepa Murray en caldo triptosa fosfato a 37°C.

Símbolos: -○- = Control correspondiente a ácido oxoliníco 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$; -●- = Control correspondiente a ácido oxoliníco 20 y 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$



Efecto de nistatina - Las concentraciones ensayadas fueron de 50, 100 y 200U/ml en CTP a 37°C.

Los resultados obtenidos muestran que no existen diferencias en la velocidad de crecimiento (tiempo de generación: 50min.), duración de la fase de latencia (4 horas) y cosecha máxima (1×10^9 bacterias/ml) alcanzada por cultivos de *L. monocytogenes*, entre el control contenido CTP y aquellos frascos conteniendo el solvente, dimetilsulfóxido, y las diferentes concentraciones de la droga (50, 100 y 200U/ml).

Nota - Resultados previos, no presentados, permiten señalar que la recuperación de UFC aplicada al recuento posterior de bacterias viables, no es afectada por las concentraciones residuales de los diferentes agentes químicos ensayados.

Discusión

Ha sido demostrado que la recuperación de UFC de *Listeria monocytogenes* a partir de cultivos mixtos, se ve afectada por otras especies bacterianas (12). Se ha comprobado la inhibición del crecimiento de *Listeria monocytogenes* por especies de *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Penicillium* y *Aspergillus* (15). Estas observaciones han sugerido que el aislamiento de *Listeria monocytogenes* a partir de materiales normalmente sépticos debe intentarse generando condiciones selectivas favorables para su crecimiento.

La metodología propuesta por Gray para diagnóstico de Listeriosis emplea períodos de incubación a 4°C de 3 meses como mínimo mientras que el "Second International Symposium on Listeric Infection" (8) recomienda 6 meses, antes de descartar la posibilidad de presencia de *Listeria monocytogenes* en un material biológico.

El prolongado tiempo de incubación requerido, asigna al diagnóstico por aislamiento una significación estrictamente epidemiológica, de escaso valor en el nivel asistencial. Otro problema radica en que muchos microorganismos como *Proteus*, *Pseudomonas*, *enterococos*, etc., que forman parte de la flora habitual acompañante, también se multiplican a 4°C. De aquí surge la importancia del empleo de medios de cultivo contenido agentes selectivos químicos utilizables a 37°C que, además de mostrar un efecto inhibitorio adecuado, no afectan en grado importante la recuperación de *Listeria monocytogenes* y permitan la misma, luego de un corto tiempo de incubación (2, 3, 4, 10, 14, 19).

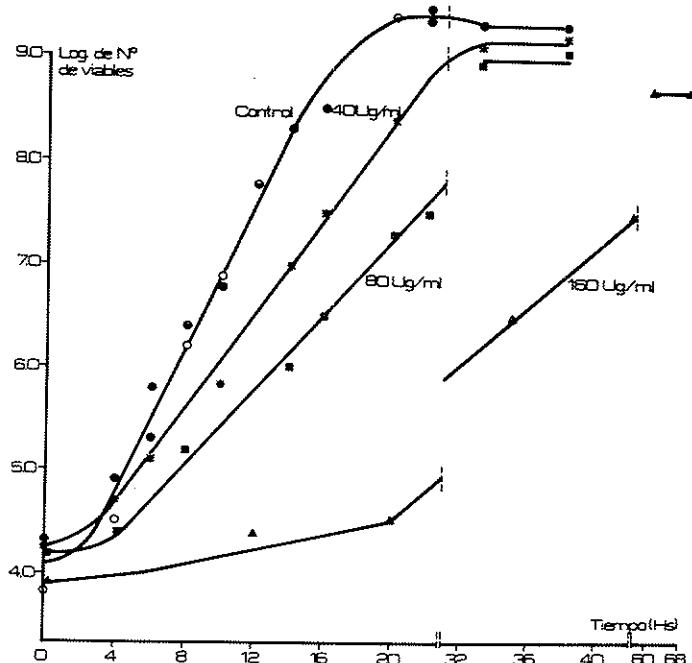
En caldo triptosa fosfato contenido 80 μ g/ml de ácido oxoliníco, 160 μ g/ml de ácido pipemídico ó 1,6U/ml de bacitracina incubados a 37°C, se observa una prolongada fase de latencia pero que permite, alrededor de las 72 horas, la recuperación de una cosecha máxima similar a los controles. Esto podría deberse a diferencias de susceptibilidad entre células de la población original ó a inactivación del antimicrobiano en cuestión. Independientemente del mecanismo ejercido, estas concentraciones presentan un margen muy aceptable de inhibición diferenciada contra flora acompañante.

Es de interés, antes de proponer la formulación de un medio selectivo utilizando en forma individual o combinada los antimicrobianos estudiados en este trabajo, obtener ventaja de los resultados obtenidos por diversos autores. Estos informan sobre la capacidad inhibitoria de estos antimicrobianos en concentraciones establecidas sobre especies potencialmente acompañantes de *Listeria monocytogenes* en materiales sépticos destinados a aislamiento o que sirven de indicadores. De esta forma se puede establecer una expectativa potencial de su utilización en un medio selectivo cuando concentraciones inhibitorias para diversas bacterias son inferiores a aquéllas que hemos demostrado en esta comunicación permiten márgenes muy aceptables de viabilidad y crecimiento de *L. monocytogenes*.

Así 80 μ g/ml de ácido nalidixico, ejercen efecto bactericida sobre bacilos gram negativos (*Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Proteus* spp., *Proteus mirabilis*, *Versinia enterococcica* y *Acinetobacter*) y algunos cocos gram positivos (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*). Concentraciones de 160 μ g/ml inhiben además el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* (5, 6).

Figura 3 - Efecto de diferentes concentraciones de ácido pipemídico sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* cepa Murray en caldo triptosa fosfato a 37°C.

Símbolos: -○- = Control correspondiente a ácido pipemídico 160 μ g/ml; -●- = Control correspondiente a ácido pipemídico 40 y 80 μ g/ml



40 μ g/ml de ácido oxolínico inhiben *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus*, *Streptococcus* (tipo fecal) y *Pseudomonas aeruginosa* (17).

40 μ g/ml de ácido pipemídico ejercen acción bactericida sobre bacterias gram negativas (*Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus* (todas las especies), *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophylus influenzae*, *Yersinia enterocolitica* y *Pasteurella*) y bacterias gram positivas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*). 160 μ g/ml de ácido pipemídico ejercen además un efecto inhibitorio sobre *E. rhusiopathiae*, *Streptococcus hemolyticus* y *Streptococcus pneumoniae* (21, 22).

0,8U/ml de bacitracina, ejercen un efecto bactericida sobre diversos cocos y bacilos gram positivos, *Neisseria*, *Haemophylus influenzae*, *Actinomyces* y *Fusobacterium*, pero enterobacterias, *Pseudomonas*, *Candida*, *Torula*, *Nocardia*, *Clostridium* y *Cryptococcus* resisten a la droga (13, 11).

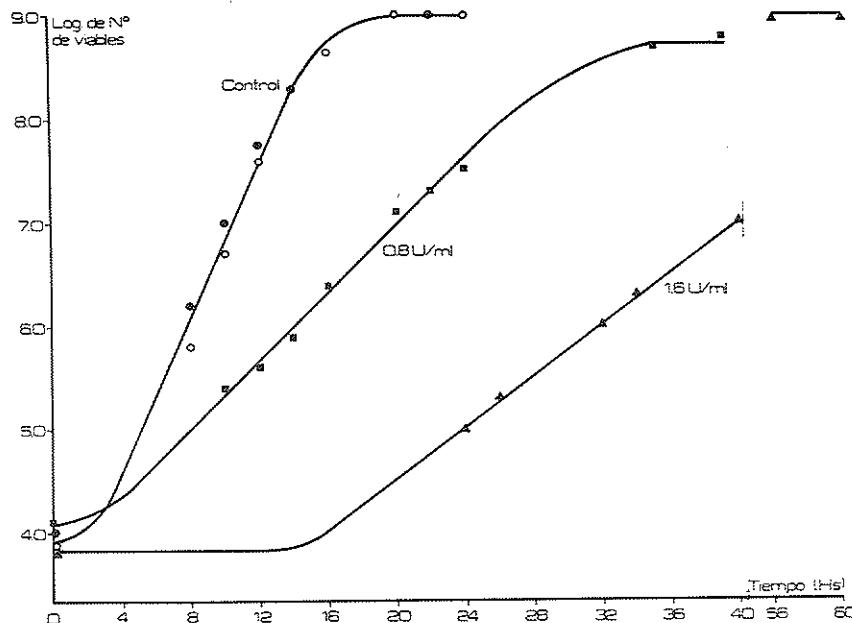
Concentraciones de hasta 200U/ml de nistatina en las condiciones ensayadas, no afectan el crecimiento de *Listeria monocytogenes* y luego de 24 horas de incubación permiten obtener la cosecha máxima. Es conocido que 50U/ml de nistatina ejercen una acción inhibitoria del crecimiento de *Candida*, *Cryptococcus*, *Blastomycetes*, *Trochophyton*, *Epydermophyton* y *Mycosporum* (11).

Nuestros resultados indican que concentraciones de ácido pipemídico de 80 μ g/ml permiten una recuperación eficiente de UFC de *Listeria monocytogenes* en 24 horas, período aceptable para un examen con fines diagnósticos. Lo mismo ocurre con concentraciones de ácido oxolínico de 40 μ g/ml, ácido nalidíxico de 160 μ g/ml, bacitracina de 0,8U/ml y nistatina de 200U/ml.

Resultados semejantes han sido obtenidos utilizando la cepa Murray 58-XXIII (29 CCMA 455-NCTC 7973) y 4 cepas de origen humano recientemente aisladas.

Los medios de cultivo que contienen cada una de los antimicrobianos estudiados, en el rango de concentraciones señalado, constituirán diferentes alternativas para el aislamiento de *Listeria monocytogenes*. La eficiencia selectiva de cada medio dependerá de la naturaleza de la flora asociada.

Figura 4 – Efecto de diferentes concentraciones de bacitracina sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* cepa Murray en caldo triptosa fosfato a 37°C.
Símbolos: -○- = Control correspondiente a bacitracina 1,6U/ml;
 -●- = Control correspondiente a bacitracina 0,8U/ml



En este sentido hemos comenzado estudios de recuperación de *L. monocytogenes* a partir de flujos vaginales, material de abortos y material fecal experimentalmente inoculados, ensayando concentraciones variables de los antimicrobianos estudiados manteniendo constante 80µg/ml de ácido pipemídico.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado con el apoyo económico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y la Secretaría de Ciencia y Técnica.

Referencias Bibliográficas

1. Albritton, W.L.; Wiggins, G.L.; de Witt, W.E. & Feeley, J.C. - *Listeria monocytogenes*. In: - Manual of clinical microbiology. 3. ed. Washington, American Society for Microbiology, p.139-142, 1980.
2. Bearns, R.E. & Girard, K.F. - On the isolation of *Listeria monocytogenes* from biological specimens. Amer. J. Med. Technol., 25:120-126, 1959.
3. Beerens, H. & Tahon-Castel, M.M. - Milieu à l'acide nalidixique pour l'isolement des streptocoques, *D. pneumoniae*, *Listeria*, *Erysipelothrix*. Ann. Inst. Pasteur, 111:90-93, 1966.
4. Bojsen-Møller, J. - Occurrence of *Listeria monocytogenes* in feces from healthy and sick persons. Proc. XIV Scand. Congr. Pathol. Microbiol., Oslo Univ. Press, 1964.
5. Bourguignon, G.H.; Levitt, M. & Sternglanz, R. - Studies on the mechanism of action of nalidixic acid. Antimicrob. Agents Chemother., 4:479-486, 1973.
6. Deitz, W.H.; Bailey, J.H. & Froelich, E.J. - In vitro antibacterial properties of nalidixic acid. Antimicrob. Agents Chemother., p.583-587, 1963.

7. Gray, M.L. - *Listeria monocytogenes* and listeric infection in the diagnostic laboratory. Ann. N.Y. Acad. Sci., 98:686-699, 1962.
8. Gray, M.L. - Second Symposium on Listeric Infection: summary conclusions. Bozeman, Montana State College, 1963.
9. Gray, M.L. & Killinger, A.H. - *Listeria monocytogenes* and listeric infection. Bacteriol. Rev., 30:309-382, 1966.
10. Gray, M.L.; Stafseth, H.J. & Thorp Jr., F. - The use of potassium tellurite, sodium azide and acetic acid in a selective medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. J. Bacteriol., 59:443-444, 1950.
11. Gottlieb, D. & Shaw, D. - Antibiotics. I - Mechanism of action. New York, Springer-Verlag, p.90-102 y 122-137, 1967.
12. Hamon, Y. - Les bacteriocines. Ann. Inst. Pasteur, 107:suplement 5:18-53, 1964.
13. Korzybski, T.; Kowszyk-Gindifer, Z. & Kurylowicz, W. - Antibiotics. I - Origin, nature and properties. Varsawa, Pergamon Press/Polish Scientific Publishers, p.78-87, 1967.
14. Larsen, H.E. - Investigations on the epidemiology of listeriosis Vet. Med., 16:890-909, 1964.
15. Larsen, H.E. - Evaluation of the importance of antibiosis in isolation of *Listeria monocytogenes*. Proc. Third Symp. Listeriosis, Bilthoven, 11:78-85, 1966.
16. Leighton, I. - Use of selective agents for the isolation os *Listeria monocytogenes*. J. Bacteriol., 36:283-288, 1979.
17. Leng, B. & Meyers, B. - In vitro antibacterial properties of oxolinic acid. Chemother., Rev., 18:253-258, 1973.
18. Marcenac, F.M.; Fernandez, A.J. & Paolasso, R.W. - Sensibilidad de *Listeria monocytogenes* a 20 drogas antibacterianas. Acta Bioquím. Clin. Lat-amer., 15:559-563, 1981.
19. MacBride, M.E. & Girard, K.F. - A selective method for the isolation of *Listeria monocytogenes* from mixed bacterial populations. J. Lab. Clin. Med., 55:153-157, 1960.
20. Seeliger, H.P.R. - Listeriosis. New York, Basel, S. Karger, 1961.
21. Shimizu, M.; Nakamura, S. & Tadase, Y. - Antibacterial properties of pipemidic acid. Chemother., 19:379-386, 1971.
22. Shimizu, M.; Takase, Y. & Nakamura, S. - Pipemidic acid, a new antibacterial agents active against *Pseudomonas aeruginosa*: in vitro properties. Antimicrob. Agents Chemother., 8:132-136, 1975.

MECANISMOS DE INFECÇÕES MISTAS POR MICRORGANISMOS ANAERÓBICOS DA CAVIDADE ORAL

José Francisco Hofling

Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 52
13400 Piracicaba SP, Brasil

Resumo

Estudos com *Bacteroides* da cavidade oral têm merecido especial atenção, particularmente devido ao papel que exercem em infecções orais. São revistos fatos já estabelecidos e avanços recentes pertinentes ao assunto, com ênfase nos mecanismos envolvidos nas relações parasito-hospedeiro.

Summary

Mechanisms in polymicrobial oral infections

Bacteroides of the oral cavity have received increasing attention in recent years mainly because their intervention in polymicrobial oral infections. This review presents well known facts together with late developments pertinent to the subject with emphasis on the mechanisms involved in the parasite-host interrelation.

Introdução

As relações parasito-hospedeiro estão determinadas pelo tipo de associação que se estabelece entre os participantes. Os principais tipos de relações envolvem mecanismos já conhecidos como simbiose, comensalismo e parasitismo, cuja relação entre parasito e hospedeiro é determinada, tanto pelas características do parasito que favorecem a sua implantação e a injúria ao hospedeiro, como pelos vários mecanismos do hospedeiro que se opõem a estes processos.

A capacidade de produzir doença é resultante do grau suficiente de dano, provocado pelo parasito no hospedeiro, em função de características, tais como, infectividade, poder invasor, a patogenicidade e o poder toxígeno. Recentes investigações com microrganismos da cavidade oral (6, 7, 22, 48, 55) têm demonstrado que a capacidade de produzir determinadas doenças orais se deve em grande parte à uma habilidade específica de degradação de proteínas plasmáticas, tais como, complemento, imunoglobulinas, etc.

Tem sido demonstrado que *Bacteroides gingivalis* e *Bacteroides intermedius* são as espécies mais comuns de *Bacteroides* da cavidade oral (41, 45, 51). São encontradas preferencialmente em bolsas gengivais em associação com diferentes formas de doença periodontal (11, 21, 35, 43, 46), mas têm sido, também, isoladas de polpas dentais necrotizadas (11, 21, 47). Esses microrganismos têm demonstrado possuir uma importância fundamental em infecções mistas com animais de experimentação (27, 28, 29, 44, 49) e algumas cepas dessas espécies são patogênicas para cobaias e camundongos, mesmo em culturas puras (27, 49, 50).

Estudos desenvolvidos recentemente sobre a degradação "in vivo" da proteína C3 do complemento de cobaio por uma cepa patogênica de *Bacteroides gingivalis* (48), demonstraram, que a elevada capacidade patogênica de *B. gingivalis* e *B. intermedius*, quando testados subcutaneamente em cobaios, se deve, em grande parte, à uma capacidade específica de degradar o complemento "in vivo". Nestes estudos, imunoglobulinas e a proteína C3 do soro-total de cobaio, não puderam ser detectadas por métodos imunológicos após o soro ter sido incubado com cepas de *B. gingivalis* por 24 horas. Com o soro anti-C3 usado, fragmentos de proteínas C3 com diferentes mobilidades eletroforéticas puderam ser detectadas inicialmente, mas após 8 horas não foi possível detectar nenhum traço da proteína C3 do complemento. Tal fato, indica que os fragmentos iniciais de C3 foram posteriormente degradados.

A proteína C3 e as imunoglobulinas possuem um papel importante nos mecanismos de defesa do hospedeiro. Ambas as cepas de *B. gingivalis*, respectivamente W83 e 381, demonstraram uma elevada atividade proteolítica para as proteínas do soro de cobaio e os resultados indicaram que tanto as imunoglobulinas, como a proteína C3 do complemento foram degradadas por essas cepas. É possível que, proteinases de leucócitos podem ter contribuído para a degradação das proteínas plasmáticas nos tecidos, mas Werner & Müller (54) demonstraram que determinadas cepas de *Bacteroides* degradaram uma grande variedade de proteínas plasmáticas, incluindo imunoglobulinas. Tais mecanismos foram, também, descritos por Killian (22), confirmado recentemente que a IgG humana purificada é degradada por cepas de *B. gingivalis* e *B. intermedius*.

Bacteroides gingivalis tem sido associado com casos graves de doença periodontal (42). A degradação do complemento por *B. gingivalis* indicam que a participação desse microrganismo possui um importante papel em infecções humanas. Os leucócitos têm um papel fundamental na defesa dos tecidos periodontais contra a microbiota que coloniza a área dentogengival (2). É concebível, dessa forma, que a degradação do complemento por *B. gingivalis* pode alterar os mecanismos de defesa do hospedeiro por leucócitos nessa área. A capacidade desse microrganismo em degradar também outras proteínas plasmáticas, tem merecido especial atenção por parte de pesquisadores (6, 7).

Os leucócitos polimorfonucleares possuem um papel fundamental na defesa do hospedeiro contra bactérias invasoras dos tecidos. Associados à fagocitose e morte das bactérias, os leucócitos liberam grandes quantidades de enzimas, as quais facilitam a defesa do hospedeiro pela demarcação do local de infecção e drenagem dos abscessos formados nas cavidades. A degradação de componentes teciduais como o colágeno, elastina e proteoglicanas é resultado conjunto da ação de inúmeras proteínas de leucócitos (36). Esses abrigam não somente proteínas, como elastase (17), catepsina G (40) e proteinase colagenolítica neutra (38), mas também a metaloenzima collagenase (24, 33), com o objetivo de preservar a integridade dos tecidos ao redor do local de infecção, assim como também o local de liberação enzimática dos leucócitos, a atividade dessas enzimas são moduladas por inibidores de proteinases presentes em altas concentrações no fluido orgânico (13).

Os principais inibidores dessas proteinases de leucócitos são alfa-1-antitripsina, alfa-1-antiquimotripsina e alfa-2-macroglobulina. A alfa-1-antitripsina é quantitativamente dominante e específica para serina proteinases (19). Alfa-1-antiquimotripsina é um potente inibidor de catepsina G (37) e a alfa-2-macroglobulina pode inibir diferentes tipos de proteinases (46). Tais inibidores de proteinases não possuem efeito somente para enzimas teciduais, mas também para muitas proteinases microbianas (19, 46). O papel desses inibidores de proteinases prevenindo danos teciduais tem sido demonstrado em enfisema pulmonar, aonde a deficiência congênita de alfa-1-antitripsina estaria associado com o início da doença (23).

As investigações feitas por Sundqvist (48), mencionadas anteriormente, demonstraram que uma cepa de *Bacteroides gingivalis* (w83) induz infecções purulentas em cobaios, as quais se alastram rapidamente dando origem a graves danos teciduais. Um importante fator dessa virulência ficou claro se tratar da capacidade de degradar complemento. Assim, como consequência de tais mecanismos, tal microrganismo pode, então, escapar à fagocitose e consequentemente à morte por leucócitos polimorfonucleares. Tal fato, poderia explicar o alastramento da infecção, mas não a consequente devastação da degradação tecidual. Um interessante fator microbiano nesse

contexto é a habilidade de inativar os inibidores de proteinases. Entre várias bactérias anaeróbicas testadas, a cepa de *Bacteroides asaccharolyticus* (NCTC 9337) demonstrou ser capaz de degradar alfa-1-antitripsina, mas não alfa-2-macroglobulina do plasma humano (55). A habilidade de degradar inibidores de proteinases "in vitro" tem sido também relatada para cepas de *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* (30, 31), o que certamente, deve alterar as relações parasito-hospedeiro "in vivo".

Os estudos recentes efetuados por Carlsson & col. (7) com várias cepas de *Bacteroides*, demonstraram que, particularmente, as cepas de *Bacteroides gingivalis* (w83 e H185) degradaram a maioria das proteínas séricas, incluindo os inibidores de proteinases alfa-1-antitripsina e alfa-2-macroglobulina. Tais cepas, entretanto, não degradaram alfa-1-antitromotripsina. *Bacteroides intermedius* NCTC 9336, *Bacteroides asaccharolyticus* NCTC 9337 e uma cepa assacarolítica oral diferente de *B. gingivalis* (B N11a-f) não tiveram a capacidade de degradar esses inibidores de proteínas. Essas cepas no entanto, foram capazes de inativar a capacidade de soro em inibir a atividade de tripsina. A capacidade de degradar o fator C3 do complemento e imunoglobinas em cobaios, assim como também em humanos (48), associado a esses resultados pode significar que tais espécies são eficientemente equipadas não somente em alterar importantes mecanismos de defesa do hospedeiro, mas também em impedir as funções de proteínas destinadas à preservar a integridade dos tecidos locais infectados.

Tais habilidades parecem sugerir que tais microrganismos podem interferir nos mecanismos de defesa do hospedeiro e explicar, em parte, os resultados obtidos em experimentações "in vitro", nos quais cepas de *Bacteroides* inibem, não somente a sua própria fagocitose e morte por leucócitos polimorfonucleares, mas também a de outros microrganismos presentes concomitantemente (15, 16, 20, 34, 52).

A patogenicidade de muitas cepas de *Bacteroides* em infecções mistas parece estar na dependência da presença de outras bactérias encontradas no processo infeccioso (27, 29, 49) as quais, aparentemente parecem não possuir papel relevante. Entretanto, muitas cepas de *Bacteroides* requerem fundamentalmente vitamina K e heme (25, 27, 28) como fator nutricional, o que sugere provavelmente que o papel principal daqueles microrganismos, seja o de prover fatores de crescimento necessário para as espécies de *Bacteroides* nas infecções mistas.

A maior parte do ion-férrico do organismo humano não está disponível, constituindo substâncias como ferritina, hemosiderina, mioglobina e hemoglobina. As substâncias como transferrina, haptoglobina, hemopexina e albumina estão envolvidas no transporte e controle da excreção urinária desse íon (39). Transferrina é responsável pelo transporte do íon ferro entre as células eritropoiéticas, medula óssea, o sistema reticulo endotelial, baço, fígado, intestino e músculo (54). A haptoglobina se liga à hemoglobina presente resultante de hemólise no fluido tecidual e a transporta para o fígado (14, 18). Quando a haptoglobina tecidual de esgotar por um excesso de hemoglobina, essa é oxidada dissociando-se em globina e heme. A hemopexina, a qual possui uma maior afinidade por heme que albumina se liga à heme e a transporta para o fígado (32).

Somente uma pequena parte do ferro corporal está associada com a transferrina do fluido corporal e devido à alta constante de associação. A concentração do ion-férrico livre no fluido corporal é somente 10-18M (5). Entretanto, muitas das bactérias exigem acerca de 10-6M desse íon disponível para o seu crescimento, o que torna esse componente insuficiente nos tecidos para a exigência de crescimento bacteriano. Dessa maneira, para a obtenção do ion-férrico no tecido normal, as bactérias necessitam agentes ion-quelantes com uma constante de associação semelhante à da transferrina (54). A hemoglobina e heme livres, algumas vezes preenchem as necessidades nutricionais das bactérias (4, 8) e algumas espécies como *Bacteroides* e *Haemophilus* possuem total exigência de heme (10, 26).

Devido ao fato de que a disponibilidade de ion-férrico ou compostos que contenham esse componente, tal como a hemoglobina e heme serem um fator limitante para o crescimento bacteriano nos tecidos, a albumina, hemopexina, haptoglobina e transferrina possuem um importante papel na defesa do hospedeiro contra as infecções bacterianas, limitando o ion-férrico nutricional disponível para as bactérias invasoras dos tecidos (3, 5, 8, 53, 54). Assim se torna relevante o fato de que após

infecções agudas e lesões teciduais, os níveis de hemopexina e haptoglobina aumentam significantemente (1).

As bactérias patogênicas demonstram dificultar a capacidade do hospedeiro em reter o íon-ferrico nutricional, através de sistemas com alta afinidade para esse componente (54) ou pela sua degradação. Assim, demonstrou-se que a cepa de *B. asaccharolyticus* NCTC 9337 é capaz de degradar albumina, haptoglobina e transferrina (55). Baseando-se nesses conhecimentos preliminares, recentes investigações (6) nas quais cepas de *Bacteroides* foram examinadas com relação a suas habilidades de degradar albumina, haptoglobina, transferrina e hemopexina, demonstraram que cepas de *B. gingivalis* foram as mais ativas em degradar todas as proteínas plasmáticas citadas, em diferentes níveis. As cepas de *B. intermedius* e *B. asaccharolyticus*, mostraram atividades intermediárias com relação às proteínas individuais quando testadas. Cepas de *B. melaninogenicus*, *B. loeschesi* e *B. denticola* mostraram-se menos ativa, degradando somente hemopexina.

Embora o significado das recentes investigações relacionadas com a degradação de proteínas plasmáticas envolvidas no metabolismo de íon-ferrico não possam ser avaliadas satisfatoriamente, até que informações mais acuradas possam ser obtidas, particularmente, por exemplo, até que nível as várias espécies de *Bacteroides* possuem exigências nutricionais de heme, ou que outros compostos íons-ferrico possam satisfazer tais exigências, o conhecimento sobre a habilidade de determinadas cepas de *Bacteroides* em degradar heme-hemoglobina e íon-ferrico proteínas, contribui significativamente para a sua patogenicidade. A degradação de hemopexina e albumina por bactérias presentes em infecções mistas, favorece a competição para tais substâncias com relação ao heme disponível nos tecidos, assim como também a degradação de transferrina ou haptoglobina, no que concerne ao ferro ou hemoglobina. Tais mecanismos alteram significantemente a defesa do hospedeiro. A degradação de proteínas plasmáticas envolvidas no metabolismo do ferro pode também enfraquecer a proteção dos tecidos contra a produção de radicais-hidroxil catalisados por ferro ativados por leucócitos polimorfonucleares (9, 12, 56).

Referências Bibliográficas

1. Aronsen, K.F.; Ekelund, G.; Kindmark, C.D. & Laurell, C.B. - Sequencial changes of plasma proteins after surgical trauma. Scand. J. Clin. Lab. Investig., 29(suppl.), 124:127-136, 1971.
2. Attsron, R. & Schroeder, H.E. - Effect of experimental neutropenia on initial gingivitis in dogs. Scand. J. Dent. Res., 87:7-23, 1979.
3. Bezkorovainy, A. - Antimicrobial properties of iron-binding proteins. In: - Phillips, M.B.A., eds. - Diet and resistance to disease. Adv. Exper. Med. Biol. (New York), 135:139-154, 1981.
4. Bullen, J.J.; Rogers, H.J. & Griffiths, E. - Role of iron in bacterial infection. Cur. Topics in Microbiol. Immun., 80:1-35, 1978.
5. Bullen, J.J. - The significance of iron in infection. Rev. Intec. Dis., 3:1127-1139, 1981.
6. Carlsson, J.; Herman, B.J.; Höfling, J.F. & Sundqvist, G.K. - Degradation of the human proteinase inhibitors alpha-1-antitrypsin and alpha-2-macroglobulin by *Bacteroides gingivalis*. Infect. and Immun., 43:644-648, 1984.
7. Carlsson, J.; Höfling, J.F. & Sundqvist, G.K. - Degradation af albumin, haemopexin, haptoglobin and transferrin by black pigmented *Bacteroides* species. J. Med. Microbiol., 18:39-46, 1984.
8. Eaton, J.W.; Brandt, P.; Mahoney, J.R. & Lee, J.T. - Haptoglobin: a natural bacteriostat. Science, 215:691-693, 1982.
9. Fantone, J.C. & Ward, P.A. - Role of oxygen - derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. Am. J. Pathol., 107:397-418, 1982.
10. Gibsons, R.J. & MacDonald, J.B. - Hemin and vitamin K compounds as required factors for the cultivation of certain strains of *Bacteroides melaninogenicus*. J. Bacteriol., 80:164-170, 1980.

11. Griffé, M.B.; Patterson, S.S.; Miller, C.H.; Kafrawy, A.H. & Newton, C.W. - The relationship of *Bacteroides melaninogenicus* to symptoms associated with pulpal necrosis. *Oral surg.*, 50:457-461, 1980.
12. Gutteridge, J.M.C.; Patterson, S.K.; Segal, A.W. & Halliwell, B. - Inhibition of lipid peroxidation by the iron binding protein lactoferrin. *Biochem. J.*, 199:259-261, 1981.
13. Heimburger, N. - Proteinase inhibitors of human plasma: their properties and control functions. In: - Reich, E.; Rifkin, D.B. & Shaw, E., eds. - *Proteases and biological control*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, p.367-386, 1975.
14. Herskso, C. - The fate of circulating haemoglobin. *Brit. J. Haematol.*, 29:199-204, 1975.
15. Ingham, H.R.; Sisson, P.R.; Middleton, R.L.; Narang, H.K.; Codd, A.A. & Selkon, J.B. - Phagocytosis and killing of bacteria in aerobic and anaerobic conditions. *J. Med. Microbiol.*, 14:391-399, 1981.
16. Ingham, H.R.; Sisson, P.R.; Tharagonnet, D.; Selkon, J.B. & Codd, A.A. - Inhibition of phagocytosis "in vitro" by obligate anaerobes. *Lancet*, 2:1252-1254, 1977.
17. Janoff, A. - Mediators of tissue damage in leukocyte lysosomes. X - Further studies on human granulocyte elastase. *Lab. Invest.*, 22:228-236, 1970.
18. Jayme, M.F. & Moretti, J. - Haptoglobin: biochemical, genetic and physiopathologic aspects. *Prog. Hematol.*, 3:342-359, 1962.
19. Jeppsson, J.O. & Laurell, C.B. - Function and chemical composition of alfa-1-antitrypsin. In: - Reich, E.; Rifkin, D.B. & Shaw, E., eds. - *Proteases and biological control*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, p.405-414, 1975.
20. Jones, G.R. & Gemmel, C.G. - Impairment by *Bacteroides* species of opsonisation and phagocytosis of enterobacteria. *J. Med. Microbiol.*, 15:351-361, 1982.
21. Kantz, W.E. & Henry, C.A. - Isolation and classification of anaerobic bacteria from intact pulp chambers of non-vital teeth in man. *Arch. Oral Biol.*, 19:91-96, 1974.
22. Kilian, M. - Degradation of immunoglobulins A1, A2, and G by suspected principal periodontal pathogens. *Infect. Immun.*, 34:757-765, 1981.
23. Laurell, C.B. & Eriksson, S. - The electrophoretic alpha-1-globulin pattern of serum in alpha-1-antitrypsin deficiency. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 15:132-140, 1963.
24. Lazarus, G.S.; Daniels, J.R.; Brown, R.S.; Bladon, H.A. & Fullmer, H.M. - Degradation of collagen by a human granulocyte collagenolytic system. *J. Clin. Lab. Invest.*, 47:2622-2629, 1968.
25. Lev, M. - Apparent requirement for vitamin K of rumen strains of *Fusiformis nigrescens*. *Nature*, 181:203-204, 1958.
26. Lwoff, A. & Lwoff, M. - Role physiologique de l'hémine pour *Haemophilus influenzae* Pfeiffer. *Annales de L'Institut Pasteur*, 59:129-136, 1937.
27. Mac Donal, J.B.; Socransky, S.S. & Gibbons, R.J. - Aspects of the pathogenesis of mixed anaerobic infections of mucous membranes. *J. Dent. Res.*, 42(suppl.):529-534, 1963.
28. Mayrand, D. & Bride, B.C. - Ecological relationship of bacteria involved in a simple mixes anaerobic infection. *Infect Immun.*, 27:44-50, 1980.
29. Mayrand, D.; MC Bride, B.C.; Edwards, T. & Jensen, S. - Characterization of *Bacteroides asaccharolyticus* and *B. melaninogenicus* oral isolates. *Can. J. Microbiol.*, 26:1178-1183, 1980.
30. Morihara, K.; Tsuzuki, H. & Oda, K. - Protease and elastase of *Pseudomonas aeruginosa*: inactivation of human plasma alpha-1-proteinase inhibitor. *Infect. Immun.*, 24:188-193, 1979.
31. Moskowitz, R.W. & Heinrich, G. - Bacterial inactivation of human serum alpha-1-antitrypsin. *J. Lab. Clin. Med.*, 77:777-785, 1971.
32. Muller-Eberhard, V. & Morgan, W.T. - Phosphoprotein-binding proteins in serum. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 244:624-650, 1975.
33. Murphy, G.; Reynolds, J.J.; Bretz, V. & Baggiolini, M. - Collagenase is a component of the specific granules of human neutrophil leucocytes. *Biochem. J.*, 162:195-197, 1977.

34. Namavar, F.; Verveij, A.M.J.J.; Bal, M.; Van Steenbergen, T.J.M.; de Groaf & Mac Laren, D.M. - Effect of anaerobic bacteria on killing of *Proteus mirabilis* by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.*, 40:930-935, 1983.
35. Newman, M.G. - The role of *Bacteroides melaninogenicus* and other anaerobes in periodontal infections. *Rev. Infect. Dis.*, 1:313-323, 1979.
36. Ohlsson, K. - Polymorphonuclear leucocyte collagenase. In: - Woolley, D.E. & Evanson, J.M., eds., - Collagenase in normal and pathological connective tissues. New York, John Wiley & Sons, p.209-222, 1980.
37. Ohlsson, K. & Akesson, V. - Alpha-1-Antichymotrypsin interaction with cationic proteins from granulocytes. *Clin. Chim. Acta*, 73:285-291, 1976.
38. Ohlsson, K. & Ohlsson, I. - The neutral proteases of human granulocytes: isolation and partial characterization of two granulocyte collagenases. *Eur. J. Biochem.*, 36:473-481, 1973.
39. Putnam, F.W. - Alpha, beta, gamma, omega: the roster of the plasma proteins. In: - Putnam, F.W., ed. - The plasma proteins: structure, function and genetic control. New York, Academic Press, vol. 1, p.57-131, 1975.
40. Rindler-Ludwig, R.; Bretziv & Baggolini, M. - Cathepsin G: the chymotrypsin-like enzyme of human polymorphonuclear leukocytes. In: - Haveman, K. & Janoff, A. eds. - Neutral proteases of human polymorphonuclear leukocytes. Baltimore, Urban & Schwarzenberg, p.138-149, 1978.
41. Slots, J. - Subgingival microflora and periodontal disease. *J. Clin. Periodontal*, 6:351-382, 1979.
42. Slots, J. - Importance of black-pigmented *Bacteroides* in human periodontal disease. In: - Genco, R.J. & Mergenhagen, S.E., eds. - Host-parasite interactions in periodontal diseases. Washington, D.C., American Society for Microbiology, p.27-45, 1981.
43. Socransky, S.S. - Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. *J. Dent. Res.*, 49:203-222, 1970.
44. Socransky, S.S. & Gibbons, R.J. - Required role of *Bacteroides melaninogenicus* in mixed anaerobic infections. *J. Infect. Dis.*, 115:247-253, 1965.
45. Spiegel, C.A.; Hayduk, S.E.; Minah, G.E. & Krywolap, G.N. - Black pigmented *Bacteroides* from clinically characterized periodontal sites. *J. Periodontal Res.*, 14:376-382, 1979.
46. Starkey, P.M. & Barret, A.J. - Alpha-2-Macroglobulin, a physiological regulator of proteinase activity. In: - Barret, A.J., ed. - Proteinase in mammalian cells and tissues. Amsterdam, North-Holland Publishing, p.663-696, 1977.
47. Sundqvist, G. - Bacteriological studies of necrotic dental-pulps. Umeå; University of Umeå, 1976. (Thesis).
48. Sundqvist, G.K.; Carlsson, J.; Herman, B.F.; Höfbling, J.F. & Väistäinen, A. - Degradation "in vivo" of the C3 protein of guinea-pig complement by a pathogenic strains of *Bacteroides gingivalis*. *Scand. J. Dental Res.*, 92:14-24, 1984.
49. Sundqvist, G.; Eckerblom, M.I.; Larsson, A.P. & Sjögren, U.T. - Capacity of anaerobic bacteria from necrotic dental pulps to induce purulent infections. *Infect. Immun.*, 25:685-693, 1979.
50. Takazoe, I.; Tanaka, M. & Honma, T. - A pathogenic strain of *Bacteroides melaninogenicus*. *Arch. Oral Biol.*, 16:817-822, 1971.
51. Tanner, A.C.R.; Haffer, C.; Brattshall, G.T.; Visconti, R.A. & Socransky, S.S. - A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *J. Clin. Periodontal*, 6:278-397, 1979.
52. Tofte, R.W.; Peterson, P.K.; Schmeling, D.; Bracke, J.; Kim, Y. & Quie, P.G. - Opsonization of four *Bacteroides* species: role of the classical complement pathway and immunoglobulin. *Infection and Immunity*, 27:784-792, 1980.
53. Van Asbeck, E.D. & Verhoef, J. - Iron and host defense. *European J. Clin. Microbiol.*, 2:6-10, 1983.
54. Weinberger, E.D. - Iron and infection. *Microb. Rev.*, 42:45-66, 1978.
55. Werner, H. & Müller, H.E. - Immunoelektrophoretische Untersuchungen über die Einwirkung von *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia* und *Sphaerophorus* Arten auf menschliche Plasmaproteine. *Zbl Bakt. I Abt orig.*, 216:96-113, 1971.
56. Winterbourn, C.C. - Lactoferrin: catalysed hydroxyl radical production, additional requirement for a chelating agent. *Biochem. J.*, 210:15-19, 1983.

ATTACHMENT AND INTRACELLULAR PENETRATION OF CLASSIC ENTEROPATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI* INTO HEP-2 CELLS

João Ramos Costa Andrade

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

& Milden Rodrigues de Santa Rosa

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

Summary

Enteropathogenic *E. coli* (EPEC), serogroups O111:K58 and O55:K59 penetrate into the cell cytoplasm and seem to multiply intracellularly in Hep-2 cells as observed by electron microscopy. The most significant alterations in the cells were intense swelling and budding of the plasma membrane, suggesting an active endocytic process.

Resumo

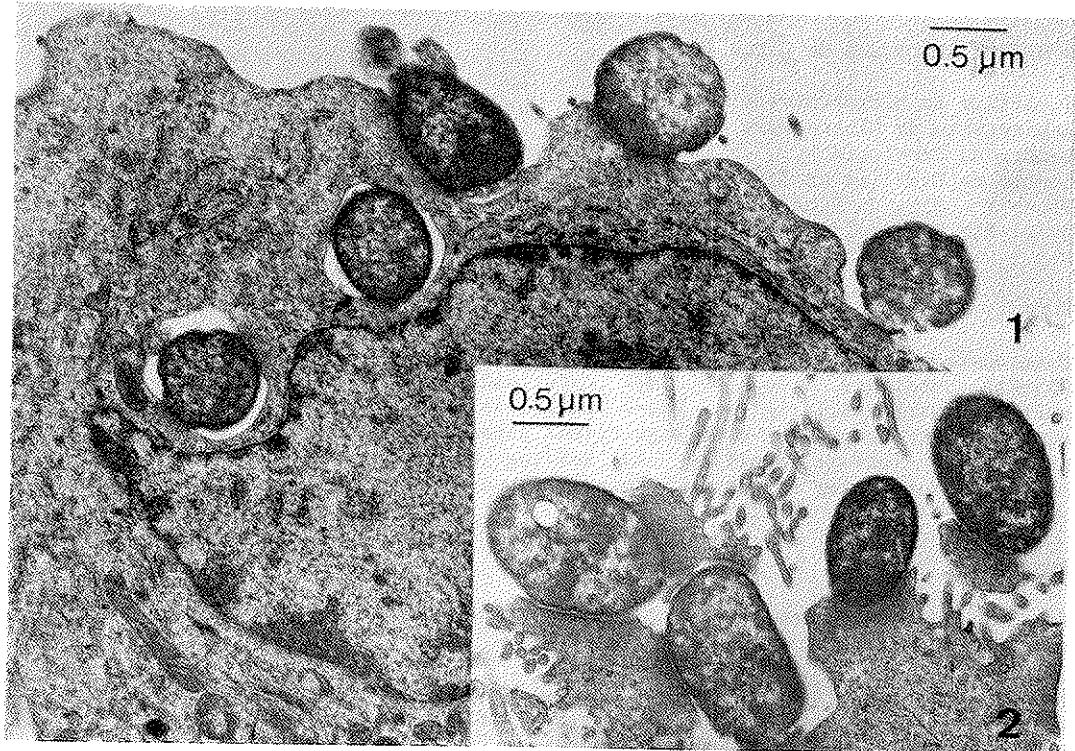
Aderência e penetração intracelular de *Escherichia coli* enteropatogênica clássica em células Hep-2

Com *E. coli* dos sorogrupo 0111:K58 e 055:K59 observa-se, através de microscopia eletrônica, penetração e provável multiplicação intracelular em células Hep-2. Foram detectadas alterações significativas da membrana citoplasmática das células, sugerindo um processo ativo de endocitose.

Enterotoxic and invasive mechanisms are involved with the intestinal virulence of *Escherichia coli*. However, with certain *E. coli* serogroups ("classic" or EPEC) frequently found as important agents of diarrheal disease in developing countries (W.H.O. - Bull. WHO, 58:23-36, 1980), the investigation of the ST and LT enterotoxins as well as invasive properties were systematically negative (Echeverria, P.D. & col. - J. Ped., 89:8-10, 1976; Levine, M.M. & col. - Lancet, i:1119-1122, 1978). Cytotoxic and enterotoxic properties, whose meaning in natural infection is not presently clear, were, however, described for some EPEC strains (Knowlchuck, J. & col. Infect. Immun., 18:775-779, 1977; Klipstein, F.A. & col. - Infect. Immun., 21:171-178, 1978; O'Brien, A.D. & col. - J. Infect. Dis., 146:763-769, 1982). A new approach on studying EPEC virulence evolved from histopathological observations either on animal models or from naturally infected humans. EPEC would adhere intimately to the enterocyte surface and effaced or dissolved the microvilli on the infected cells, leading to absorptive disturbances and diarrhoea as a result (Levine, M.M. & col. - Microbiol. Rev., 47:510-550, 1983).

Figure 1 - 2-hr *E. coli* EPEC 68 exposure. Several steps of internalization process are shown. Depressions on nuclear surface are evident near vacuoles enclosing bacteria.

Figure 2 - 2-hr *E. coli* EPEC 54 exposure. Contact area between cell surface and bacteria. Plasma membrane and cytoplasm are thickened beneath sites of bacterial attachment. Intense cell membrane proliferation with several digitiform projections adjacent to the attached EPEC. Cell membrane forms cups at the base of some attached bacteria. Union between bacterial cell wall and plasma membrane is separated by a continuous 100Å space.



In cell cultures, a microscopic aspect referred to as "localized adherence" (L.A.) was described (Nataro, J.P. & col. - Infect. Immun., 48:378-383, 1985). There were several paranuclear foci of bacterial multiplication on the surface of the cell. Our former observations indicated that the L.A. to Hep-2 cells was mediated by bacterial surface proteins with affinity for glycoproteic receptors on the cell membrane and indirect evidences were found supporting an internalization step on the so-called L.A. (Andrade, J.R.C. & Santa Rosa, M.R. - Rev. Microbiol. (S. Paulo), 17(2), 1986). In the present report we describe the electron microscopic confirmation of the intracellular localization of EPEC into Hep-2 cells. We used L.A. + EPEC strains 54 (O111:K58) and (O55:K59) and an L.A. - non-EPEC F-2 (O?:K?:H4). The bacterial strains were grown in conditions favourable to full expression of L.A. and inoculated in glass bottles with confluent monolayers of Hep-2 cells cultivated in Eagle-MEM (Gibco). After 15min (contact time) monolayers were washed twice with PBS-Dulbecco pH 7.2 (PBS-D) and fresh medium was added. At 2, 4 and 6h after inoculation, monolayers were washed with PBS-D and fixed in cold (4°C) 3% glutaraldehyde in 0.05M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) for 1h. Cells were gently scraped with a rubber policeman and washed with 9% saccharose in 0.05M cacodylate buffer (pH 7.2). Cell pellets were preincluded in agar, small blocks were cut and fixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated in graded series of alcohol, treated with 0.5% uranyl acetate and embedded in Polylite 8001.

Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined with Phillips EM 301 microscope, at 60–100 Kv. The *E. coli* EPEC were found in close association with the plasma membrane (PM) with a 100Å separation between cell wall and the PM. At points of contact the PM had an increase in density and was cupped along the adherent bacterium (Figure 1 and 2). As early as 2h penetration of EPEC into the cytoplasm of cells was seen, with individual bacteria enclosed by the PM in membrane-bound vacuoles or several bacteria enclosed by a unique large vacuole (Figure 1 and 4). Intracellular bacterial multiplication and bacteria laying free in the cytoplasm without membrane enclosure were also observed (Figure 4). Cellular alterations at 2h consisted of intense swelling and budding of PM, whose alterations frequently entangled cell adherent bacteria (Figure 2). At 6h severe ultrastructural alterations were observed, including desorganization of endoplasmic reticulum, ribosome dispersion, disappearance of mitochondria in cytoplasmic regions where bacteria accumulate and vacuolation, oedema and rupture of cristae in mitochondria localized in the neighborhood of the intracellular bacteria (Figure 5). For non-EPEC bacteria penetration into the cell cytoplasm or induction of cellular alterations were never found (Figure 3).

Penetration of bacteria into the cell cytoplasm and intracellular multiplication are significative steps of Hep-2 infection by EPEC. Alterations of the PM of infected cells suggest an intense endocytic process including active mobilization of the PM responsible, perhaps, by the formerly described microvilli loss in the EPEC-infected enterocytes. Current experiments are aimed at the definition of the roles of the bacteria and cells on the internalization process and at the significance of the observed process for EPEC virulence.

Figure 3 – 6-hr *E. coli* F-2 (non-EPEC) exposure. Microorganisms have attached to the plasma membrane without bacterial internalization or significant alterations of cell ultrastructure



Acknowledgements

The skillful technical assistance of Maria Angelica Pereira da Silva (Cell Culture Laboratory, SMI-UERJ) and Venício Féo da Veiga (Electronic Microscopy Laboratory, IM-UFRJ) are much appreciated. This work was supported by FINEP (Conv. FINEP-UERJ 4.3.85.0310.00).

Figure 4 - 6-hr *E. coli* EPEC 54 exposure. Bacteria are enclosed in membrane-bound vacuoles or lay free in the cytoplasm (arrows). Mitochondria are diminished in regions close to intracellular bacteria. Multiplication of intracellular microorganisms is shown on lower right side of picture.

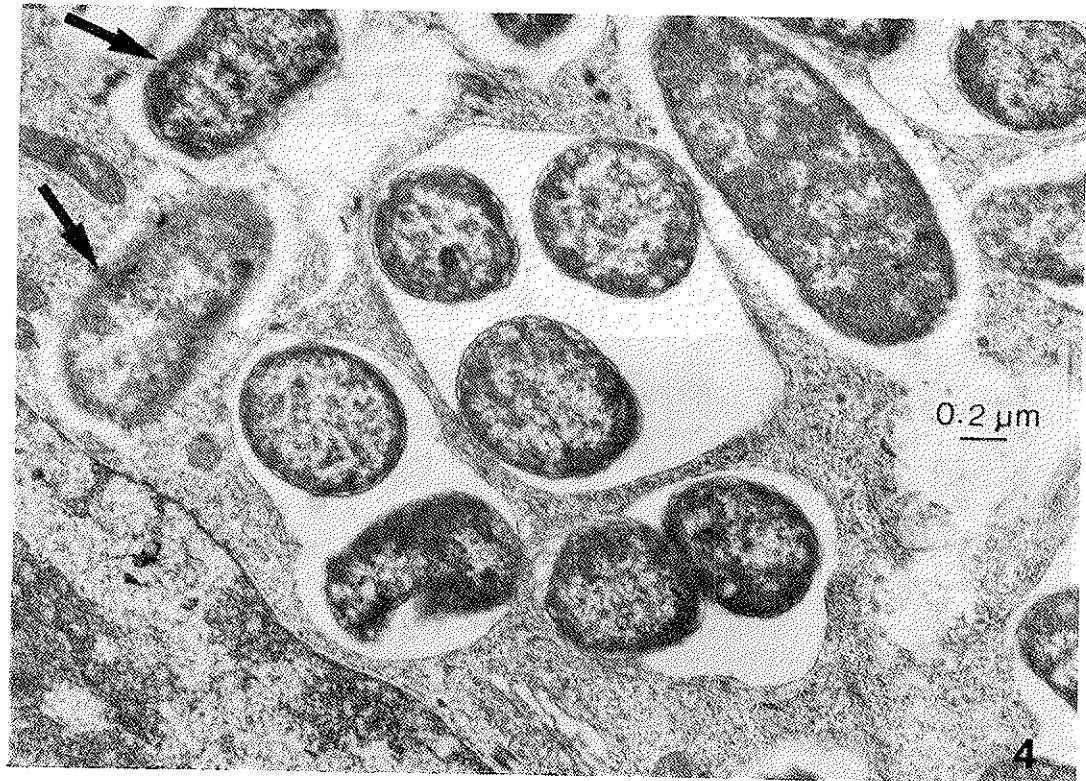
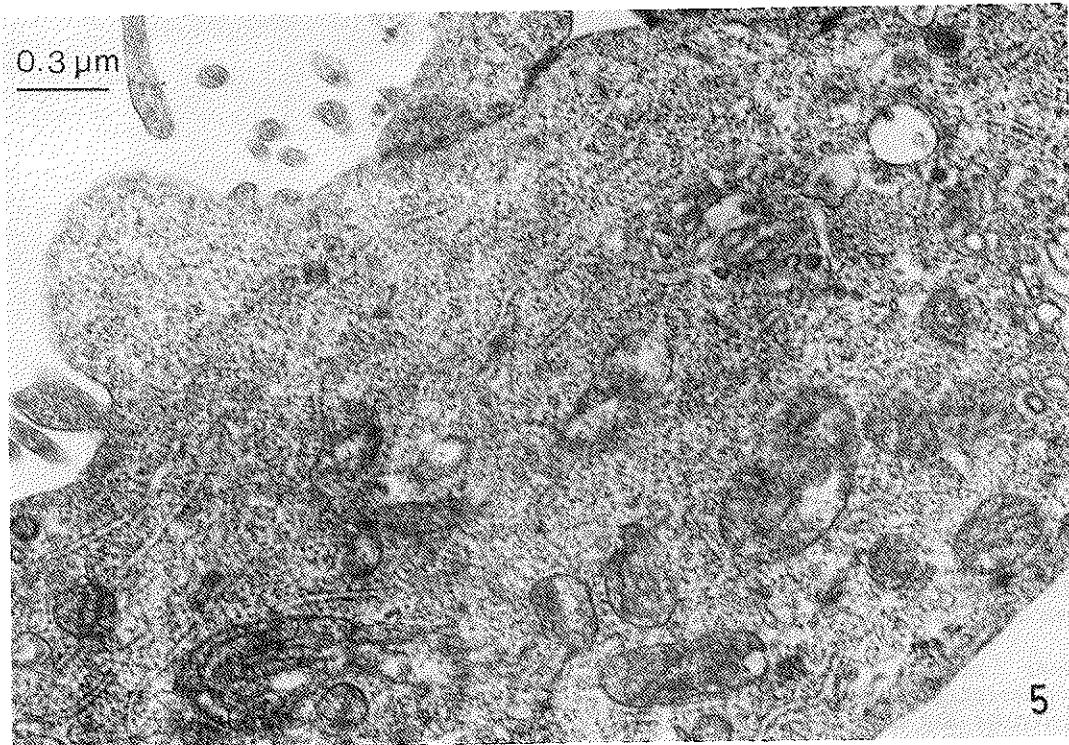


Figure 5 - 6-hr *E. coli* EPEC 68 exposure. Generalized alterations of endoplasmic reticulum and ribosome dispersion in cytoplasm. Degenerated mitochondria are evident with matrix clarification, rarefaction and rupture of cristae, oedema and rupture of external membrane.



PESQUISA DE YERSINIA ENTEROCOLITICA EM PACIENTES REUMATICOS.
II - SOROLOGIA*

Marise Dutra Asensi
 & Ernesto Hofer

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

Resumo

Foram analisados os níveis de aglutininas séricas anti *Yersinia enterocolitica* em 145 pacientes, apresentando clinicamente manifestações reumáticas e de 100 pessoas, sem processos reumáticos e/ou intestinais, caracterizadas como grupo controle. A avaliação foi realizada através de técnica de soro-aglutinação lenta, empregando-se抗igenos somáticos de sete sorotipos de *Y. enterocolitica* (0:3, 0:4, 0:5a, 0:5b, 0:6, 0:8, e 0:9). A análise estatística dos resultados revelou uma significância ($P<0,01$) de reagentes do grupo de pacientes (5,90%), em confronto com o grupo controle (2,70%).

Summary

Investigation of Yersinia enterocolitica in rheumatic human patients. II - Serology

Were analysed the antibodies levels anti-*Yersinia enterocolitica* in sera of 145 patients with rheumatic symptoms and in sera of 100 people without rheumatic or intestinal clinical manifestations, that was used as control group. The evaluation was made by the agglutination test in tubes (Widal), using somatic antigens of seven *Y. enterocolitica* serotypes (0:3, 0:4, 0:5a, 0:5b, 0:6, 0:8 and 0:9). The sera considered positive were those with titles 1/80. The statistic analysis of the results showed a significance ($P<0,01$) for the reagent group of patients with clinical rheumatic manifestations (5,90%) when challenged with the control group (2,70%).

Introdução

Yersinia enterocolitica, atualmente reconhecida como mais um agente de infecção intestinal, exteriorizando-se pelo quadro de gastroenterite aguda na criança, podendo ser acrescido pelas figuras clínicas de pseudo-apendicite ou ileite terminal e, de linfadenite mesentérica aguda (10, 13, 17).

* Parte da Tese de Mestrado do Curso de Pos-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz. Aprovada em dezembro de 1983.

Nas faixas etárias, entre 29 a 70 anos, alguns indivíduos, após o comprometimento entérico, manifestam fenômenos de hipersensibilidade, representados por eritema nodoso (2, 16), artrite reumatóide (3), poli-artrite crônica (7, 9), síndrome de Reiter (1, 12) e inflamação da parede do miocárdio e pericárdio, como formas similares à da febre reumática (3, 4).

De acordo com os sinais clínicos, o diagnóstico laboratorial poderá se concentrar no isolamento do microrganismo, através de coproculturas ou de outros métodos, assim como, pela soro-aglutinação. Esta, propicia ainda o conhecimento sobre a circulação de certos sorotipos numa área e/ou população.

A presente investigação se concentrou em analisar e confrontar o nível de aglutininas anti-*Versinia enterocolitica* nos pacientes com problemas reumáticos e naqueles não portadores dessas manifestações.

Material e Métodos

Origem e características dos pacientes - Foram analisados soros de 145 pacientes com manifestações reumáticas (grupo de reumáticos) e de 100 indivíduos que, clinicamente, não apresentavam sinais de gastrenterite e/ou alterações reumáticas (grupo controle). Os soros foram obtidos no Laboratório de Imunologia e Bacteriologia do Hospital das Clínicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (HCUERJ) e no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas Gaffrée e Guinle (HCGG), Universidade do Rio de Janeiro (UNI-RIO). As amostras do grupo controle, originaram-se apenas do HCUERJ.

Os pacientes doadores de soros foram submetidos a um estudo bacteriológico das fezes.

Preparação dos抗igenos bacterianos, segundo Hofer "in" Lázaro (6) - Foram utilizadas no preparo dos抗igenos, as amostras correspondentes aos sorotipos 0:3, 0:4, 0:5a, 0:5b, 0:6, 0:8 e 0:9, fornecidas pelo Prof. S. Winblad, Suécia.

Como etapa preliminar se fez o reconhecimento microscópico e o isolamento de colônias lisas, submetendo-as ainda aos testes da tripaflavina e de termo-estabilidade de da suspensão, com o intuito de selecionar as estirpes com total integridade do抗igeno somático.

Em seqüência, as amostras lisas, foram semeadas em ágar Müller-Hinton (Merck) contido em garrafas de Roux e incubadas a 29°C por 48 horas. O crescimento bacteriano, após a suspensão em 10ml de solução NaCl 0,85g% acrescido de 2g% de trifeniltetrazólio (Merck), foi transferido para tubos de centrifuga e incubados a 37°C por 4hs, período em que se observa a redução do substrato oxidado à formazana (coloração violeta). A seguir as suspensões sofreram lavagens por centrifugação (2500g x 20 min.) empregando-se como veículo, a solução salina fenolada glicerinada a 1%, onde eram mantidas por seis meses a 4°C.

Reação de aglutinação segundo Hofer, "in" Lázaro (6) - As suspensões antigenicas foram padronizadas no tubo 2 da escala de MacFarland, utilizando-se a solução salina fenolada a 1%. O método adotado para a reação抗igeno-anticorpo, constituiu na soro-aglutinação lenta ou em tubos (Widal), sendo a leitura realizada após a incubação do sistema a 37°C por 24 hs. Como título significativo adotou-se as diluições iguais ou superiores a 1/80.

Teste de anti-estreptolisina O - Os resultados das determinações do nível de ASLO foram obtidos em 48 soros de pacientes com problemas reumáticos, através dos dados fornecidos pelos Laboratórios de Imunologia do HCUERJ e do HCGG. Assinala-se que o referido teste não foi executado nos espécimes do grupo controle.

Resultados

As Tabelas 1 e 2 assinalam a distribuição numérica e percentual dos resultados encontrados na sorologia nos dois grupos, em presença dos diversos抗igenos somáticos de *Versinia enterocolitica*.

Tabela 1 - Distribuição numérica e percentual de soros reagentes aos diversos抗原os de *Versinia enterocolitica* no grupo dos pacientes reumáticos

Antígeno	Nível de aglutininas												Total	
	<1/20		1/20		1/40		1/80		1/160		1/320			
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%		
O:3	106	73,10	13	8,96	9	6,21	8	5,51	5	3,44	0	0	141	
O:4	99	77,34	21	16,40	4	3,12	4	3,12	0	0	0	0	128	
O:5a	110	75,34	14	9,58	13	8,90	5	3,42	0	0	0	0	142	
O:5b	105	73,94	8	5,63	13	9,15	12	8,45	0	0	0	0	138	
O:6	114	80,28	7	4,92	10	7,04	5	3,52	1	0,70	1	0,70	137	
O:8	105	72,91	14	9,72	12	8,33	7	4,86	2	1,38	0	0	140	
O:9	108	75,00	17	11,85	6	4,16	9	6,25	0	0	0	0	140	
Total	747	-	94	-	67	-	50	-	8	-	1	-	991	
Média	106,7	75,41	13,42	9,58	9,57	6,70	7,14	5,01	1,14	0,78	0,28	0,10	141	

Verifica-se um índice de positividade acentuado para os níveis de aglutininas iguais ou menores que 1/20 e a medida que a diluição aumenta, os percentuais são mais evidentes para o grupo reumático, principalmente, com relação aos抗原os O:4, O:5b, O:6 e O:8. O maior título obtido foi de 1/320, no grupo reumático (43P) para o抗原o O:6.

Considerando-se os soros de indivíduos com título maiores ou iguais a 1/80 e menores ou iguais a 1/40, a análise estatística efetuada pelo teste do qui-quadrado, expressa uma significância a nível de $P<0,01$, ou seja, há uma diferença estatisticamente significativa nos dois grupos.

Na correlação do teste do ASLO frente ao título maior que 1/20 para *V. enterocolitica* (Tabela 3), destaca-se que 35 amostras, negativas para o ASLO, 25,7% foram positivas para *Versinia*. Além disso, observa-se um percentual maior (65,30%), na correlação ASLO positivos para *Versinia* negativos. Não houve diferença significativa nível de $P<0,01$.

Discussão

As várias formas clínicas da infecção por *Versinia enterocolotica* na espécie humana, podem ser caracterizadas laboratorialmente através da tentativa de isolamento de espécimes clínicos, assim como, pela soro-aglutinação (16). Esta além de se constituir em importante e rotineiro método de diagnóstico, possibilita também o conhecimento sobre a circulação de certos sorotipos que podem sensibilizar uma população (15).

Com referência aos níveis de aglutininas encontrados (Tabelas 1 e 2), destaca-se o elevado percentual de soros reagentes com títulos iguais ou menores que 1/20, indiferentemente nos dois grupos. Provavelmente, isto decorra do problema das reações cruzadas advindas da sensibilização dos hospedeiros por抗原os comuns de outros membros da família Enterobacteriaceae, constituintes da microbiota normal. Todavia, quando se considera a orientação de Winblad (16), que reconhece como positivos, os títulos iguais ou superiores a 1/80, os percentuais médios retratam 5,89 e 2,70% para os grupos de pacientes reumáticos e controle, respectivamente. A análise estatística evidenciou que foi mais significante a positividade de soros reagentes no grupo reumático em confronto ao de controle, o que até certo ponto fortalece a suposição de Kalliomaki & Leino (3) e Aho & col. (1) de uma possível associação das infecções por *Versinia* no desenvolvimento de certas manifestações reumáticas. Em contraposição, Lopes & Falcão (8) assinalam nas 559 amostras séricas provenientes do grupo de "Provas Reumáticas" uma positividade em torno de 1%, para os抗原os O:3, O:9 e ausência de soros reagentes para o sorotipo O:8.

Tabela 2 - Distribuição numérica e percentual de soros reagentes aos diversos抗原os de *Yersinia enterocolitica* no grupo controle

Antígeno	Nível de aglutininas										Total	
	<1/20		1/20		1/40		1/80		1/160			
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%		
O:3	77	79,38	9	9,27	8	8,24	2	2,06	1	1,03	97	
O:4	74	74,00	12	12,00	11	11,00	3	3,00	0	0	100	
O:5a	85	87,68	10	10,30	1	1,03	1	1,03	0	0	97	
O:5b	77	79,38	13	13,40	3	3,09	3	3,09	1	1,03	97	
O:6	69	77,52	10	11,23	8	8,98	1	1,23	1	1,23	89	
O:8	66	75,00	11	12,50	6	6,81	3	3,40	2	2,27	88	
O:9	75	85,22	8	9,09	5	5,68	0	0	0	0	88	
Total	523	-	73	-	42	-	-	-	-	-	656	
Média	74,7	79,74	10,4	11,11	6,40	6,40	1,97	1,97	0,71	0,79	93,7	

Tomando por base o título de 1/160, notou-se que no grupo de pacientes, predominaram os soros reagentes para os抗原os O:3, O:8 e O:6, diferenciando-se apenas do controle, pela inversão de frequência dos dois primeiros sorotipos e pela presença de reagentes ao O:5.

A análise dos resultados, demonstra a acentuada disseminação do sorotipo O:3 no hospedeiro humano, caracterizado como cosmopolita, de acordo com as observações realizadas por vários autores (10, 14, 15). Entretanto, a inusitada frequência de soros reagentes para O:8, não encontra uma explicação em decorrência dos resultados negativos obtidos no inquérito sorológico de Lopes & Falcão (8) aliado a ausência de isolamentos referidos em nosso meio.

Quanto aos resultados do teste de ASLO (Tabela 3), é interessante focalizar o comportamento de que os soros reagentes para *Y. enterocolitica* apresentando reatividade na prova de ASLO, particularmente na amostragem com títulos acima de 1/80, representados por cinco amostras (10,20%) em um lote de 17 positivos. Salienta-se que esta particularidade foi reconhecida por Winblad (19) em 69 pacientes com eritema nodoso associado a *Y. enterocolitica* em que 13% dos indivíduos também revelaram positividade no teste de anti-estreptolisina O. Da mesma forma, depois, Vandepitte & DeGreef (3), verificaram que três pacientes em oito, com eritema nodoso atribuído à *Yersinia* tinham ASLO positivo.

Segundo a análise estatística realizada neste caso, uma situação ficou bem evidente, isto é, não houve significância a nível de $P<0,01$, caracterizando que um paciente com anti-estreptolisina O positiva, não implica necessariamente que a sor-aglutinação para Ye, tenha que ser negativa ou vice-versa. Apesar dos relatos da literatura, este fenômeno é bastante discutido e controvérsio, formulando-se duas hipóteses, como uma tentativa para explicá-lo: presença de reatores falso-positivos no teste de ASLO, ou melhor, indivíduos normais reagentes (2) e como outra conjectura, não se descarta a possibilidade da ocorrência de infecções mistas.

A complexidade do problema de imputar determinados agentes etiológicos pelo desenvolvimento de processos reumáticos ainda é uma grande incógnita. Assim, Laitinen, Ierisalo & Allander (4) destacaram que no diagnóstico da febre reumática, devem ser avaliados certos sinais clínicos sempre associados a determinadas variáveis laboratoriais. Entre as características clínicas de maior significância na febre reumática, assinalam a poli-artrite e a cardiopatia, mas alertam que tais alterações também são observadas em quadros de artrite reativa determinados por *Y. enterocolitica*.

Na presente investigação, encontram-se dois casos bem típicos (43P e 102P) quanto aos aspectos supramencionados. Em ambos, foi possível o isolamento de *Y. enterocolitica* a partir das fezes, sendo que no primeiro caso (43P), um paciente com valvulopatia reumática, detectou-se um nível de aglutininas de 1/320, compatível de infecção aguda por *Yersinia*. No segundo (102P), com história clínica de processo crônico de poli-artrite, obteve-se um título baixo para *Yersinia* 1/40, o que provavelmente implicaria na caracterização de um estado de portador. Salienta-se que, ambos apresentaram 200UT no teste de ASLO.

Tabela 3 - Correlação do teste de Anti-Estreptolisina O e reagentes para *Yersinia enterocolitica* com títulos superiores a 1/20.

Símbolos: χ^2 - calculado = 0,76; χ^2 - tabelado = 6,63; gl = 1; P < 0,01

Anti-estreptolisina O	Soros reagentes para <i>Yersinia enterocolitica</i>					Total
	+	-	+	-	Total	
+	17	34,69	32	65,30	49	
-	9	25,71	26	74,28	35	
Total	26	-	58	-	84	

Com relação ao paciente 124P, assegura-se que se tenha uma condição idêntica ao 102P, com exceção do ASLO, que foi negativo, é provável que nesta situação a causa primária do quadro estivesse relacionada à ação de *Y. enterocolitica*, embora não se tenha tido a confirmação sorológico.

Quanto ao paciente 184P, questiona-se a ação exercida por *Yersinia*, tendo em vista que o sorotipo O:13, não tinha sido até então, relacionado a casos de infecção, e também, pela evidência de um título elevado na prova do ASLO, fato comumente referido na literatura (5, 16). Diante da circunstância delineada, sugere-se uma infecção de natureza mista, ainda mais alicerçada pelo relato de Toma & col. (14), que responsabilizam o mencionado sorotipo como patogênico para espécime humana.

Nos resultados do grupo controle, excetuando-se o soro 62C, em que foi caracterizado o sorotipo O:5, os demais evidenciaram grupos até o momento não relacionados com problemas patológicos na espécie humana. É possível, que todos os achados de *Yersinia* desta amostragem possam ser enquadrados como meramente fortuitos.

Mediante a análise dos resultados, entende-se que a associação de infecção por *Y. enterocolitica* e o aparecimento de processos reumáticos ainda se caracteriza como pouco substancial e para obtenção de resultados mais conclusivos, seria necessário o acompanhamento clínico-laboratorial dos pacientes, durante alguns anos, ou ainda, o estudo sequencial desde o processo entérico até a fase do aparecimento de manifestação reumática.

Agradecimentos

Aos Drs. Rogério Lorena de Oliveira e Adir Nazareth Callado da Universidade do Rio de Janeiro (UNI-RIO) e aos Profs. Italo Suassuna, Alexandre Adler e Lúcia Helena Vilella do Serviço Microbiologia e Imunologia e do Hospital das Clínicas da UERJ, pelas facilidades propiciadas na colheita do material e ao Prof. Luiz Cesar Zambolini da UFF, pela análise estatística efetuada.

Referências Bibliográficas

1. Aho, K.; Ahonen, P.; Lassus, A.; Sievers, K. & Tillikainen, A. - HIA 27 in reactive arthritis a study of *Yersinia* arthritis and Reiter's disease. Arthr. Rheum., 17:521-526, 1974.
2. Debois, J.; Vandepitte, J. & Degreef, H. - *Yersinia enterocolitica* as a cause of erythema nodosum. Dermatologica, 156:65-78, 1978.
3. Kalliomaki, J.I. & Leino, R. - Follow-up studies of joint complications in *Yersiniosis*. Acta Med. Scand., 205:521-525, 1979.
4. Iaitinen, O.; Ierisalo, M. & Allander, E. - Rheumatic fever and *Yersinia* arthritis criteria and diagnostic problems in changing disease pattern. Scand. J. Rheumatol., 4:145-157, 1975.
5. Iaitinen, O.; Tuuhe, J. & Ahonen, P. - Polyarthritis associated with *Yersinia enterocolitica* infection: clinical features and laboratory findings in nine cases with severe joint symptoms. Ann. Rheum. Dis., 31:34-39, 1972.
6. Lázaro, N.S. - Reações sorológicas cruzadas entre *Yersinia enterocolitica* sorotipo 9 e *Brucella* sp. em bovinos e suínos. Belo Horizonte, Escola Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 1980. (Tese de Mestrado).

7. Leading Article - *Polyarthritides et Yersinia enterocolitica*. Brit. Med. J., 2:404-405, 1975.
8. Lopes, M.A. & Falcão, D.P. - Aglutininas anti-Yersinia enterocolitica e anti-Yersinia pseudotuberculosis em soros humanos. Rev. Microbiol. (S. Paulo), 11:34-40, 1980.
9. Legoux, J.L.; Legoux A.; Portier, H.; Maufoux, C. & Cortet, P. - *Yersinia enterocolitica*: un germe à rechercher devant toute diarrhée fébrile avec erythème noueux. Gastroenterol. Clin. Biol., 4:730-731, 1981.
10. Mollaret, H.H. - L'infection humaine à *Yersinia enterocolitica*. Pathol. Biol., 14:981-990, 1966.
11. Olhagen, B. - Post infective or reactive arthritis. Scand. J. Rheumatol., 9:193-202, 1980.
12. Solem, J. & Lassen, J. - Reiter's disease following *Yersinia enterocolitica* infection. Scand. J. Infect. Dis., 3:83-85, 1971.
13. Swaminathan, B.; Harmon, M.C. & Mehlman, I.J. - A review: *Yersinia enterocolitica*. J. Appl. Bacteriol., 52:151-183, 1982.
14. Toma, S.; Wauters, G.; MacClure, M.H.; Morris, G.K. & Weissfield, A.S. - O:13a, 13b, a new pathogenic serotype of *Yersinia enterocolitica*. J. Clin. Microbiol., 20:843-845, 1984.
15. Wauters, G. - Contribution à l'étude de *Yersinia enterocolitica*. Thèse d'agrégé de l'enseignement supérieur. Belgique, Université Catholique de Louvain, 1970.
16. Winblad, S. - Erythema nodosum associated with infection with *Yersinia enterocolitica*. Scand. J. Infect. Dis., 1:11-16, 1969.
17. Winblad, S. - The clinical panorama of human yersiniosis enterocolitica. Cont. Microbiol. Immunol., 2:129-132, 1973.

ESTREPTOCOCOS BETA-HEMOLÍTICOS E NÍVEIS SÉRICOS DE ANTIESTREPTOLISINA "O" EM COMUNIDADE RURAL, AMÉRICO BRASILIENSE SP, 1981

Clara Pechmann Mendonça

Deptº de Ciências Bio-Clínicas
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara Unesp
 Caixa Postal 331
 14800 Araraquara SP, Brasil

Carlos Solé-Vernin

Deptº de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia
 Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto USP
 Campus de Ribeirão Preto
 14100 Ribeirão Preto SP, Brasil

& Maurício Zangrandino Nogueira

Serviço Especial de Saúde de Araraquara SESA
 Rua Itália, 1533
 14800 Araraquara SP, Brasil

Resumo

Investigou-se a presença de estreptococos beta-hemolíticos e os níveis séricos de antiestreptolisina "O" (ASO) em comunidade rural dividida em duas populações: escolar e familiar. O estudo da população escolar revelou a presença de 61,8% portadores de estreptococos beta-hemolíticos, com predominância do grupo A e do padrão T11/14 seguido do T4 e do T8/25/Imp.19. A dosagem da ASO revelou 64,6% escolares com títulos abaixo de 250UT; 27,7% com títulos entre 250 e 333UT e 17% acima de 500UT. A média encontrada foi de 262UT. A população familiar revelou 47% de portadores de estreptococos com predominância do grupo G. Entre os portadores do grupo A houve predominância do padrão T8/25/Imp.19, seguido do T4 e T11/14. Nesta população 79,3% tiveram níveis de ASO abaixo de 250UT; 14,6% resultados entre 250 e 333UT e 6,1% de 500 UT. A média encontrada foi de 187UT. Nas populações em estudo houve simultaneidade de 60,8% entre grupos sorológicos de estreptococos e 43,2% entre sorotipos do grupo A. Verificou-se uma correlação significativa entre os dados clínicos, respostas afirmativas ao questionário proposto, presença de estreptococos beta-hemolíticos e níveis séricos de ASO acima da anormalidade.

Summary

Beta hemolytic streptococci and serum levels of ASO in a rural community, Américo Brasiliense SP, 1981

Rev. Microbiol., São Paulo, 17(1):64-70, Jan./Mar. 1986.

Research was carried out on the presence of beta-hemolytic streptococci and on serum levels of ASO in a rural community divided into school and home populations. The school populations (150 children), revealed the presence of 61,8% carriers of streptococci in 131 of the children examined, with predominance of group A strains and T pattern T11/14, followed by T4 and T8/25/Imp.19. ASO determinations in 141 children, revealed 64,6% with titers below 250UT, 27,7% with titers between 250 and 333UT, and 17,7% higher than 500UT. The average value was 262UT. In 183 family members of the home population (44 families, 220 persons) the results showed that 47% were carriers with the group G strains predominating. Among group A carriers the T pattern T8/25/Imp.19 predominated, followed by T4 and T11/14. Of 164 people of the same population, 79,3% had ASO serum levels below 250UT, 14,6% between 250 and 333UT and 6,1% higher than 500UT. The average value was 178UT. Both populations showed 60,8% of simultaneity between serologic groups of streptococci and 43,2% between of T patterns of the group A strains. There was a significant relation between the clinical data, positive answers to the questions that were asked presence of beta-hemolytic streptococci and serum levels of ASO above normal values.

Introdução

Há intensa relação entre infecção por estreptococos beta-hemolíticos, especialmente os do grupo A de Lancefield (*Streptococcus pyogenes*), resposta imunológica a este agente microbiano e a incidência da doença reumática. Há, também, evidente relação com variáveis do ambiente, especialmente a promiscuidade (1, 13).

A alta incidência de portadores de estreptococos beta-hemolíticos foi demonstrada em nosso meio, com referência especial a menores em condições normais de saúde, no ato da coleta do material (3, 10, 15, 17).

As infecções respiratórias na infância, de 5-25% são ocasionadas por *Streptococcus pyogenes* e são comuns as reinfecções sem sintomatologia aparente.

O objetivo deste estudo é verificar a presença de portadores de estreptococos beta-hemolíticos e o nível sérico de anti-estreptolisina "O" em uma comunidade rural, praticamente fechada, de condições sócio-econômicas reduzida; relacionar os achados entre escolares e grupos familiar e correlacionar esses resultados com os obtidos no exame clínico e os de dados dos antecedentes pessoais.

Material e Métodos

População estudada - Constituída de adultos, jovens e crianças, de ambos os sexos, de diferentes raças, residentes em zona rural, na sede da Usina de Açúcar e Álcool (Usina Santa Cruz) em Américo Brasiliense, SP.

A comunidade foi dividida em duas populações. A primeira denominada "Escolar", constituída de 150 alunos matriculados na Escola da Usina, com idade variável de 5 a 14 anos e que frequentavam normalmente as aulas. A segunda, denominada "Familiar", constituída de 220 pessoas que faziam parte de 44 famílias dos escolares.

Da primeira população foram levantados 131 escolares para estreptococos e 141 à dosagem de antiestreptolisina "O" (ASO). Da segunda, respectivamente 183 e 164. Neste grupo 95 eram menores de 15 anos e 88 de 16 a 74 anos.

Exame clínico - Realizado apenas na população "Escolar", para os itens frequência e ausculta cardíaca, pressão arterial, nódulos sub-cutâneos, conservação dos dentes e estado da orofaringe.

Tabela 1 - Estreptococos beta-hemolíticos encontrados em 167 portadores.

Símbolos: * = N, nariz; G, garganta; ** = N° de amostras isoladas; *** = A diferença entre o total de portadores e de amostras deve-se ao fato de que de alguns isolaram-se mais de um grupo sorológico

Grupo sorológico	Origem do material	População		Total
		Escolar	Familiar	
A	N*	4**	3	7
	G	31	31	62
Total portadores	N e G	9	4	13
Total amostras		44	38	82***
		53	42	95
G	N	1	3	4
	G	5	3	8
Total portadores	N e G	2	0	2
Total amostras		8	6	14***
		10	6	16
G	N	1	4	5
	G	30	36	66
Total portadores	N e G	4	8	12
Total amostras		35	48	83***
		39	56	95

Isolamento e identificação do estreptococos - Para isolamento, o material foi coletado da orofaringe e vestíbulo nasal, através de zaragatoa umedecida em solução fisiológica. Em um único dia foram coletadas 262 espécimes de "Escolar" e, cinco dias após, também num único dia, 366 espécimes da população "Familiar". A metodologia bacteriológica e sorológica foi a mesma utilizada em outra investigação de campo (10).

Determinação da antiestreptolisina "O" - O sangue para as dosagens foram coletadas por punção venosa, semanalmente, no período de 6 semanas, de acordo com a possibilidade de sua imediata realização. Nem sempre foi possível obter amostras de pacientes em jejum, porém todos os soros quilosos, hemolisados ou os contaminados foram recoletados.

A técnica usada foi de Rantz-Randall (14) com a estreptolisina liofilizada e titulada (Bio-Mérieux) todas da mesma série.

Considerou-se, como valores normais, títulos de ASO abaixo de 250UT; como suspeitos, títulos entre 250 e 333UT e elevados, títulos iguais ou superiores a 500UT (2).

Quando os títulos de ASO se encontravam acima da normalidade, absorveu-se as beta-lipoproteínas com heparina e cloreto de cálcio, para maior segurança na interpretação dos resultados e especificidade do teste (4, 9).

Tabela 2 - Classificação sorológica de estreptococos do grupo A isolados das populações - Escolar e Familiar.

Símbolos: * = NT, não tipificável

Padrão T	População					
	Escolar		Familiar		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
11/14	15	28,3	8	19,0	23	24,2
14	4	7,5	6	14,3	10	10,5
11	1	1,9	0	0	1	1,0
13/B3264/12/14	1	1,9	0	0	1	1,0
12	1	1,9	0	0	1	1,0
3/13/B3264	5	9,4	0	0	5	5,3
28/11/14	1	1,9	1	2,4	2	2,1
28	2	3,8	0	0	2	2,1
8/25/Imp.19	3	9,4	11	26,2	16	16,8
8/25	0	0	1	2,4	1	1,0
4	10	18,9	9	21,4	19	20,0
1	2	3,8	0	0	2	2,1
NT*	6	11,3	6	14,3	12	12,6

Tabela 3 – Estreptococos beta-hemolíticos comuns entre população Escolar e Familiar.

Símbolos: * = Grupos sorológicos diferentes num mesmo indivíduo

População	Nº de pessoas na família	Grupo sorológico	Outros grupos	Negativos	Simultaneidade (%)
Escolar	Familiar				
3	2	A	G - 3	3	45,5
1	1	A	G - 4	2	25,0
1	1	A	C - 1	0	66,7
1	2	A	-	1	75,0
2	2	A	-	1	80,0
3	4	A	G - 1*	-	100,0
1	2	A	C - 1	2	50,0
2	2	A	-	2	66,7
1	2	A	-	2	60,0
1	4	A	G - 2	0	71,4
3	2	A	G - 1 C e C*	3	55,6
1	1	A	G - 3	2	28,6
1	2	A	G - 1	1	60,0
1	1	A	G - 2	1	40,0
1	1	G	C e A - 1	4	28,6
1	4	G	A* - 1	1	83,3
1	2	G	A - 3	4	30,0
3	2	G	-	1	83,3
2	5	G	-	1	87,5
1	3	G	-	1	80,0
1	2	G	C - 1	3	42,9
4	4	G	A - 1*	-	100,0
1	2	G	-	2	60,0
1	1	G	-	3	40,0

Resultados

Dos 131 "escolares" examinados, 81 (61,8%) foram portadores de estreptococos beta-hemolíticos no nariz, garganta ou nariz e garganta, isolando-se 102 amostras de estreptococos do grupo A, C e G (Tabela 1).

Dos 183 membros "familiais" examinados, 86 (47,0%) apresentaram estreptococos beta-hemolíticos no nariz, garganta ou nariz e garganta, com 104 amostras (Tabela 1).

A positividade maior incidiu na faixa etária de 1 a 15 anos, com 53 menores (61,6%).

Entre os escolares, houve predominância de estreptococos do grupo A com 53 (52,9%) amostras em 44 portadores. Na população familiar houve predominância de estreptococos do grupo G com 56 (53,8%) amostras em 48 portadores. Coincidemente houve igual número de amostras do grupo A e G entre as populações escolar e familiar.

A pesquisa da proteína T, entre as amostras isoladas de escolares, revelou a predominância do padrão T11/14 (28,3%) seguido do T4 (18,9%) e T8/25/Imp. 19 (9,4%). Entre a população familiar, 38 pessoas apresentaram-se como portadoras de estreptococos do grupo A (42 amostras) com predominância do padrão T8/25/Imp. 19 (26,2%), seguido do T4 (21,4%) e T11/14 (19,0%). No total das amostras (Tabela 2), houve predominância do padrão T11/14 (24,2%).

Das 95 amostras do grupo A, obtidas entre as populações em estudo, 12 (12,6%) não foram tipadas com os soros usados. Foi isolada uma amostra com o padrão incomum T13/B3264/12/14, diferente da habitualmente encontrada do padrão T1/3/13/B3264.

Das 44 famílias examinadas, 24 (54,5%) apresentaram relacionamento do mesmo grupo sorológico com o escolar com simultaneidade de 60,8%. Entre as 20 famílias restantes, em seis não se isolou estreptococos beta-hemolíticos; nas demais 14, foram isolados, de alguns dos seus membros, estreptococos de outros grupos que não o do escolar (Tabela 3). Em oito famílias houve simultaneidade de 43,2% de sorótipos do grupo A com o escolar (Tabela 4).

Dos 141 escolares, submetidos à dosagem da ASO, 77 (54,6%) tiveram títulos abaixo de 250UT; 39 (27,7%) títulos considerados suspeitos (250-333UT) e 25 (17,7%) títulos acima de 500UT. A média encontrada foi de 262UT.

Tabela 4 - População Escolar e Familiar com simultaneidade de padrão T de estreptococos do Grupo A

Padrão T	Escolar	Familiar	Nº pessoas na família	Simultaneidade (%)
11/14	1	2	6	50,0
11/14	1	3	7	57,1
11/14	1	1	4	50,0
11/14	2	1	11	27,3
4	1	1	7	28,6
8/25/Imp.19	1	2	9	33,3
8/25/Imp.19	1	2	5	60,0
8/25/Imp.19	1	1	5	40,0

Dos 164 participantes da população familiar que se submeteram à dosagem da ASO, 130 (79,3%) tiveram títulos abaixo de 250UT; 24 (14,6%), títulos entre 250 e 333UT e 10 (6,1%), títulos acima de 500UT. A média foi de 178UT.

Na população escolar isolou-se de 12 menores entre os 25 com títulos elevados de ASO, estreptococos do grupo A; de seis estreptococos do grupo G e, de sete menores, não se isolou estreptococos ou mesmo não foram submetidos à pesquisa. Dentre os 39, com resultados considerados suspeitos (250-333UT), 15 eram portadores de estreptococos do grupo A; 11 do grupo G; três do grupo C e 10 não eram portadores ou não foram submetidos à pesquisa.

Na população familiar, das 10 pessoas, com títulos elevados de ASO, três eram portadores do grupo A; duas do grupo G; uma do grupo C e sete não eram portadores ou não haviam se submetido à pesquisa. Dentre os 24 considerados suspeitos, 12 eram portadores do grupo A, cinco do grupo G; uma do grupo C e seis não eram portadores ou não haviam se submetido à pesquisa. Neste grupo de população, entre os menores de 15 anos, 25 (31,6%) tiveram resultados acima de 250UT enquanto que entre os maiores, apenas 9 o tiveram.

Os resultados do exame clínico realizado entre os escolares portadores de estreptococos e/ou níveis séricos de ASO acima do normal revelaram dados importantes como ausculta cardíaca patológica; frequência cardíaca anormal; pressão arterial anormal; gânglios hipertróficos; dores articulares; amígdalas hipertróficas.

Quanto ao questionário apresentado à população familiar, entre os portadores de estreptococos beta-hemolíticos e/ou com níveis séricos de ASO anormais, verificou-se que problemas como faringite, impetigo, dores articulares, corea, problemas renais foram as afirmativas mais frequentes.

A Tabela 5 abrange um grupo de 47 escolares que, no momento da coleta de material, apresentava inflamação da vias aéreas superiores. Destes menores, 74,5% revelaram a presença de estreptococos beta-hemolíticos e tiveram uma média de ASO de 331UT.

Discussão

Os resultados demonstraram alta incidência de indivíduos portadores de estreptococos beta-hemolíticos no nariz, garganta ou nariz e garganta, devendo-se em parte, às técnicas de isolamento utilizadas (8, 16, 18).

A comunidade estudada reside em local de alta poluição ambiental (resíduos da própria usina) e tem enfrentado numerosos problemas, especialmente ligados às vias aéreas superiores, embora venha recebendo boa assistência médica e social. Considerando-se a comunidade dividida em população "Escolar e Familiar", verificou-se que a incidência de estreptococos foi mais elevada na primeira população, com prevalência de amostras do grupo A, enquanto que entre os familiais prevaleceu o grupo G.

Tabela 5 - Grupos sorológicos dos estreptococos beta-hemolíticos e níveis séricos de ASO na população Escolar com infecção nas vias aéreas superiores. * Nº de portadores com o título indicado

Grupo sorológico	Portadores		Níveis de ASO (UT)			Nível sérico médio
	Nº	%	<250	250-333	>500	
A	19	40,0	3*	8	8	406
C	1	2,1	1	0	0	166
G	12	25,5	3	7	2	336
A e G	2	4,3	1	0	1	499
C e G	1	2,1	0	1	0	250
Ausência	12	25,5	8	2	2	198

Para vários investigadores, é certa a comunicabilidade das infecções estreptocócicas nas coletividades, especialmente no meio familiar. Isso tem sido motivo maior, também, das reinfecções em geral de outros tipos específicos (8, 11). Martini & col. (8) verificaram a ocorrência de casos de nefrite em 3 (7,8%) dos grupos familiais estudados. Zimmerman & col. (19), verificaram que 97,5% das introduções de estreptococos na família deve-se a menores em idade escolar e que as famílias portadoras tem maior susceptibilidade para a aquisição e propagação intra-familiar da doença do que as portadoras. Nesta observação, verificou-se que, entre as 44 famílias, 24 (54,5%) apresentaram relacionamento com o escolar, dando uma simultaneidade de 60,8% do mesmo grupo sorológico (Tabela 3). Ainda, observou-se que, em oito famílias, houve simultaneidade de 43,2% de sorotipos do grupo A, com escolares (Tabela 4), com frequência do padrão T11/14 (quatro famílias com 28 membros, apresentaram em 12 deles), seguido do padrão T8/25/Imp.19 (duas famílias, com 14 membros, apresentaram em seis deles). O importante é que se pode sentir o grau de susceptibilidade entre 24 famílias. Em 14, houve presença de grupos diferentes dos do escolar, em seis famílias, não se isolou estreptococos e os níveis séricos de ASO encontravam-se dentro da faixa da normalidade.

Quanto aos níveis séricos de ASO, para melhor interpretação clínica deveriam ser realizadas, pelo menos, duas determinações intervaladas. Apesar desta consideração, vários autores defendem a importância do encontro de títulos elevados, mesmo em uma única dosagem (6, 12), especialmente quando a amnese e a clínica confirmam o achado (2). No entanto, sugere-se não desprezar resultados iguais ou acima de 250UT, sob o ponto de vista clínico de diagnóstico, mesmo que não existam outros dados. Deve-se observar que, apesar de ser um teste de reprodução fiel, as respostas imunológicas variam grandemente, de indivíduo para indivíduo, havendo também controvérsias quanto aos valores que devem ser considerados como normais. Segundo Décourt (5), os valores normais de ASO oscilam abaixo de 250UT, devendo-se considerar como anormal um resultado acima de 333UT para crianças até 5 anos e acima de 500UT para indivíduos de mais idade. Seguiu-se Bonomo & col. (2), mesmo porque seus valores normais também estão abaixo de 250UT.

A apresentação das respostas dos questionários, levando-se em consideração apenas os níveis séricos de ASO alterados, demonstra que este dado representa alguma colaboração sob o ponto de vista clínico para um diagnóstico (6, 12).

Examinando-se os dados clínicos e respostas afirmativas às indagações, verificou-se que há correlação bem significativa com a presença de estreptococos e níveis séricos de ASO elevados, como já foi verificado (7, 8, 12).

Quando da coleta de material da população escolar, verificou-se que 47 menores tinham problemas nas vias aéreas superiores. De 35 destes escolares isolou-se estreptococos beta-hemolíticos e a média dos valores de ASO foi de 331UT; entre os 12 sintomáticos, porém sem isolamento de estreptococos, a média de ASO foi de 198UT. O restante dos menores, em número de 46, portadores de streptococos, porém sem sintomatologia evidente, forneceu uma média de ASO de 252UT. Esse é um dado importante, principalmente quando se considera apenas como portador aquele indivíduo que não apresenta nenhuma manifestação clínica no ato da coleta de material.

Agradecimentos

Os autores desejam expressar os seus agradecimentos aos estagiários da disciplina de Microbiologia e Imunologia: Denise Raquel Tavares, Silvia Brolo, Custodia Gislaine Leonel, Maria Tereza J. Zanin, Maximina do Céu Fernandes Mogadouro e Ana Lúcia dos Santos; à preparadora da disciplina: Ivone Shizuko Anno e à Usina de Álcool e Açúcar Santa Cruz.

Referências Bibliográficas

- Abdin, Z.H. & Eissa, A. - Rheumatic fever and rheumatic disease in children below the age of 5 years in the tropics. Ann. Rheumatic Dis., 24:389-296, 1965.

2. Bonono, I.; Batista, R.; Coelho, S.R. & Marinho, M.A.A. - Laboratório em doenças reumáticas. *J. Bras. Med.*, 18:15-36, 1970.
3. Castro, H.S. - Dados de um inquérito sobre ocorrência de estreptococos em crianças normais e doentes no Rio de Janeiro. *An. Microbiol.*, 9:329-351, 1961.
4. Décourt, L.V.; Camargo, M.E. - Estudo dos inibidores sorológicos inespecíficos da estreptolisina O. I - Avaliação de sua incidência. *Arq. Brasil. Cardiol.*, 21:175-180, 1968.
5. Décourt, L.V. - Doença reumática. 2.ed. São Paulo, Sarvier, 1972.
6. Federico, W.A.; Fava Neto, C.; Amato Neto, V. & Dobes, A.C. - Título de anti-estreptolisina O no soro de indivíduos normais da cidade de São Paulo. *Hospital*, 72:269-278, 1967.
7. Kaplan, E.L.; Top Jr., F.H.; Dudding, B.A. & Wannamaker, L.W. - Diagnosis of streptococcal pharingitis: differentiation of active infection from carrier state in the symptomatic child. *J. Infect. Dis.*, 123:490-496, 1971.
8. Martini, A.S.; Solé-Vernin, C. & Silva, E.M.C. - Aspectos bacteriológicos e epidemiológicos na glomerulonefrite difusa aguda (pós-estreptocócica) de casos esporádicos em Londrina, Pr. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 9:62-70, 1978.
9. Mello, J.A.N. - Inibidores sorológicos inespecíficos da estreptolisina O. *Rev. Bras. Anal. Clin.*, 1:30-31, 1969.
10. Mendonça, C.P.; Solé-Vernin, C. & Nogueira, M.Z. - Ocorrência de estreptococos beta-hemolíticos dos grupos A (e seus tipos); C e G em escolares de Araraquara, SP - setembro de 1979. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 14:265-272, 1983.
11. Oliveira, A.S. de - Problemas atuais de febre reumática. *Rev. Bras. Med.*, 10:545-549, 1972.
12. Oliveira Lima, A. - Considerações sobre a imunologia dos estreptococos: resultado de uma investigação sobre títulos de antiestreptolisina O e provas cutâneas com antígeno estreptocócico em crianças do Rio de Janeiro. *An. Microbiol.*, 19:353-405, 1961.
13. Perry, L.W.; Poitras, J.M. & Findlan, C. - Rheumatic fever and rheumatic heart disease among U.S. college freshmen, 1956-65. *Publ. Hlth. Rep. (Wash.)*, 83:919-936, 1969.
14. Rantz, L.A. & Randall, E. - A modification of the technique for determination of the anti-streptolysin titer. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 59:22-25, 1945.
15. Solé-Vernin, C. & Castro, H.S. - Estudo sobre estreptococos. IV - Ocorrência de estreptococos do grupo A em crianças normais do Rio de Janeiro. *An. Microbiol.*, 5:181-194, 1957.
16. Solé-Vernin, C. - *Streptococcus pyogenes* carriers detection: preservation of original throat specimens and their enrichment. *Hospital*, 65:765-784, 1964.
17. Solé-Vernin, C. - Groups A, C and G streptococci and anti-streptolysin O serum level from healthy rural school children of Ribeirão Preto, SP, Brazil. *Hospital (Rio de Janeiro)*, 66:331-348, 1964.
18. Toporovski, J. - Aspectos bacteriológicos e imunológicos da glomerulonefrite difusa aguda (pós estreptocócica) na infância. São Paulo, Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa, 1975. (Tese de Livre-Docência).
19. Zimmermann, R.A. & Wilson, E. - Familial susceptibility to acquisition of group A beta hemolytic streptococci. *Am. J. Dis. Child.*, 116:292-300, 1968.

INFORMAÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA SBM

Sociedade Brasileira de Microbiologia - Reunião de Ex-Presidentes e da Diretoria

Realizada no dia 8 de março de 1986, na Escola Paulista de Medicina, Deptº de Microbiologia, a reunião contou com a presença de:

Luiz R. Trabulsi - Ex-Presidente

Wilson Chagas de Araújo - Ex-Presidente

João Salvador Furtado - Ex-Presidente e atual Vice-Presidente

Marcelo Magalhães - Atual Presidente

Milton de Uzeda - Secretário Geral atual

Walderez Gambale - Tesoureiro atual

Foi discutida a política de atuação da SBM nos últimos anos, bem como recursos financeiros, Revista de Microbiologia e outros assuntos pertinentes.

Da discussão, ficou deliberado que a Sociedade Brasileira de Microbiologia deverá dar ênfase a atividades, consideradas como prioritárias, como:

- Manter a regularidade da Revista de Microbiologia, bem como aperfeiçoar a qualidade do conteúdo técnico-científico da mesma;
- Realizar Simpósios Regionais, em áreas específicas da microbiologia;
- Fortalecer os Congressos Brasileiros de Microbiologia;
- Fazer campanha de expansão de sócios da SBM;
- Mobilizar pessoas, a fim de mudar a posição no "Current Contents", da indexação da Revista de Microbiologia, para a seção "Life Sciences";
- Mobilizar profissionais, de diversas instituições, a fim de avaliar o estágio da microbiologia no Brasil.

Ficou deliberado que o Conselho de Ex-Presidentes, deverá propor a chapa, para as próximas eleições da SBM, e dar ciência aos sócios, para a realização de eleição para o biênio 1987-1989.

A reunião foi convocada por João Salvador Furtado, Vice-Presidente Executivo da SBM, para prestar contas do trabalho realizado junto a SBM, nos últimos 13 anos, em que esteve envolvido em atividades, uma vez que, por decisão pessoal, não irá mais concorrer a cargo eletivo, a partir do término de seu mandato, em janeiro de 1987.

Assim, foi apresentado aos Ex-Presidentes e à Diretoria da SBM, o relatório, sintetizado das atividades executadas sob a responsabilidade de João Salvador Furtado, bem como, a situação financeira da SBM.

Como deliberado durante a reunião, o relatório está sendo divulgado aos sócios da SBM.

AÇÃO DA SBM NOS ÚLTIMOS 13 ANOS

A julgar pelas atividades realizadas nos últimos 13 anos, já conseguimos demonstrar, inequivocamente, que uma associação científica pode contribuir para a mobilização profissional, em sua área de atuação, e perfazer funções que nenhuma agência governamental teria condições de fazê-lo; e desencadear outras, a custos indubitablemente inferiores, se realizadas por agências responsáveis pela formulação de políticas e financiamento.

Isto não deve ser entendido como crítica às agências, mas afirmado, com toda segurança, como espaço que deverá ser ocupado por entidades, como a Sociedade Brasileira de Microbiologia. Também é feito no sentido de identificar o papel mais dinâmico de tais entidades, no contexto nacional de ciência e tecnologia, como está ocorrendo em diversos países.

Essencialmente, o papel da associação científica e tecnológica deve ser o de agente mobilizador e de intermediação, para pesquisa articulada entre grupos e instituições, com o setor produtivo, seja este público ou privado.

Assim, o sistema governamental de C&T tem muito a lucrar e a tirar proveito, com a participação ativa das associações científicas e tecnológicas. Reciprocamente, a comunidade tem muito a dar e tirar proveito pelo engajamento, através das suas entidades representativas.

O elenco de atividades realizadas, pela direção executiva da SBM, é considerável, especialmente se comparado a outras entidades afins. Assumimos, inclusive, a responsabilidade de uma comparação com o que tem sido feito por instituições formalmente mantidas por orçamentos públicos, pois temos certeza de que os benefícios resultantes do nosso trabalho, serão apreciáveis.

Fizemos, realmente, muita coisa e teremos condições de fazer mais. Hoje, conquistamos o reconhecimento, no País, de que somos uma entidade que busca o engajamento técnico, científico, econômico, social e, acima de tudo, político para as atividades que usam microrganismos em vasto campo de trabalho.

Nossa atuação visa, essencialmente, fortalecer grupos, entidades, instituições e empresas. Consequentemente, nosso esforço é, eminentemente, voltado para a melhoria do desempenho nacional.

Fizemos com que novas linhas de trabalho fossem abertas e implantadas. Muita coisa, que hoje é feita, não existia, e surgiu do nosso trabalho direto. Projetos submetidos a diversas agências, e outros que poderão ser submetidos, ganharam nova ótica política e contextual.

Modificamos a conduta de indivíduos, de grupos e de instituições. Conseguimos ampliar o debate, a visão e a conduta ao relacionar atividades de pesquisa, desenvolvimento e produção. Contribuímos para fortalecer o papel das universidades e institutos governamentais que executam P&D, como agentes de desenvolvimento.

Promovemos a integração de grupos da mesma instituição e ganhamos experiência em articular grupos interinstitucionais. Desencadeamos cooperação internacional. Já temos meios de propor esforços mais abrangentes, que cobrem pesquisa científica, tecnologia e mercado. Nossa visão, para formação de recursos humanos, complementa o papel da universidade, graças a nossos modelos de "educação continuada" e "treinamento em serviço".

ATIVIDADES PROMOVEM LIDERANÇAS NO TERRITÓRIO NACIONAL

O modelo de atuação adotado pela SBM visa revelar líderes e destacar grupos atuantes. Vários projetos foram estabelecidos e muitos deles levados a bom termo, resultando em atividades de pesquisa, desenvolvimento e prestação de serviços técnicos-científicos.

Em várias ocasiões, surgiram oportunidades para que grupos gerassem projetos específicos, que resultaram no obtenção de recursos substanciais para suas próprias instituições.

Projetos de cooperação foram estabelecidos envolvendo diferentes grupos nacionais, da mesma instituição ou vinculados a distintas organizações. Em alguns casos, conseguiu-se articular universidades, institutos de P&D governamentais e empresas privadas.

Recentemente, a experiência de integração passou a envolver grupos do exterior. Foram iniciados entendimentos entre brasileiros e argentinos para cooperação bilateral em virologia, com boas perspectivas para a cooperação com especialistas de duas universidades dos EUA.

PROGRAMAS DA SBM CONTRIBUEM PARA O DESENVOLVIMENTO INSTITUCIONAL

Resultados apreciáveis foram atingidos por diferentes grupos de trabalho, conduzidos pela SBM, com base na análise de planos de governo, prioridades, estratégias e outros componentes da política de C&T, conduzida por diferentes agências.

Amplo processo de divulgação foi desencadeado, envolvendo praticamente todas as instituições mais relevantes no País, a fim de fomentar maior participação no processo decisório.

Simultaneamente à expansão do número e natureza das instituições envolvidas, foi possível cobrir praticamente todas as áreas de interesse da microbiologia, nominalmente a microbiologia de alimentos, ambiental, agrícola, industrial, médica e veterinária, sem descuidar-se da que se convencionou denominar de microbiologia básica, que permeia todas as já citadas.

Essencialmente, o modelo de atuação foi montado de maneira a: a. revelar pessoas ou grupos que pudessem se transformar em lideranças; b. fomentar e reforçar o processo de planejamento participativo; c. exercitar a interação e a definição de prioridades, com ênfase em problemas nacionais, sem, contudo, relegar os problemas regionais; d. desenvolver a capacidade para auto-gestão e e. fortalecer a ação, a nível das instituições, para o desenvolvimento científico e tecnológico.

Quanto mais ativa e próxima estivesse a instituição, da unidade central administrativa da SBM, maiores as possibilidades de efetivos vínculos de trabalho integrado e de conquista de maior projeção, nacional e internacional.

Naturalmente, foi grande a contribuição, da SBM, para a promoção da imagem, das instituições e grupos nacionais, perante agências de formulação de política e financiamento, para C&T. Inegavelmente, diversos profissionais e grupos, hoje atuantes, viram aumentadas as oportunidades para a conquista de maior visibilidade, tanto no âmbito político-administrativo, como social e econômico.

Criação de equipe técnica própria para atuação interdisciplinar

A política de ação, adotada pela SBM, só foi implantada graças à existência de equipe técnica, própria, consolidada nos últimos 7 anos de atividades.

Todo o pessoal, que presta serviços autônomos para a SBM, foi treinado para atuação interdisciplinar, abrangendo aspectos técnico-científicos próprios da área da microbiologia ou do grupo de microrganismos envolvidos, componentes econômicos, sociais e políticos.

A SBM capacitou-se para colaborar com grupos de universidades e institutos dedicados à P&D, com vistas à montagem de projetos mais complexos, particularmente os que necessitam o envolvimento multiinstitucional.

Aquisição de competência para levantamentos

O envolvimento mais amplo, na formulação de projetos a nível nacional, permitiu adquirir habilidades para levantamentos, cadastros, planos regionais e nacionais.

Hoje, a SBM ganhou condições técnicas e materiais para produzir formulários destinados a levantamento de dados, em quaisquer setores sócio-econômicos nos quais a microbiologia participa. Adicionalmente, também passou a dispor de habilidades para a produção de cadastros de entradas múltiplas.

Fonte de recursos financeiros da SBM

A manutenção das atividades da SBM foi conseguida através de duas fontes: a. receita derivada de anuidades e b. contratação de projetos, para execução.

As anuidades são calculadas à base de 2 ORTNS. Há cerca de 800 sócios, cujo comportamento, em relação à tesouraria, está distribuído, aproximadamente, da seguinte maneira: 40% dos pagamentos no primeiro trimestre do ano, 40% nos dois trimestres seguintes e 20% no último trimestre.

O custo administrativo, para a cobrança, torna-se elevado, pois são necessárias três expedições postais e duas (pelo menos) emissões de "carnês" bancários, para serem enviados a cada sócio. A cada correspondência, é necessário imprimir circulares, com distinto texto apelativo. A função de arrecadação tem que ser mantida ininterruptamente, durante os 12 meses de cada ano.

A preços de 1984-1985, a arrecadação foi estimada em Cr\$ 70.000.000 (já deduzidos a custos). Todo montante apurado foi aplicado sob a forma de contra-partida, para a produção, impressão e distribuição da Revista de Microbiologia. Mesmo assim foram necessários mais Cr\$ 70.000.000, que, no geral, deriva de contribuições de agências de fomento.

Nos últimos 13 anos, foram iniciados projetos executivos, para gestão centralizada e descentralizada, envolvendo inúmeras instituições e grupos de especialistas, em diversas regiões do país. Os projetos foram financiados por agências governamentais e empresas privadas, gerando, por consequência, os recursos necessários para a sustentação das atividades.

A continuidade administrativa, nesse período possibilitou a adoção de um posicionamento fortemente organizável e uma sociedade civil que não poderá depender para sua sobrevivência de "benemerência institucional" para sustentação das suas necessidades básicas.

Para garantia de sua autonomia político-administrativa - em que pese a acolhida por departamentos, universidades ou institutos governamentais - a Sociedade deve ter recursos próprios, incluindo recursos humanos e materiais.

São necessários equipamentos especializados, contratos de manutenção, suprimento de material de consumo e, em especial, meios de comunicação independentes.

A proposta de suficiência econômico-financeira foi conseguida na medida em que a SBM passou a desencadear trabalhos específicos para o efetivo estímulo à pesquisa e suas aplicações através de projetos financiados.

A postura adotada foi provocada pela situação econômico-financeira da SBM ao término da CIAM IV, em 1973, quando havia um débito de Cr\$ 150.000 (na época equivalente a US\$ 24.115).

Entre outros problemas, que exigiam solução eram a melhoria do mecanismo de arrecadação das anuidades; expedição e controle da Revista de Microbiologia; diversificação e aumento no número de artigos submetidos para publicação; e, acima, de tudo, a conquista de condições para garantia da periodicidade e pontualidade da Revista de Microbiologia.

Quando tais problemas foram resolvidos, a meta seguinte foi o aumento de artigos por número da Revista; o aprimoramento da forma e conteúdo dos artigos; a redução dos custos de produção; e a conquista da circulação no exterior.

Hoje, a SBM dispõe de:

- Política e ação efetiva para negociação de projetos que garantem o ingresso de recursos financeiros para sustentação dos custos básicos da SBM;
- Equipamentos e instalações da ordem de Cr\$ 150.000.000 (cento e cinquenta milhões de cruzeiros) (US\$ 13.000);
- Estoque de material de consumo e de impressos especiais para atividades da SBM no valor aproximado de Cr\$ 80.000.000 milhões de cruzeiros (US\$ 7.000);
- Saldo em bancos, como reserva para construção da sede própria da Sociedade totalizando Cr\$ 600.000.000 milhões de cruzeiros (US\$ 50.000).

Para 1986, está assegurada a produção da Revista de Microbiologia através da arrecadação das anuidades e de projeto em fase final de análise na FINEP (Programa de Apoio a Publicações Científicas CNPq/FINEP).

Nos últimos 5 anos, firmamos 20 convênios, com entidades governamentais, dos quais 14 com a FINEP.

O fato, inquestionável, é que as fontes de recursos financeiros da SBM sempre foram incertas, colocando, em risco, a manutenção da estrutura técnico-administrativa, consolidada nos últimos 7 anos e integralmente mantida por recursos captados pela SBM.

INFORMAÇÕES INSTITUCIONAIS

A SBM foi fundada em 28 de setembro de 1956, como sociedade civil, sem fins lucrativos.

Surgiu da manifestação da vontade de microbiologistas brasileiros, que compunham o capítulo brasileiro da American Society for Microbiology, no Rio de Janeiro e que sentiram a necessidade de ampliar a participação dos integrantes da comunidade nacional, que se desenvolvia.

Originalmente, a maior concentração de atividades em microbiologia, dava-se na área de medicina, tendo sido expandida, nos anos seguintes, para diferentes setores socio-econômicos.

A partir de 1973, quando a SBM realizou a GIAM IV - Quarta Conferência Internacional sobre os Impactos Globais da Microbiologia Aplicada e a II ICCC - Segunda Conferência Internacional sobre Coleções de Cultura, ambas em São Paulo, ficou consolidado o campo de atuação da SBM, em:

- i . microbiologia agrícola
- ii . microbiologia de alimentos
- iii. microbiologia ambiental
- iv . microbiologia básica
- v . microbiologia industrial
- vi . microbiologia médico-animal
- vii. microbiologia médico-humana.

Atualmente, as atividades estão sendo concentradas nas seguintes modalidades de atuação:

- i . planejamento de Ciência e Tecnologia (C&T)
- ii . organização de cursos, reuniões e diversas modalidades de eventos afins
- iii. articulação intra e interinstitucional
- iv . publicações técnico-científicas.

A estrutura diretiva e operacional da SBM está composta dos seguintes níveis:

- i . Diretoria (Presidência, Vice-Presidência, Secretaria Geral e Tesouraria)
- ii . Conselho de Ex-Presidentes
- iii. Comissões de coordenação de programas
- iv . Quadro associativo.

Para a manutenção de atividades administrativas e gerenciais (a nível de programas e projetos), conta-se com a participação de profissionais liberais remunerados.

As comissões de coordenação de programas são compostas por especialistas nas áreas cobertas, um deles designado para as funções de coordenação, por dois mecanismos: escolha pessoal da Presidência, em função de custos, proximidade, circunstâncias, envolvimento, motivação, competência e habilidade profissional; ou indicação pelos pares que, voluntariamente, aceitam convite da Presidência, para participar da formulação de programas específicos.

O coordenador de comissão de programa, tem a prerrogativa de falar em nome da Diretoria da SBM, em matérias técnico-científicas e para definição de tendências e de políticas específicas de atuação, no respectivo programa. Todavia, os compromissos financeiros são, no geral, centralizados, a nível de unidade responsável pela condução de projetos financiados, porém, com a participação das comissões pertinentes.

Outro membro, que não o Presidente da SBM, poderá ser autorizado a atuar como Diretor Executivo das atividades da SBM, sempre que houver conveniência operacional ou que o Presidente encontrar dificuldades ou impedimentos, para exercer as funções de representação da entidade.

Diretoria para o biênio (15/01/85 - 16/01/87)

- Presidência : Marcelo Magalhães, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50000 Recife PE, tel (081) 222-4700.
- Vice Presidência : João Salvador Furtado, Instituto de Ciências Biomédicas USP, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, Cidade Universitária, 05508 São Paulo SP, tel (011) 813-9647. Designado Diretor Executivo.
- Secretaria Geral : Milton de Uzeda, Instituto de Microbiologia UFRJ, Centro de Ciências da Saúde, Bloco I - Ilha do Fundão, 21941 Rio de Janeiro RJ, tel (021) 270-8344.
- Tesouraria : Walderez Gambale, Instituto de Ciências Biomédicas USP, Deptº de Microbiologia, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, Cidade Universitária, 05508 São Paulo SP, tel (011) 210-4311.

O quadro associativo da SBM é composto das seguintes categorias:

- i . sócio profissional
- ii . sócio acadêmico
- iii. sócio acadêmico-assinante
- iv . sócio patrocinador da Revista de Microbiologia
- v . assinante da Revista de Microbiologia

No conjunto, os sócios realizam atividades de pesquisa, desenvolvimento experimental e prestação de serviços técnico-científicos.

A administração interna executa funções de:

- i . gerência de programas (gestão, acompanhamento técnico-administrativo, orientação geral e treinamento de estagiários)
- ii . assistência administrativa (coordenação de atividades de rotina e para orientação de planejamento)
- iii. editoração de publicações e cadastros técnicos.

INFORMAÇÕES SOBRE PROGRAMA E ATIVIDADES

Nos últimos dez anos, foram realizadas inúmeras atividades, relevantes para a expansão da microbiologia, no Brasil. As informações, apresentadas a seguir, são resumidas e divididas em dois blocos: programas em andamento e propostas para expansão.

Programas em andamento

Congressos, encontros e eventos afins

- a. Congresso Brasileiro de Microbiologia (CBM)

Proporciona a oportunidade de interação entre os profissionais envolvidos em todas as áreas da microbiologia e discussão de temas de amplo interesse.

- b. Simpósio Nacional de Fermentação (SINAVERM)

Evento regular na área de fermentação, realizados desde 1974, com abordagem de temas específicos.

- c. Encontro Nacional de Micotoxinas

Destinado a reunir os profissionais envolvidos na área de micotoxinas, gerando programas, cursos e eventos específicos.

- d. Encontro Nacional de Virologia
Este evento faz parte das diretrizes do Plano Integrado de Virologia.
- e. Simpósio Nacional de Microbiologia de Alimentos
Segue a linha de outros eventos de integração de profissionais da área, coordenando esforços na área de alimentos.
- f. I Simpósio Latino Americano sobre Produção de Biogás a partir de Resíduos Orgânicos
Evento específico, não regular, organizado devido ao interesse na área de biodigestão.
- g. Simpósio Nacional de Microbiologia Ambiental
Simpósio realizado em cooperação com o CLAMA - Comitê Latino Americano de Microbiologia Ambiental. O evento visa a reunião de profissionais, para elaboração de um programa na área.
- h. Simpósio Nacional de Microbiologia Clínica
Simpósio desencadeado pela execução do programa da SBM para discussão de problemas da área.
- i. Co-participação
Atividades desempenhadas pela SBM em conjunto com outras entidades:
 - Simpósio de Bioquímica de Microrganismos (UNESP)
 - Encontro sobre Paracoccidioidomicose (UNESP)
 - Encontro de Microbiologistas (UNESP)
 - Simpósio sobre Resistência Bacteriana e Infecções Mistas (MSD)
- j. Execução técnico-administrativas de eventos
A SBM é contratada por outra entidade para a organização e administração de evento
 - Encontro de Editores de Revistas Científicas CNPq/FINEP

Publicações

- a. Revista de Microbiologia
Publicação trimestral, iniciada em 1970, destinada a artigos originais de pesquisa e desenvolvimento, em todas as áreas da microbiologia.
- b. Informações técnico-científicas
Produção de diferentes veículos de disseminação de informação.
 - b.1. Boletim Informativo - notícias diversas
 - b.2. Manuais técnicos em temas específicos
Já editados - Fermentações industriais e Transformações microbianas no solo; Novos métodos analíticos para o controle da fermentação alcoólica; Micobactérias; Infecções mistas.
- Prontos para edição - Manifestações clínicas e diagnóstico micológico; Manual de normas técnicas de bacteriologia do IPB; Controle de qualidade no laboratório de microbiologia clínica; Prevenção de infecções de laboratórios; Diagnóstico etiológico das meningoencefalites bacterianas; Técnicas de levantamento da microflora telúrica e isolamento de fungos saprofíticos do solo.
- b.3. Diagnóstico - Considerações sobre o Projeto COBA (SBM 1982); Paracoccidioidomicose.
- b.4. Cadastros - Controle e emissão de revistas e anuidades pagas; Cadastros de Membros profissionais SBM; Cadastros de virologistas; Laboratórios de análises clínicas; Ficologistas Latinoamericanos; Micotoxicologistas.
- b.5. Inter-Virus

Microbiologia de alimentos

Este programa inclui: a. realização de Simpósios Nacionais de Microbiologia de Alimentos; b. cursos e reuniões regionais, sobre temas específicos; c. organização de Comissão Nacional e sub-comissões para temas específicos; d. atividades institucionais, para implantação de recomendações; e. cadastro de profissionais atuantes.

Microbiologia industrial

Realização de a. Simpósios Nacionais de Fermentação; b. cursos; c. Simpósio de Biogás; d. levantamento de oferta de P&D e serviços de digestão anaeróbia; e. publicação de manuais; f. cadastro de atividades em microbiologia para produção de energia; g. normalização de linguagem para avaliação de rendimento em biodigestores; h. relacionamento indústria-P&D, para produção de enzimas; i. aperfeiçoamento em simulação e modelagem em processos fermentativos.

PMC-Micotoxinas

O Programa de Monitoração e Controle de Micotoxinas abrange: a. Encontros Nacionais de Micotoxinas; b. cursos; c. treinamento e assistência para implantação de redes estaduais de laboratórios; d. padronização de técnicas e implantação de central de referência; e. manuais técnicos; f. cadastro de especialistas.

PID – Programa Institucional de Desenvolvimento da Microbiologia

Destina-se à institucionalização das atividades em microbiologia e inclui: a. levantamento de atividades, especialistas e instituições atuantes, por região brasileira; b. designação de Consultores, por área de microbiologia e contatos locais; c. análise e proposição de atividades, correlacionadas a programas de governo e d. organização de Comissões Regionais (por área da microbiologia) e Nacionais (por setores sócio-econômicos).

Programa Integrado de Virologia

As diretrizes deste programa foram assumidas pela FINEP e CNPq, convertendo-se no Programa Setorial de Virologia. A nível da SBM, as atividades incluem: a. manutenção de comissão geral e sub-comissões para virologia básica, animal, de plantas, de saúde pública; b. execução de Encontros Nacionais de Virologia; c. cursos; d. Boletim informativo; e. geração de propostas de P&D, para temas específicos; f. cadastros; g. prêmio "Prof. Paulo de Góes".

Microbiologia clínica

Neste programa, estão incluídos a. Simpósios Nacionais de Microbiologia Clínica; b. cursos; c. manuais; d. Projeto COBA; e. Comissão de Combate à Infecção Hospitalar; f. boletins e informativos.

Prêmios

Consiste na criação e outorga de honrarias e recursos financeiros, abrangendo: a. Prêmio Schering e b. Prêmio Prof. Paulo de Góes.

Cadastros

As atividades abrangem: a. geração de formulários, para levantamento de informações; b. análise e tabulação de dados; c. arquivo em máquina EDIT, com busca seletiva de informação; d. produção de listagens.

Treinamento

Neste programa estão concentradas a organização e administração de numerosos cursos, nas mais diversificadas áreas da microbiologia, distribuídos nas seguintes grandes categorias. a. cursos informativos, sobre temas específicos, ministrados durante congressos e eventos afins; b. cursos práticos, de execução irregular; c. curso de educação continuada; d. curso para profissionais de instituições e empresas, particularmente.

Novos projetos

Da reunião de idéias captadas via sócios, eventos da SBM ou indicação da diretoria, são desenvolvidas propostas de projetos. O andamento dos projetos depende do apoio dos órgãos de fomento e financiamento. Por isso, a SBM conta com projetos prontos para implantação, aguardando apenas liberação de recursos.

Novos talentos em microbiologia: nível de graduação

A SBM desenvolveu estudos, com o objetivo de aumentar os conhecimentos microbiológicos de estudantes de nível de graduação; selecionar novos talentos; prepará-los para a iniciação científica em microbiologia; e apoia-los com atividades complementares, compatíveis com suas vocações profissionais. Para tanto, foi elaborado o projeto "Novos Talentos..."

Esta atividade é baseada na realização de cursos, seleção e orientação para iniciação científica dos talentos identificados.

Expansão da Microbiologia Básica

Com base nos dados produzidos através da execução do PID-Microbiologia, a SBM elaborou o Plano de Expansão da Microbiologia Básica no Brasil. O documento indica estratégia para preparação de recursos humanos, visando à configuração de grupos interdisciplinares, com formação básica a partir de bioquímicos, fisiologistas e geneticistas, e formação complementar em biofísica, citomorfologia, ecologia, engenharia bioquímica, estatística, matemática, química e taxonomia.

Relação Universidade/Setores Econômicos

Em janeiro de 1984, foi submetido ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, proposta de implantação de atividades de docência, pesquisa e prestação de serviços técnico-científicos, no Departamento de Microbiologia, em nível de pós-graduação e/ou especialização. Em essência, a proposta contém a definição de estratégia para concepção de projeto básico, de expansão progressiva, visando fortalecer as relações entre a microbiologia e os setores sócio-econômicos.

Avaliação de Desempenho Pós-Treinamento

A SBM está direcionando esforços no sentido de estabelecer metodologia de avaliação dos cursos e de treinando. O processo de avaliação prevê três fases distintas; antes, durante e após o treinamento.

Programa interdisciplinar de Patogenicidade Microbiana

O grande avanço internacional obtido pelos conhecimentos na área da imunologia e, o apoio maciço dado, em nosso meio, a algumas protozooses e helmintoses, foram, talvez, fatores de desestímulo para que doenças de natureza bacteriana de grande relevância para o nosso meio, deixassem de merecer a devida atenção dos órgãos financeiros de pesquisa. Justificativas falsas para esta situação residem não raramente na afirmativa de que a Tuberculose, a Brucelose, as Micoses profundas entre outras, perdem sua importância frente as armas teóricas de combate existentes. Com isto, vê-se o meio científico brasileiro desfalcado de pessoal de alto nível, capaz não só de gerar novos conhecimentos nesta área, bem como de direcioná-la adequadamente para seu fim maior que é o controle dessas enfermidades.

Projeto: Gestão de Projetos de Pesquisa Científica

Projeto encaminhado em 15/4/83 à FINEP, com o objetivo geral de aperfeiçoar a competência em gestão de projetos com vistas à qualidade de pesquisa científica. Surgiu da necessidade de aperfeiçoamento de recursos humanos nesta área de gestão de projetos que envolvem geração, adaptação e difusão de conhecimentos científicos e, eventualmente, tecnológicos. Esta ação visa propiciar o estreitamento das relações entre a FINEP e a comunidade científica, através da agência, para o desenvolvimento

científico, pela melhoria da qualidade das propostas, da execução, do acompanhamento e da avaliação de projetos, com os seguintes objetivos: i. capacitar recursos humanos em gerência de projetos, através de treinamento voltado para o pesquisador, com ênfase em administração de pesquisa, e para o administrador, com ênfase em estrutura de projetos técnico-científicos, ii. fixar a competência criada; iii. elaboração de manuais de gestão de projetos.

GE-TECFERM Brasil-Japão: Programa Grupo de Especialistas em Tecnologia de Fermentação Brasil-Japão

Proposta de criação do programa Ge-Tecferm Brasil-Japão, "Grupo de Especialistas em Tecnologia de Fermentação Brasil-Japão", envolvendo, pelo Brasil, a SBM - Sociedade Brasileira de Microbiologia, ABEQ - Associação Brasileira de Engenharia Química, IPT - Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S/A e CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e, pelo Japão, a Society of Fermentation Technology e Society of Agricultural Chemistry e JICA- Japan International Cooperation Agency. O objetivo do programa era estabelecer grupos de especialistas para discussão de temas específicos em tecnologia de fermentação, relevantes para o desenvolvimento científico e tecnológico brasileiro.

REBRADECER: Rede Brasileira de Depósitos de Células de Referência (início - 1973)

As inúmeras tentativas da SBM para a consolidação de unidades, dedicadas à manutenção de coleções de células de referência, datam de 1973, quando o Brasil sediou, em São Paulo, a Second International Conference of Culture Collections, sob os auspícios da World Federation for Culture Collections.

Em 1977, foram iniciadas gestões, junto ao CNPq, para o assunto. Durante 1980, 1981 e 1982, em oportunidades distintas, a proposta da SBM foi levada ao conhecimento do CNPq e FINEP.

O objetivo é consolidar uma estrutura de rede livre, organizada, com intenso intercâmbio e simultânea autonomia técnico-científica, uma vez respeitadas as normas de conduta comuns para: tipificação, segurança, controle de qualidade, registro, administração, intercâmbio, identificação, testes, etc. A unidade da rede seria garantida pela Central de Referência.

Projeto Indústria

Visando o desenvolvimento tecnológico no setor da Microbiologia industrial, a SBM está elaborando projeto para dinamizar, ou até mesmo criar uma interação entre o corpo científico da SBM e a indústria.

A primeira área de ação escolhida foi a de controle de qualidade biológico. Através do emprego de técnicas apropriadas, treinamento e em alguns casos a inovação tecnológica, pretende-se incrementar a área de controle de qualidade.

Programa Nacional de Digestão Anaeróbia

Da reunião de profissionais por ocasião do I Simpósio Latino Americano de Biogás, iniciou-se esforço para a produção de uma proposta de programa desencadeando atividades didáticas em níveis básico e avançado, consultoria, transferência e absorção de competência técnico-científica e eventos afins.

Propostas de ação na área de fermentação

Durante o VI SINAFERM - Simpósio Nacional de Fermentação (nov. 84), foram realizadas reuniões de grupos paralelamente ao evento, que resultaram em três propostas de ação, na área de fermentação:

a. Desenvolvimento da enzimologia industrial

Elaboração de reunião para discussão da situação da enzimologia industrial, quanto ao atual estágio de desenvolvimento e perspectivas.

b. Normalização de termos e métodos em digestão anaeróbia

Em digestão anaeróbia, a utilização de terminologia diversificada impossibilita a comparação de resultados. Por isso, foi proposta a realização de reunião, de profissionais da área, para geração de documento contendo: i. definição de termos e parâmetros para acompanhamento de processo e ii. metodologia comum a ser adotada.

c. Modelagem e simulação de processos fermentativos

O objetivo é definir estratégia de trabalho conjunto e coordenado, entre instituições que trabalham na área, para desenvolver, com profundidade adequada, a aplicação técnica de modelagem e simulação de processos fermentativos.

Treinamento

Realização de 35 cursos, de curta duração, em diversas áreas da microbiologia. O projeto foi submetido a duas áreas da FINEP, para financiamento, em março de 1984.

Em 30 de maio de 1984, foi submetida ao PADCT-Biotecnologia (CAPES), proposta para treinamento em processos e fenômenos de fisiologia e bioquímica de microrganismos relevantes para a biotecnologia. Segue abaixo a relação dos cursos propostos.

- 1 . Otimização de condições microbiológicas e enzimáticas para produção de queijo - Coordenador: Alda L.L. dos Santos
- 2 . Bioinseticidas - Cláudio Messias
- 3 . Tópicos de enzimologia industrial - Michele Vitolo
- 4 . Biopolímeros bacterianos - Iracema de Oliveira Moraes
- 5 . Celulases: produção e aplicações - J.E. Thiemann
- 6 . Manutenção de linhagens de fungos - Adauto Ivo Milanez
- 7 . Conversão de biomassa em fertilizantes - Young Park
- 8 . Fermentação sólida para produção de enzimas industriais - Young Park
- 9 . *Zymomonas mobilis*: Potencial de uso em fermentação alcoólica - José Otamar F. de Moraes
10. Preparação de (GAMA-32P) e (ALFA-32P) nucleosídeos trifosfatos com alta atividade específica para estudos em biologia molecular - José Carlos da Costa Maia
11. Controle químico, físico e biológico da digestão anaeróbia - José Santo Goldoni
12. Produção de antibióticos - Ana Maria Fuentes dos Santos
13. Fermentação anaeróbia - Rubem Pablo Schoken-Iturrino
14. Obtenção de híbridos de leveduras - Cecília Laluce
15. Produção de biomassa de algas unicelulares para uso industrial - José A. Rosenberg
16. Fermentação alcoólica - Maria Cecilia Mônaco Furletti
17. Identificação de leveduras - Maria José S.M. Giannini
18. Amostragem para microrganismos de solo - Sânia M. Tauk
19. Enterobactéria - Deise P. Falcão
20. Aplicação de reações imunoenzimáticas Elisa-teste no diagnóstico microbiológico - Hélio José Montassier
21. Manutenção de culturas bacterianas - Percy Sampaio Camargo
22. Técnicas de isolamento e identificação de vírus - Aramis A. Pinto
23. Infecções urinárias - Augusto C. Montelli
24. Identificação de germes patogênicos e antibiograma . Alexandre Adler Pereira
25. Infecção hospitalar - sem coordenador
26. Antibióticos na prática laboratorial - Elsa M. Mamizuka
27. Diagnóstico rápido de doenças micobacterianas - sem coordenador
28. Aspectos microbiológico e epidemiológico de doenças transmissíveis - sem coordenador
29. Atividades biológicas de mixovírus - sem coordenador
30. Substâncias antivirais - sem coordenador
31. Marcadores genéticos em vírus - sem coordenador
32. Concentração e purificação de vírus - sem coordenador
33. Diagnóstico virológico em humanos - sem coordenador
34. Biologia de vírus de plantas - sem coordenador
35. Publicação em microbiologia: o artigo científico - sem coordenador

COOPERAÇÃO INSTITUCIONAL

SBM/CNPq

A SBM e o CNPq firmaram protocolo de intenções para permuta de informações, suporte operacional e prestação de assistência técnica.

Protocolo de cooperação SBM/MSD

A SBM e a MSD (Merck, Sharp & Dohme) firmaram acordo de cooperação para fortalecer o relacionamento entre geradores de ciência e tecnologia, no campo da microbiologia e o setor produtivo. As bases deste acordo se deram no sentido de estimular o desenvolvimento da capacitação técnico-científica no campo da epidemiologia, implantar habilidades no campo de processamento de dados na área de informação técnico-científica e através da participação de laboratórios de análises bacteriológicas, criar um painel da realidade brasileira em doenças causadas por microrganismos.

Protocolo de cooperação SBM/B-D

A SBM e a B-D- (Becton Dickinson Ind. Cirúrgicas S/A) manifestaram desejo de fortalecer o relacionamento entre a pesquisa e o setor produtivo, em benefício dos usuários de C&T, através de um acordo de cooperação. A SBM teve a incumbência de mobilizar microbiologistas brasileiros para delimitação de cursos e treinamento, também teve participação na elaboração de um manual de Referência Microbiológica.

Através deste acordo a SBM conseguiu a criação do prêmio SBM-Becton Dickinson (vide prêmios).

Protocolo de cooperação SBM/ACM

A SBM e a ACM (Asociación Chilena de Microbiología) através de um protocolo de intenções, acertaram termos de cooperação mútua, visando a promoção de pesquisa e desenvolvimento nas diversas áreas da microbiologia.

Protocolo de cooperação SBM/UNESP

O protocolo de cooperação tem por objetivo definir temas para trabalho conjunto, com a finalidade de desenvolver programas de pesquisa, desenvolvimento e serviços técnico-científicos, treinamento de pessoal e capacitação de recursos humanos, em todas as áreas da microbiologia.

Cooperação bilateral Brasil-Argentina

Especialistas brasileiros, através da coordenação da SBM, estão mantendo contatos com virologistas argentinos para estabelecimento de programas bilaterais de cooperação.

BALANÇO PATRIMONIAL ENCERRADO EM 31.12.1985

Ativo

<u>Ativo circulante</u>			
<u>Disponível</u>			
<u>Bco. cta. movimento</u>			
Bco. Bradesco S.A.	634.521		
Bco. do Brasil S.A.	<u>4.082.893</u>	4.717.414	
<u>Créditos</u>			
Reembolso de despesas	50.385.248		
IRF a recuperar	53.722.378		
Aplic. Financ. Merc. aberto	68.477.000		
Aplic. Financ. Créd. Imob.	<u>555.801.866</u>	728.386.492	733.103.906

Despesas do Exercício seguinte			
Seguros a vencer			634.710
Ativo Permanente			
Investimentos			
Linhos Telefônicas	9.581.100		
Ações Bradesco S.A.	<u>18.578</u>	9.599.678	
Imobilizado			
Móveis e Utensílios	8.754.550		
Máqs. e Equipamentos	40.529.513		
(-) Prov. p/ Depreciação	<u>(14.349.702)</u>	34.934.361	44.534.039
Total do Ativo			778.272.655
			=====

Passivo

Passivo circulante			
Honorários a pagar			1.200.000
Exigível a Longo Prazo			
Prov. p/ Eventos e Seminários			300.000.000
Patrimônio Líquido			
Superavit do Exerc. anterior	203.206.294		
Cor. s/ Exercício anterior	445.773.649		
Superavit do Exercício	<u>(171.907.288)</u>	477.072.655	
Total do Passivo			778.272.655
			=====

(-) Deduções s/ os Créditos			
Cor. Monet. do Balanço	411.930.350		
Prov. p/ Eventos e Sem.	300.000.000		
Devolução de Anuidades	84.423		
Dev. de verba-CBM	<u>34.166</u>	712.048.939	
Resultado Final do Exercício			(171.907.288)

João Salvador Furtado
 Atual Vice-Presidente e Executor de
 Programas
 Sociedade Brasileira de Microbiologia
 Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
 Cidade Universitária USP
 05508 São Paulo SP

XIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia - Simpósio Latino Americano de Virologia Vegetal: Informativo nº 2.

Sob o patrocínio da Sociedade Brasileira de Fitopatologia, será realizado no Centro de Convenções de Brasília, Brasília DF, nos dias 13-18 de Julho de 1986, o XIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia - Simpósio Latino-Americano de Virologia Vegetal.

Além das sessões técnicas, o programa abrange colóquios sobre patologia florestal e sementes, sessões de posters, visita a Centros de Pesquisas, Conferências, etc.

Para maiores informações: Dr. Hermínio Maia Rocha, CENARGEN/EMBRAPA, SAIN - Parque Rural, Caixa Postal 202372, 70770 Brasília DF.

Gláucia de Camargo Furtado
Sociedade Brasileira de Microbiologia
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
Cidade Universitária USP
05508 São Paulo SP

Fudenberg, H.H.; Whitten, H.D. & Ambrogi, F. *Immunomodulation: new frontiers and advances*. New York, Plenum Press, 1983. US\$ 65.00.

Imunomodulação é uma área cheia de controvérsias e de grande relevância na clínica. Poucas são as publicações que resumem seu avanço e ressaltam seu valor como arma no combate a tumores e imunodeficiências, de uma forma sistemática.

Os editores fazem votos no prefácio que o livro seja capaz de auxiliar na compreensão dos principais aspectos da imunomodulação, permitindo uma ação inteligente e eficaz no manuseio dos principais agentes.

Este livro é escrito por experientes e bem conceituados pesquisadores, que reportam suas experiências, discutindo-as com a de outros especialistas da área. É agradável, esteticamente bem apresentado, capaz de oferecer resumidamente subsídios aos interessados no assunto. A linguagem é clara na maioria dos capítulos, mas pressupõe um leitor familiarizado com imunologia. Como todos os livros multiautoriados, é possível observar sobreposição de informações, que mais se completam do que se repetem. O index de conteúdo e de palavras chaves é adequado, e as referências ao final de cada capítulo são atualizadas e bem indicadas.

É importante ressaltar, que não se trata de um livro de terapêutica, no qual drogas e doses podem ser rapidamente encontradas.

O livro inicia com um grupo de capítulos discutindo o papel de extratos e hormônios tímicos na diferenciação dos linfócitos T humanos e seu efeito terapêutico nas imunodeficiências primárias e em alguns tumores. Nestes capítulos é ressaltado o grande número de fatores tímicos, bioquimicamente distintos, isolados na última década. Embora a abordagem seja adequada, alguns capítulos são discutidos superficialmente, não oferecendo ao leitor bases convincentes para a aplicação clínica destes fatores.

Posteriormente, outros autores comentam sua experiência clínica e laboratorial com extratos dializáveis de leucócitos, RNA imune, produtos bacterianos e interferon. Entre estes capítulos, por exemplo, o papel fisiológico do interferon é bem analisado, mas os informes sobre seu papel imunomodulador e anti-tumor são insuficientes.

O capítulo sobre imunomodulação das infecções virais oferece informações relevantes, enquanto o que trata das infecções parasitárias escrito por Binaghi e colaboradores é abrangente mas superficial. Os capítulos referentes ao papel imunomodulador dos antígenos bacterianos, adenosina, deoxadenosina, não convencem quanto ao efeito terapêutico destes. Imunomoduladores sintéticos como levamisol, methisomprimol, e outros como ciclosphorina A são também analisados. Da mesma forma, uma abordagem terapêutica e diagnóstica dos anticorpos monoclonais em pacientes imunodeficientes e transplantados pode ser encontrada. Pouca ou nenhuma ênfase é dada a imunomoduladores, como o corticosteroide, amplamente utilizados na prática clínica que carecem de informações adequadas para avaliação de seu uso.

Finalmente, se trata de um livro bem editado, de interesse para os imunologistas ou estudiosos nas áreas de fronteira, que queiram familiarizar-se com diversos agentes imunomoduladores. Apesar das observações acima contidas, eu recomendo este

livro, no intuito de chamar atenção para uma área pouco estudada entre nós e de grandes perspectivas terapêuticas futuras.

Alberto José Duarte
Disciplina de Imunopatologia
Faculdade de Medicina USP
Av. Dr. Arnaldo, 715
01255 São Paulo SP

Huang, P.C.; Kuo, T.T. & Wu, R., eds. - *Genetic engineering techniques: recent developments*. New York, Academic Press, 360p., 1982.

Este volume reúne vários artigos e os protocolos de um curso prático sobre o tema acima. Inicialmente há uma seção dedicada à revisões gerais sobre o estado da arte com artigos sobre metilação do DNA, superenrolamento e adenovírus. A técnica de clonagem de DNA é abordada indiretamente no texto através de 4 artigos que abordam problemas distintos. O problema da expressão de genes clonados é endereçado da mesma maneira.

As perspectivas do campo são examinadas discutindo-se o uso de *S. subtilis* como veículo de expressão de genes de eucariotos, a expressão de抗ígenos de hepatite B em células de mamíferos e o uso de anticorpos monoclonais.

O texto é mal integrado, as comunicações representando em geral apenas os interesses dos autores e refletindo o seu trabalho, muito mais do que apresentando uma visão coerente e integrada da situação e do progresso na utilização das técnicas do DNA recombinante.

A seção mais útil do livro reúne protocolos detalhados de algumas técnicas de grande aplicação: produção de anticorpos monoclonais pelo método do hibridoma, microscopia eletrônica, hibridização *in situ* para seleção de clones recombinantes derivados de lirrarias genômicas, transformação com DNA plasmidial e sua purificação, purificação e uso de enzimas de restrição, preparo de gama ^{32}P -ATP e marcação do DNA e seu sequenciamento segundo Maxam e Gilbert.

Francisco G. da Nóbrega
Instituto da Química USP
Caixa Postal 20780
01000 São Paulo SP

Immunology Today, vol. 5(12):336-368, 1984. US\$ Dfl. 120.00.

Immunology Today veio há cinco anos preencher uma necessidade cada vez mais aguda no campo da imunologia que é a de possibilitar aos interessados e estudiosos em imunologia a atualização permanente, rápida e acessível a qualquer leitor.

Através de artigos, na sua maioria encomendados, abrangendo assuntos atuais e de fronteira permite uma leitura rápida e compreensível.

Simultaneamente todos os artigos permitem uma consulta bibliográfica, através de referências de maior significância e do melhor nível científico.

Cada volume apresenta artigos cuja forma é assim distribuída: Artigo de Revisão - constituído de assuntos atuais onde estejam ocorrendo progressos rápidos; Artigos de compasso - constituidos de comentários críticos abrangendo um ou vários trabalhos recentes que trouxeram contribuições importantes; Artigos de Rostro - envolvendo opiniões pessoais, hipóteses e especulações; Cartas ao Editor - envolvendo comentários dos leitores a respeito de artigos recentes publicados em I.T.

Esta revista devido a sua atualidade, sua compactação e seu preço passou a constituir uma leitura indispensável aos pesquisadores, professores e alunos.

Existe uma oferta de preço, muito especial para alunos de graduação e pós-graduação.

Thereza L. Kipnis
 Instituto de Ciências Biomédicas USP
 Deptº de Imunologia
 Edifício Biomédicas III
 Cidade Universitária USP
 05508 São Paulo SP

LAPP - Latin American Professorship Program

1. O que é

Programa originalmente criado em 1964 por membros da Academia Americana de Microbiologia e tinha como objetivo dar assistência aos colegas latino-americanos a expandir a microbiologia pelo hemisfério.

Em 1977 a responsabilidade do LAPP foi transferida para a ASM (American Society of Microbiology), como um grupo subordinado ao BET (Board of Education and Training).

Atualmente, a principal finalidade do Programa é de elevar a pesquisa e prática da microbiologia nas regiões latino-americanas, através da realização de cursos em centros especializados, por cientistas altamente qualificados.

2. Como atua

O LAPP é formado por um comitê cujos membros são indicados pelo Presidente da ASM, por recomendação do superintendente do BET. As pessoas que compõe este comitê são os representantes para uma ou mais regiões latino-americanas nos EUA. Na sua maioria são indivíduos familiarizados com recursos para microbiologia, convededores das problemáticas existentes, uma vez que exercem ou exerceram atividades na região para a qual foram designados representantes.

Cada membro do comitê seleciona um representante no país latino-americano, membro da ASM, e que preferencialmente tenha alguma experiência em organizar cursos através do LAPP.

No caso do Brasil, o representante local é a Sociedade Brasileira de Microbiologia, através de João Salvador Furtado.

3. O que oferece

O Programa oferece a vinda de professores altamente qualificados e membros da ASM, que ministrarão cursos em centros especializados nas regiões latino-americanas.

4. Como colabora

4.1. Natureza dos cursos

a. **Objetivo** - O assunto a ser abordado tem que ser baseado nas necessidades e preferências regionais, tem que ser fundamentalmente sobre microbiologia ou diretamente aplicável a problemas que vão de encontro ao bem estar social, tais como: saneamento, saúde pública, agricultura, processamento de alimentos, manipulação de drogas ou microbiologia industrial;

b. **A quem se destina** - Os cursos não são direcionados para pessoas leigas no assunto, mas sim, para aquelas que já tiveram competência na área e desejam conhecimentos adicionados;

c. **Duração** - Geralmente têm duração de 2 a 4 semanas. Cursos intensivos de 1 semana também poderão ser feitos se devidamente justificados;

d. **Época de realização** - Poderão ser ministrados em qualquer época do ano desde que hajam entendimentos prévios com o professor convidado. Algumas vezes é vantajoso incluir o curso antes ou após um encontro nacional ou regional de microbiologia.

4.2. Concessão de recursos

A ASM garante: pagamento da viagem de ida e volta do professor convidado a região latino-americana; custos de diárias e alimentação, somado a quaisquer despesas diversas durante o transito de viagem à região latino-americana. Adicionalmente, a ASM garante ao professor convidado US\$ 100.00 por semana para cursos de 1-4 semanas.

Além dos itens acima mencionado, a ASM garante, se devidamente aprovado, o pagamento do mínimo de despesas extras, impossíveis da organização local arcar.

4.3. Encargos e responsabilidades

- a. Comitê do IAPP - Responsável pela aprovação dos pedidos para realização de cursos. Esses pedidos são submetidos a voto durante a reunião anual da ASM, onde são questionadas relevância dos cursos, disposição e facilidades já providenciadas que assegurem a eficácia do programa, garantia de que o professor convidado seja realmente membro da ASM, etc.
- b. Representante nos EUA - Responsável em manter contato com o coordenador local e ajudar na organização do evento junto a instituição que convida; contribuir para a definição do tema lembrando sempre que este deve ir de encontro às necessidades locais; dar assistência a problemas de identificação e comunicação com o professor convidado;
- c. Representante local - Garantir que todos os arranjos preliminares, bem como as facilidades, estejam asseguradas pela instituição local;
- d. Coordenador local e sua instituição - Responsável pelos arranjos preliminares, que incluem: delineamento do tema; identificação do professor convidado; determinação da data e local a ser ministrado o curso; assegurar inscrição de pessoal qualificado; determinar a fonte financeira para despesas que não serão cobertas pela ASM (transporte, hospedagem e alimentação durante o período de curso); cópia e impressão de material a ser distribuído pelo professor convidado;
- e. Professor convidado - Responsável pela elaboração do curso e produção de material necessário para distribuição aos participantes.

5. Procedimentos preliminares

O pedido para realização do curso deve ser feito por um membro latino-americano local, sócio da ASM. Uma proposta específica deve ser submetida a ASM quando o coordenador local considerar que os arranjos preliminares já tiverem sido feitos.

6. Solicitação de formulários

Sociedade Brasileira de Microbiologia, a/c João Salvador Furtado, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, Cidade Universitária USP, 05508 São Paulo SP.

7. Encaminhamento e prazos

É prudente encaminhar a proposta com pelo menos 9-12 meses de antecedência à data do curso. Como os pedidos são submetidos a voto, é conveniente garantir sua remessa com um mês de antecedência à reunião anual da ASM.

8. Relatórios

Após um mês do término do curso, o coordenador local submete ao representante do EUA um relatório de avaliação que deve incluir comentários pessoais e dos inscritos, juntamente com quaisquer sugestões que sirvam para aperfeiçoar o programa.

Gláucia de Camargo Furtado
 Sociedade Brasileira de Microbiologia
 Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
 Cidade Universitária USP
 05508 São Paulo SP

Lomberg-Holm, K. & Philipson, L. ed. - Virus receptors. Part 2 - Animal viruses. New York, vol. 8, Series B, 217p., 1981.

Trata-se de um livro que relata, em 11 capítulos, o princípio geral envolvido no reconhecimento de receptores virais em células eucarióticas. Dá ênfase a diversidade de estruturas que constituem sítios receptores de partículas virais. Fornece evidências de que a especificidade da interação vírus-célula é bastante acentuada, sendo possível, pois, classificar as viroses em duas famílias distintas com base na associação vírus-receptor. O capítulo introdutório consiste de técnicas essenciais para a medida da interação dos vírus com as células, incluindo alguns comentários referentes a problemas técnicos na detecção da associação vírus-receptor durante o isolamento e caracterização do receptor "in vitro". Os diferentes segmentos da publicação, apesar do elevado nível, são compreensíveis, redigidos por especialistas das respectivas áreas e podem, portanto, ser consultados separadamente. Este volume é de interesse não só para microbiologistas como também para bioquímico e biólogistas celulares e moleculares. Constitui também, por exemplo, um estímulo para a utilização de vírus, com receptor de conhecida especificidade, para a caracterização de componentes celulares de superfície. Nesse sentido, em nossa linha de pesquisa, foi utilizado o vírus Sendai, através reação de aglutinação em microscopia ótica e eletrônica, para o reconhecimento de resíduos de ácido siálico expostos na superfície celular de protozoários pertencentes ao gênero *Herpetomonas*.

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

Microbiological Sciences, 1(1):1-28, April 1984.

Trata-se de um novo periódico mensal patrocinado pela União Internacional de Sociedades de Microbiologia (IUMS), da qual faz parte a SBM. A revista se propõe a publicar revisões, artigos originais e cartas dentro de todas as áreas da microbiologia, com especial ênfase a bacteriologia, micologia e virologia. Além disso, trará em cada número uma revisão de cunho didático.

Correspondência para maiores informações ou exemplares deverá ser remetida para: Blackwell Scientific Publications Ltd., Osney Mead, Oxford OX2 0EL, England.

Ilvan D. Ricciardi
 Instituto de Microbiologia UFRJ
 Centro de Ciências da Saúde
 Bloco I - Ilha do Fundão
 21941 Rio de Janeiro RJ

Moore-Landecker, E. & Cliffs, E.N.J. - Fundamentals of the fungi. 2.ed. New York, Prentice-Hall, 578p., 1982. US\$ 39.95.

Dez anos após o lançamento da primeira edição do seu livro "Fundamentals of the fungi" surge a segunda edição, pela mesma editora, com modificações no formato e na apresentação gráfica, além de razoável aumento do número de páginas impressas. Esta combinação de alterações permitiu uma edição cujo conteúdo é 44% maior que o anterior.

Internamente, a autora manteve a mesma estrutura básica do texto da edição anterior, dividido em três partes: Morfologia e taxonomia; Fisiologia e reprodução, e a última: Ecologia e utilização pelo homem.

A ampliação do texto se deu principalmente na primeira parte com a inclusão de novos grupos, como Trichomycetes e Endogonaceae. Por outro lado, houve aprofundamento de tratamento de grupos anteriormente mencionados. Ainda assim, os Myxomycetes continuam excluídos e as explicações da autora (página 19) não parecem ser convincentes. Principalmente se atentarmos para o fato dela utilizar o esquema proposto por G.C. Ainsworth (1973) para o tratamento desses organismos.

Ainda nesta parte do livro, há um certo desequilíbrio no tratamento de alguns grupos, que pode ou não se repetir em outros não analisados aqui com profundidade, e que será ilustrado pela abordagem dada aos Mastigomycota. Inicialmente, a autora fugiu ao tratamento dado ao texto como um todo, para seguir a linha proposta por Sparrow (F.K. Sparrow) em 1973 e 1976. Neste último trabalho, o autor sugere a existência de dois grandes grupos ou séries nos Oomycetes, aos quais dá o nome de "galáxias": Saprolegniana (com seis famílias) e Peronosporacena (com três famílias). Não houve qualquer proposição nomenclatural de instalação dos táxons. Além disso, sem qualquer justificativa maior aceita determinados grupos e rejeita outros. A proposta do maior estudioso dos fungos zoospóricos é coerente e avançada, mas ainda incompleta. Em um livro didático como o analisado, não parece cabível aceitar proposta no estágio em que se encontra a de F.K. Sparrow. Além disso, os demais especialistas nos grupos envolvidos ainda não apresentaram as suas opiniões a respeito de tal esquema.

Por outro lado, nem todas as ordens são tratadas e nem poderia ser diferente, pois não haveria espaço suficiente para tanto. Porém, deveriam, no mínimo, ser citadas, ou então uma observação, tal como consta na página 125 - "not treated further" seria suficiente. Diferenças a nível de ordem ou família poderiam ser colocadas como aparecem na página 104, sob a forma de quadro, porque seriam mais facilmente visualizadas.

No que diz respeito às demais partes (Fisiologia e reprodução e Ecologia e utilização pelo homem) estas não foram sensivelmente ampliadas, porém sofreram a necessária atualização.

O livro é profusamente ilustrado. Fotografias, microfotografias (óptica, eletrônica e de varredura) e desenhos a traço convivem em uma diagramação que pode, inclusive, fugir ao espaço destinado à mancha gráfica (páginas 34 e 35). Elas são de qualidade variável, de razoáveis a excelentes, predominando porém, as últimas. Poucas são muito claras (página 219), outras tantas carregadas demais (página 210), prejudicando com isso a compreensão dos detalhes.

Os ciclos de vida, bem como os esquemas apresentados são de fácil assimilação.

Ao final de cada capítulo as referências foram ampliadas e atualizadas. O acesso aos termos mais específicos foi facilitado pela inclusão de um glossário também modernizado. Índices para autores e assuntos completam o volume, cujo acabamento, em capa dura, é de boa qualidade.

O incremento na abordagem da taxonomia e da morfologia fez desta edição um livro mais aprofundado nestas áreas, sem porém deixar de tratar dos aspectos fundamentais da fisiologia, bioquímica, ecologia, reprodução e utilização dos fungos pelo homem, e nisto se distancia dos recentes lançamentos de livros similares, como a segunda edição de "Introduction to fungi" de John Webster e a terceira edição de "Introductory mycology", de C.J. Alexopoulos e C.W. Mims. O tratamento dado por Moore-Lan-decker à utilização dos fungos pelo homem é excelente (p. 514-545).

Os iniciantes no estudo da micologia estão bem servidos pelos lançamentos acima citados e ainda terão uma oportunidade de comparar abordagens diferentes sobre o mesmo assunto: micologia.

Adauto Ivo Milanez
Seção de Micologia e Lichenologia
Instituto de Botânica
Caixa Postal 4005
01000 São Paulo SP

O'Brien, S.J., ed. - Genetic maps 1984. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 584 p., 1984. US\$ 33.60.

A publicação Genetic maps resultou da 5ª Conferência Internacional sobre Mapeamento de Genes Humanos realizada em Edinburg, Escócia, em 1979. Esse congresso foi organizado para discutir mapeamento gênico comparativo de mamíferos e a extensão de ligações parentescas conservadas entre genes homólogos, durante a evolução.

Os mapas genéticos de muitos organismos que apareceram originalmente, em diferentes publicações, tornavam o trabalho comparativo dessas estruturas quase que impossível. A reunião desses trabalhos resultou no Genetic Maps 1, publicado em 1980.

O volume 3 de Genetic Maps 1984 apresenta-se atualizado e é surpreendente o número de organismos envolvidos nessa compilação de mapas de ligação e de restrição. Contém 85 mapas que abrangem 75 diferentes organismos. São encontradas informações precisas sobre o mapeamento de vírus bacterianos e de animais, bactérias, algas, protozoários, fungos filamentosos e leveduriformes, nematóides, insetos, peixes, anfíbios, roedores e outros mamíferos, aves, primatas e plantas.

Nessa edição aparecem também informações precisas referentes ao sequenciamento de ácidos nucleicos e proteínas.

Trata-se de um livro de grande interesse para aqueles que estão envolvidos em qualquer área de genética.

Sérgio Olavo Pinto da Costa
Instituto de Biociências USP
Cidade Universitária
Caixa Postal 11461
01000 São Paulo SP

Para melhorar a apresentação em congressos

Ao longo de 15 anos, verifica-se que os eventos da Sociedade Brasileira de Microbiologia ainda surpreendem pela forma como grande parte de conferencistas e apresentadores de grandes temas, relegam técnicas didáticas básicas. A título de colaboração, são apresentados alguns pontos a serem considerados e se de interesse, divulgado.

A boa conferência deve dar vida a fatos e idéias muitas vezes frias e impessoais encontrados em textos. Para se atingir a este fim, o conferencista não deve se restringir a repetições de textos; deve, sim, através de sua experiência, reflexão e senso crítico, vivificar as informações transmitidas. A exposição oral proporciona oportunidade de esclarecimento de conceitos difíceis e enfatização de informações importantes, desde que transmitidos de uma forma clara. Além disso, este tipo de exposição é a maneira "econômica" de transmitir a informação que, de outra forma, exigiria a pesquisa, através de enorme quantidade de material, às vezes relevantes, ou, até, sem importância. Outro aspecto a se considerar é que a apresentação oral dá ensejo a que o conferencista selecione, compare, analise e sintetize, racional e cuidadosamente, a informação advinda de textos, periódicos e experiência pessoal. Em mesa-redonda ou painel, onde as apresentações orais se sucedem e particularmente, em congressos, onde os debates deveriam ser a tônica do evento, os conferencistas devem criar atmosfera que permita perguntas e os coordenadores ou apresentadores, devem cuidar para que as mesmas sejam respondidas, no período destinado aos debates.

A boa apresentação exige aptidão técnica e caberia aos organizadores dos eventos atentar para este aspecto. É curioso como os alunos, de uma forma geral, têm muito mais consciência desta limitação que os próprios professores; mais curioso ainda é que quando um daqueles alunos se torna professor, comporta-se da mesma maneira que seus professores!

Sem ter a pretensão de abordar todos os pontos que favoreçam a boa apresentação, são levantados alguns, a título de ponderações para expositores.

1. Estabelecer os objetivos da apresentação. No caso de mais de um, ter a certeza de que o plano expositivo permite a realização de todos eles.

2. Planejar a sequência de apresentação para evitar o fato muito frequente de perceber, que, no meio de uma idéia, não ter completado a idéia anterior, levando a platéia à confusão.
3. Atentar ao limite de tempo; procurar encaixar, com senso de realidade, tudo o que puder no prazo estabelecido, para alcançar os objetivos propostos. Respeitar o tempo dos oradores seguintes!
4. Dar motivação a seu tema. É muito comum o apresentador partir do pressuposto de que sua exposição despertará interesse dos assistentes, apenas porque ele próprio se interessa, ou ainda de que a platéia irá compreender a matéria apresentada, simplesmente porque ele a comprehende.
5. Estar inteiramente familiarizado com o conteúdo da apresentação e tentar prever quais as eventuais perguntas críticas dos assistentes e como respondê-las.
6. Elaborar um esquema de notas sucintas e facilmente legíveis. Isto permitirá o desenvolvimento da apresentação, dentro de sequência conveniente, além de se garantir contra o esquecimento.
7. Não discursar, não ler nem regorgitar, decorativamente. O tom deve ser audível e natural. Ao falar ao microfone, certifique-se de que todos estão ouvindo. Lembre-se de que, se os assistentes não forem capazes de ouvi-lo, sua apresentação será um fracasso! Olhar para a platéia e não para a janela, quadro negro ou paredes. Você deve perceber se está se comunicando e a vista é uma das formas de averiguação.
8. Nem sempre a palavra é o único meio de comunicação. Utilize-se de material audio-visual ("slides", transparências, filmes), porém sem exagero. Ispécione previamente a sala, a fim de verificar a propriedade de luz, ventilação, ruidos e disposição dos lugares. Verifique, antes da apresentação, se os aparelhos estão funcionando. Caso vá usar o quadro negro, faça-o de forma legível e lembre-se dos participantes que estão no fundo da sala e que devem enxergar e entender o que foi escrito. Isto é válido para transparências ou "slides". Procure colocar a informação de forma clara e não em tabelas ou gráficos, que não permitem ao assistente descobrir os dados, considerados ou que devam ser importantes, ressaltados. Não coloque "slides" desnecessários, dizendo ao ser projetado, "este não é importante" ou "vamos em frente" (por quê os colocou, então?).

Um aspecto, que nem sempre cabe aos conferencistas e sim aos organizadores, é quanto ao horário das palestras; imediatamente após as refeições ou nas últimas horas da tarde favorecem a maior desatenção.

Sem ter tido a pretensão de explorar todos os aspectos relativos a este assunto, espera-se com estes comentários, fornecer subsídios aos conferencistas, e desta forma, tornar as reuniões mais atraentes e proveitosas.

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

Ratledge, C. & Stanford, J., eds. - *The biology of the mycobacteria: immunological and environmental aspects*. New York, Academic Press, vol. 2, 554p., 1983. US\$ 60.00.

Trata-se do segundo volume de uma série de dois, com 554 páginas, que pode ser dividido em três partes:

- a. os aspectos imunológicos dos constituintes destes microrganismos no que diz respeito ao papel como adjuvantes e抗原s; o espectro histopatológico das micobactérias, com ênfase na discussão do granuloma micobacteriano e na análise do espectro hanseniano; e, as interações parasito-hospedeiro, em que os fagócitos mononucleares são analisados quanto as suas características "in vitro" e "in vivo", assim como em relação ao seu ambiente intracelular; b. dedicada à aspectos relacionados com as micobactérias encontradas no ambiente e sobretudo sua implicações com a imunidade frente a tuberculose e a hanseníase, bem como a interferência com a vacinação BCG, e as micobactérias que ocorrem em animais em condições naturais, con-

siderando entre outros aspectos, a vacinação e os diversos métodos diagnósticos; c. e discute doenças de possível etiologia micobacteriana, especificamente a doença intestinal inflamatória inespecífica (Chron) e sarcoidose.

Trata-se de um volume de uma obra de revisão que na nossa opinião é importante para consulta em institutos, departamentos, etc, interessados em micobactérias e micobacterioses.

Paulo Pinto Gontijo Filho
Instituto de Microbiologia UFRJ
Centro de Ciências da Saúde
Bloco I - Ilha do Fundão
Caixa Postal 68040
21941 Rio de Janeiro RJ

Revista Internacional de Laboratórios Médicos - Medilab, 2/3:1-56, 1985.

A Revista Internacional de Laboratórios Médicos (MEDILAB) divulga trabalhos de grande interesse para os profissionais da área, satisfazendo plenamente os seus propósitos.

A sua publicação inclui assuntos referentes a abordagens clínicas e laboratoriais da área de bioquímica, hematologia, banco de sangue, imunologia e microbiologia, enfocando aspectos polêmicos e atuais de cada área citada, de forma objetiva e sintética. A qualidade dos trabalhos científicos divulgados nesta Revista é comparável aos periódicos de alto nível da área. Além daqueles dados, a Medilab apresenta ainda: notícias de laboratórios de diversos países de vários continentes, divulgação de modernos aparelhos, equipamentos, reagentes químicos e biológicos de utilidade na área, de forma bastante ilustrativa, além de publicações técnicas específicas como livros, periódicos, catálogos e um intenso calendário internacional sobre eventos como: congressos, simpósios, reuniões científicas, exposições de equipamentos laboratoriais da área hospitalar relacionadas à área.

Esta revista é editada nos EUA, em vários outros idiomas além do inglês, o que facilita a consulta por profissionais de vários países.

Trata-se enfim de um veículo de divulgação de grande utilidade, não só para profissionais da área, mas também para estudantes, professores, pesquisadores, estagiários, residentes, médicos, que mantêm estreito intercâmbio com o laboratório clínico.

Elsa M. Mamizuka
Deptº de Análises Clínicas e Toxicológicas
Instituto de Química USP
Caixa Postal 20780
01000 São Paulo SP

Roizman, B., ed. - The herpesviruses. New York, Plenum Press, vol. 3, 416p., 1985. US\$ 55.00.

O livro, terceiro de uma série sobre os herpes vírus, está dividido em nove capítulos, segundo três linhas de discussão. Os capítulos sobre a epidemiologia e a latência do vírus do herpes simples (HSV) como aqueles sobre as glicoproteínas codificadas pelo HSV e o vírus da citomegalia (CMV), constituem uma introdução aos aspectos da imunologia e patogênese a serem apresentados no próximo volume 4 da coleção.

A epidemiologia do HSV é apresentada com base na sua disseminação nas populações humanas através da sua característica fundamental que é estado de latência no hospedeiro.

Os mecanismos envolvidos na formação desta latência, inclusive os substratos anatômicos ao nível do sistema nervoso, são detalhados constituindo-se em um dos mais interessantes capítulos do livro. O papel das glicoproteínas da membrana na infecção inicial da célula é discutido amplamente, considerando que estas proteínas aparecem não só na superfície da partícula viral, como na superfície de células infectadas produtoras de vírus, com implicações diretas na resposta imune.

Nos capítulos sobre o potencial de transformação do HSV e CMV, bem como sobre o papel do HSV em neoplasias humanas, apresenta-se uma avaliação crítica destes complexos campos de pesquisa aos quais tem sido dedicados, nos últimos anos grandes esforços, em especial sobre as bases genéticas da transformação morfológica.

Finalmente, nos capítulos em que se discute a transcrição do HSV e a biologia molecular do vírus da pseudoraiva (doença de Aujeszky), apresentam-se dados de grande significado especialmente no caso de vírus da pseudoraiva, para um melhor entendimento da biologia molecular dos herpes vírus em geral. Estes aspectos deverão ser mais amplamente discutidos nos próximos volumes da série.

Em resumo, trata-se de um livro de grande valor, como parte de uma coleção que pode ser considerada indispensável aos que tenham interesse direto nos aspectos laboratoriais do grupo e em biologia molecular de vírus em geral e mesmo para o melhor entendimento das expressões clínicas das infecções pelo grupo herpes.

Ressalta-se, não por último, a clareza do texto e das numerosas figuras que ilustram a publicação.

Hermann Schatzmayr
Fundação Oswaldo Cruz
Deptº de Virologia
Caixa Postal 926
21040 Rio de Janeiro RJ

Schenck, N.C., ed. - *Methods and principles of mycorrhizal research*. St. Paul, the American Phytopathological Society, 244p., 1982. US\$ 24.00.

A obra editada por N.C. Schenck é constituída por 18 capítulos escritos por conhecidos especialistas em endo e ectomicorrizas e inclui técnicas que vem sendo utilizadas em todo mundo.

Alguns capítulos abordam a morfologia, anatomia e histologia, incluindo noções teóricas, principais características que permitem a delimitação de gêneros, reações de coloração e técnicas para detecção de componentes orgânicos e inorgânicos incluindo enzimas.

A parte de ecologia, engloba principalmente técnicas para avaliação do número de propágulo no solo, hiperparasitismo, variáveis ambientais, relações fungo-hospedeiro e outros microrganismos do solo.

A fisiologia da associação fungo-planta hospedeira, juntamente com o problema da germinação dos esporos é o tema de outros 4 capítulos.

Além disso, os métodos de produção de inóculo e avaliação de inoculação, são discutidos e mostram a possível aplicação prática das micorrizas em agricultura, reflorestamento e conservação do solo.

Finalizando, são abordadas algumas técnicas de radioisótopos e microscopia eletrônica, mostrando seu uso no estudo das micorrizas.

O livro é portanto, muito oportuno, apresentando um condensado das inúmeras técnicas e métodos para o estudo das micorrizas, desenvolvidas nos últimos 50 anos. A inclusão de princípios ou noções básicas, permite a utilização do livro também por principiantes no assunto e a relação das técnicas dá ao especialista uma avaliação rápida dos meios, já à disposição, evitando consulta aos numerosos trabalhos que vêm sendo continuamente publicados em todo mundo.

Além disso, a obra apresenta, para cada tema, uma bibliografia específica, o que facilita sobremaneira o trabalho de todos interessados.

Vera Lucia Ramos Bononi
Instituto de Botânica
Caixa Postal 4005
01000 São Paulo SP

UNDP/WORLD BANK/WHO - Quarterly Bibliography of Major Tropical Diseases, vol. 7(4):1-137, 1984, vol. 8(1):1-123, 1985.

Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases - O Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais apresenta dois objetivos interrelacionados: a. Pesquisa e desenvolvimento de métodos novos e melhorados para controlar seis doenças tropicais importantes - malária, esquistossomose, filariose, tripanosomiose (Doença do sono e Doenças de Chagas), leishmaniose e lepra; e b. Fortalecer as instituições nacionais, através de treinamento, para aumentar a capacidade de pesquisa de países tropicais afetados por estas doenças.

É no segundo aspecto que o "Quarterly Bibliography of Major Tropical Diseases" é distribuído. Trata-se de uma bibliografia resultante da colaboração entre a "US National Library of Medicine" e o "UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases". A partir do seu sistema de armazenamento de informação bibliográfica computadorizado (MEDLARS) a "National Library of Medicine" fornece cópias da bibliografia para impressão e distribuição pelo Programa Especial. Esta bibliografia relaciona todas as entradas pelo assunto e pelos autores. Adicionalmente, muitas das referências na bibliografia têm resumos em inglês que aparecem na seção dos autores.

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

PRODUÇÃO DE BIOGÁS A PARTIR DE RESÍDUOS ORGÂNICOS

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

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

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

BIOGÁS: PESQUISA OU APLICAÇÃO - PERSPECTIVAS

Elfride Anrain

Fundação de Amparo à Tecnologia e ao Meio Ambiente FATMA
Caixa Postal 1254
88000 Florianópolis SC

A Fundação de Amparo à Tecnologia e ao Meio Ambiente - FATMA, é o órgão estadual responsável pela preservação dos recursos naturais e controle da degradação ambiental, em Santa Catarina.

Por ser um Estado de significativa exploração agropecuária e de indústrias alimentícias, também são representativas as cargas orgânicas poluentes produzidas.

No início de 1979, buscando soluções para a disposição final adequada dos resíduos gerados pela criação de animais confinados, especialmente suínos, uma análise de alternativas técnico-econômicas, entre elas, dispersão no solo, lagoas anaeróbias, aeróbias ou aeradas, bem como biodigestores indicou as vantagens deste último, como um instrumento de saneamento rural, além de produção de energia e de biofertilizante.

Os biodigestores em nº de 221 para o setor rural são hoje divulgados pela Cia. de Eletrificação Rural de Santa Catarina ERUSC, como fonte energética em áreas desprovidas de eletrificação e também através da EMATER-SC, o que tem inclusive permitido a fixação do homem à terra evitando, em alguns casos, o êxodo rural, pela melhoria da qualidade de vida alcançada.

Continuando em seus estudos para o tratamento das cargas poluentes a FATMA buscou a adequação do modelo de biodigestor ao tipo de efluente a ser tratado. Resíduos de características mais fluidas, com grandes vazões mas também menor concentração, necessitam de equipamentos que propiciem um tempo de retenção hidráulico, compatível com o necessário aos tratamentos físico-químicos ou biológicos aeróbios convencionais, isto é, em torno de horas.

A crise energética mundial, também permitiu que o tratamento anaeróbio, conhecido desde os primórdios, fosse reestudado e testado em universidades e centros de pesquisa como uma opção saneadora mais convincente e atrativa economicamente.

A experiência bem sucedida na Europa, momente na Holanda foi aplicada no Brasil para o tratamento de efluentes líquidos industriais de características notadamente orgânicas.

A importância da produção de álcool, a partir da cana-de-açúcar, com a consequente geração do vinhotto a níveis nacionais, representa algo semelhante à produção de resíduos pelo processamento de mandioca na produção de amido e álcool, em Santa Catarina.

As cargas orgânicas lançadas em época de safra conferem ao rio condições comprometedoras, chegando inclusive a remover totalmente o oxigênio dissolvido das águas.

As características peculiares de nosso estado levaram a realização das pesquisas ora em andamento.

Pesquisa aplicada ao tratamento de efluentes - 1. Biodigestor em fluxo ascendente para resíduo de fecularia - O biodigestor piloto usado no experimento, com um volume de 6,5m³, caracteriza-se pela alimentação em fluxo ascendente, formação de leito de lodo microbiano na porção inferior do reator e existência de decantador interno na porção superior.

Durante a operação de 1981, em 74 dias de fermentação, obteve-se um tempo de retenção hidráulica de 2 dias e uma taxa de aplicação orgânica de 8,4kg DQO/m³.d, com uma eficiência em destruição de sólidos voláteis e totais, bem como redução de DQO e DBO em torno de 90%.

O resíduo de fecularia usado para alimentação do reator apresenta DQO média em torno de 6.000mg/l e DBO em torno de 3.500mg/ml.

Foram adicionados nutrientes na forma de fosfato de amônia (NH_4)₂HPO₄ e uréia, bem como usou-se cal hidratado Ca(OH)₂, para a elevação de pH de um valor original de 3,5 a 4,5, ou mais, antes da introdução do influente no reator.

O rendimento do gás manteve-se crescente e os resultados obtidos, extrapolados ao tratamento global dos resíduos gerados no processamento de mandioca para produção de amido, com o uso direto do gás produzido para a geração de vapor para consumo na própria indústria permitiria a substituição de 77% de lenha consumida. Como o balanço energético de uma fecularia é bastante deficitário, além de um sistema de tratamento dos efluentes tem-se a produção de uma fonte energética de utilização imediata.

Na operação de 1982, buscou-se a otimização econômica da pesquisa pela escolha mais criteriosa dos parâmetros de acompanhamento analítico, isto é, realizando menor número de análises físico-químicas e escolhendo parâmetros mais significativos.

Também, adotando-se uma relação de nutrientes mais flexível como $\frac{\text{DQO}}{350} = \frac{\text{N}}{5} = \frac{\text{P}}{1}$, pode ser eliminado uso de fontes externas de nitrogênio e fósforo.

Assim sendo, um controle laboratorial mínimo considerado satisfatório para a segurança da operação seria composto de:

Análises do influente e efluente:

Para caracterização: pH, DQO, DBO, N e P

Para alimentação: pH, DQO

Análises de biomassa: ST, SV, SST, SSV.

Alcalinidade total e bicarbonato e acidez volátil são fundamentais para o período de aclimatação e de aplicação de cargas orgânicas crescentes e análises devem ser realizadas diariamente.

Para elevação de pH e para propiciar o tamponamento do sistema acrescentando suficiente alcalinidade passou-se a preferir o uso de bicarbonato de sódio, em substituição a cal hidratado.

Os resultados desta operação estão ainda em processamento.

2. Biodigestor rural para resíduos animais - O biodigestor rural é resultado de convênio com outras instituições do Estado e coube à FATMA a operação e acompanhamento analítico.

É um modelo misto, construído em concreto, com duas câmaras, sendo uma para fermentação ácida e a outra para fermentação metanogênica, e adotando recursos operacionais como a quebra do sobrenadante por descompressão do gás armazenado, evitando assim, peças móveis de mistura e homogeneização.

Utiliza esterco de suínos para alimentação e está em fase decrescente do tempo de retenção hidráulica (atualmente 26 dias).

As amostras são coletadas em sete pontos, ou sejam, influente, efluente e cinco no interior do reator.

Por ser uma biomassa de alta concentração é preferível para a caracterização das cargas de carregamento, o uso de expressão de sólidos totais e voláteis ao invés de DQO, mais usado para águas residuárias.

Objetiva-se além da produção de biogás, a determinação da redução de organismos patogênicos do esterco, permitindo a aplicação mais diversificada do biofertilizante.

3. Biodigestor em fluxo ascendente para efluente de indústria têxtil - A grande densidade de indústrias do têxtil em Santa Catarina, a necessidade de tratamento que demanda, através dos processos físico-químicos ou biológicos aeróbios, significativos investimentos e/ou existência de grandes áreas disponíveis levou a FATMA a testar, em escala de laboratório, o efluente desta atividade industrial em biodigestores tipo fluxo ascendente e leito de lodo anaeróbio.

Estão sendo realizados 6 ensaios em reatores de 1 litro, fundamentalmente para testes de digestibilidade.

Apesar da grande diversidade de componentes químicos e da potencialidade tóxica de alguns destes componentes presentes no efluente têxtil os resultados até agora alcançados não apresentam sinais de inibição a nível significativo.

No reator de 30L, em fluxo ascendente é observada a remoção da carga poluente em termos de Demanda Bioquímica de Oxigênio.

Operando com um tempo de retenção hidráulica de 1 dia, a DBO tem sido reduzida crescentemente indicando a aclimatação microbiana a esta nova biomassa.

Como o pH deste efluente é alcalino (pH = 10-12) um floculante de características alcalinas como é a cal não seria o mais adequado.

Estão em testes o uso de outros produtos auxiliares da coagulação para melhorar a formação de flocos mais densos e decantáveis buscando a utilização global do equipamento UASB, que é a soma de um processo de filtração, digestão e decantação.

4. Biodigestor em fluxo ascendente para efluente do processamento de cana-de-açúcar

- Buscando, especialmente, a melhoria da formação de grânulos, característica peculiar do modelo de biodigestor adotado, está sendo operado um reator em escala de laboratório (30L).

Os critérios de partida e aclimatação que propiciam a granulação, entre outros, são: a. necessidade de usar-se grandes quantidades de inóculo, isto é, lodo já adaptado em outros reatores; b. permitir ótimo crescimento bacteriano suplementado a alimentação com adição de nutrientes extrato de fermentos e fertilizantes comerciais; c. manter a temperatura próxima a 35°C; d. usar vários tipos de inóculo, dois ou mais para obter-se diferentes microrganismos; e. usar um inóculo denso; f. manter o pH próximo a neutralidade; g. reciclar o efluente para recuperar microrganismos; h. manter um baixo tempo de retenção hidráulica (em torno de 1 dia); i. manter a taxa de lodo em torno de 0,6kg DBO/kg SSV.dia (relação alimento:microrganismos). Para partida usar 0,05kg DBO/kg SSV.d; j. ter ácidos voláteis em valores altos e observar a sua degradação; l. possuir íons divalentes. Ex: Ca²⁺ para favorecer a floculação.

Uma biomassa com excelentes propriedades de granulação pode ser usada para a partida de outros reatores, como acontece atualmente na Europa.

Estes são os experimentos ora em operação e o objetivo que perseguimos é, além dos resultados satisfatórios em escala de laboratório e de demonstração, a aplicação diversificada e ampla do processo para, ao comprovar a praticabilidade de alternativas mais econômicas, acelerar a recuperação da qualidade ambiental do nosso Estado.

Impresso em offset



Avenida Boa Vista, 64
Via das Mercês São Paulo
Fone: 914-0233
CEP 04238

com filmes fornecidos pelo editor

