

Revista de Microbiologia



SBM

Sociedade
Brasileira de
Microbiologia

São Paulo — Brasil

Volume 17 Número 2 Abr.-Jun. 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 unidades internacionais (Enzyme Nomenclature, Elsevier Publ. Co., 1965). Para pesos e volumes, devem ser usados os prefixos nanq (n) e pico (p), ao invés de milimicro (m μ) micro (μ). Comprimentos devem ser expressos em micrômetro (μ m; 10^{-6} m), ao invés de micro (μ); nanômetro (nm; 10^{-9} m), ao invés de milimicro (m μ); e Angstroms (Å ; 10^{-10} m). Partes por milhão (ppm) devem ser expressas como microrganismos por milímetros (μ g/ml) ou microlitros por litro (μ litros/litro). A Revista se reserva o direito de adaptar os manuscritos ao estilo adotado.

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

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

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS — No texto, as referências devem ser citadas por número. Os sobrenomes de dois autores devem ser separados por &; quando houver mais de dois autores, a separação é feita por um ponto e vírgula e o último por &. Na seção **Referências Bibliográficas** as citações devem ser por ordem alfabética de autor (ou da mesma combinação de autores) e, para um mesmo autor, em ordem cronológica, numeradas seqüencialmente. 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 Rép. (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 arábico e datilografadas em páginas separadas. Os dados devem ser arranjados de maneira que colunas de material idêntico sejam lidas perpendicular e não transversalmente. Cabeçalhos e legendas devem ser suficientemente claros e compreensíveis, sem necessidade de consulta ao texto. São permitidas notas explanativas de rodapé indicadas por asteriscos, mas não descrições pormenorizadas dos experimentos. Materiais e métodos utilizados para a obtenção dos resultados devem ser incluídos na seção correspondente.

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

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 Dept.º 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 agremiar microbiologistas brasileiros; a promover o desenvolvimento da microbiologia através do estímulo à pesquisa científica e suas aplicações, melhorar as qualificações profissionais dos microbiologistas; e manter intercâmbio e fazer aproximação com entidades que visem objetivos semelhantes.

Organiza, a cada dois anos, na última semana do mês de julho, o Congresso Brasileiro de Microbiologia e edita a Revista de Microbiologia, com distribuição trimestral. Para informações sobre a SBM, escrever para qualquer membro da Diretoria.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

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

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
 PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA
 VOLUME 17 ABRIL-JUNHO 1986 NÚMERO 2
 REV. MICROBIOL. (S. PAULO), 17(2)

CONTEÚDO

CONTENTS

Monteiro, R.T.R.; & Hunter, M.I.S.	99 Composição lipídica de <i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Lipid class composition of Aspergillus nidulans</i>
Bermudez, L.E.; Silva, V.M.M.; & Vidal, E.	102 Efeito do cloranfenicol sobre a função in vitro dos leucócitos polimorfonucleares (PMN)	<i>Effect of chloramphenicol on the phagocytic function of polymorphonuclear leukocytes</i>
Costa, E.O. da; Coutinho, S.D.; Castilho, W.; Teixeira, C.M.; Gambale, W.; Gandra, C.R. de P.; & Pires, M. de F.C.	107 Etiologia bacteriana da mastite bovina no Estado de São Paulo, Brasil	<i>Bacterial aetiology of bovine mastitis, São Paulo State, Brazil</i>
Cauduro, P.F.; Mezzari, A.; Dias, C.A.G.; & Hofer, E.	113 Isolamento de <i>Salmonella tennessee</i> em fezes humanas no Rio Grande do Sul	<i>Salmonella tennessee from human feces in Rio Grande do Sul, Brazil</i>
Andrade, J.R.C.; & Rosa, M.R. de S.	116 Investigações sobre propriedade adesiva (aderência localizada) característica dos sorogrupos enteropatogênicos de <i>Escherichia coli</i>	<i>Investigation on an adhesive property (localized adherence) characteristic of classic enteropathogenic serogroups of Escherichia coli</i>
Cullen, B.T.; Falcão, D.P.; & Landgraf, M.	126 Análise microbiológica de alimentos infantis	<i>Microbiological examination of infant foods</i>
Lima, E. de O.; Maia, R.F.; Barbosa F♀, J.M.; & Xavier F♀, L.	132 Atividades antibacteriana e antifúngica de derivados mesoiônicos	<i>Antibacteria and antifungic activities of the mesoionic derivatives</i>
Cury, A.E.	137 Atividade "in vitro" de alguns anti-sépticos sobre <i>Candida</i>	<i>"In vitro" activities of some antiseptic drugs for Candida</i>
Gontijo F♀, P.P. & Romão, C.M.C.P. de A.	143 Testes microbiológicos e o registro de sanificantes, desinfetantes e antisépticos junto a Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária	<i>The evaluation of the antimicrobial activity of disinfectants, sanitizers and antiseptics and of registration of these products</i>

- | | | |
|---|--|--|
| Martins, M.T.;
Sanchez, P.S.;
& Marques, E. | 148 Eficácia do tratamento
químico e térmico na
destruição de patógenos
em lodo digerido | <i>Efficacy of chemical and
thermic treatment for
pathogens destruction in
digested sludge</i> |
| Araújo, E.H. de;
Melo, G.S.;
& Oliveira Jr., I. de. | 155 Operação de biodigestor
anaeróbio em escala de
bancada para a produção
de biogás a partir de
soro de leite | <i>Operation of the
anaerobic digester in
bench scale for the
production of methane
gas by cheese whey</i> |
| Schmidell, W.;
Craveiro, A.M.;
Varella, R.F.;
Peres, C.S.;
& Hirata, Y.S. | 162 Início de operação de
biodigestores para
resíduos sólidos | <i>Start-up of biodigesters
for solid wastes</i> |
| Informação
Técnico-Científica SBM | 173 | |
| Penido Fº, P. | 183 Construção de
biodigestores e
adaptação de
equipamentos para uso
com biogás | |

LIPID CLASS COMPOSITION OF ASPERGILLUS NIDULANS

Regina Teresa Rosim Monteiro

EMPRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Rodovia Campinas-Mogi Mirim Km 127,5
13820 Jaguariúna SP, Brasil

& Marcus Ian S. Hunter

Department of Biochemistry & Microbiology
University of St Andrews
KY 16 9AL Scotland

Summary

The yield of total lipid obtained with a modified minimal medium (MMM) (C:N = 291) was 22,5% (dry mycelium) compared with only 6,8% for a previously described medium (N & S) (C:N = 69). The increase in MMM was mainly accounted for by the sterol fraction and not, as expected, by an elevated proportion of triacylglycerols. Medium composition had no effect on the lipid class composition which consisted of 75% neutral lipid, 17% phospholipid and 8% glycolipid. The major phospholipid class in both media was phosphatidyl choline and in N & S medium, but not MMM, phosphatidyl ethanolamine was also a significant component.

Resumo

Composição lipídica de Aspergillus nidulans

A composição lipídica de *A. nidulans* foi determinada e o resultado do crescimento em dois meios de cultura diferentes foi comparado. A produção de lipídios totais em meio mínimo modificado (MMM) (C:N = 291) foi de 22,5% (do peso seco) e em meio descrito por Naguib & Saddik (6) (N & S) (C:N = 69) foi somente de 6,8%. O aumento obtido em MMM foi principalmente devido a um aumento na fração dos esteróis e não na fração dos triacilglicerídeos como era de se esperar. A composição do meio não teve efeito na proporção das frações lipídicas, a qual mostrou ser 75% de lipídios neutros; 17% fosfolipídios e 8% glicolipídios. Dos fosfolipídios presentes, fosfatidil colina foi o principal componente em ambos os meios. Em meio de N & S, mas não em MMM, fosfatidil etanolamina também esteve em proporção significativa.

Introduction

Total lipid extracted from living organisms are normally complex mixtures which can be easily separated into neutral and polar lipids fractions. Neutral lipids can be further separated into sub classes such as triacylglycerol, sterol and sterol ester. Polar lipids are made up of phospholipids and glycolipids. The proportion of each of these fractions depends on the organism and cultural conditions. Studies of *A. nidulans* lipids were first carried out by a group of researchers at Manchester

University. They determined its lipid content and fatty acid composition in a variety of media and cultural conditions with a view to commercial applications. A complete review of this work can be found in Woodbine (11). Lipid content of *A. nidulans* was also determined after growth on several carbohydrate and nitrogen sources by Naguib (5) and Naguib & Saddik (6, 7). While *A. nidulans* lipid content and fatty acid composition has been determined under various cultural conditions its lipid classes has not previously been explored although more recently ergosterol was identified as the major free sterol of *A. nidulans* by Shapiro & Gealt (10). In fact, this is also true for lipid composition of most filamentous fungi which have been investigated. Since lipid composition is very important when one is interested in its possible commercial use (9), we have proceeded with a detailed lipid class analysis of this fungal species.

Material and Methods

Organisms and growth conditions - *Aspergillus nidulans* 1640 from Commonwealth Mycological Institute (Kew, England), was grown in a medium described previously by Naguib & Saddik (6) (N & S medium) and in a modified minimal medium (MMM) using the MM described by Pontecorvo & col. (8) but with 12% glucose + 0.1% NaNO_3 . The growth was carried out in 5% of media in a Fermenter (New Brunswick), (MF 114) for 12 days at 30°C, rotation 400 r.p.m. and aeration 0.6 l air/l medium/min. Cells were collected by vacuum filtration, immediately frozen with liquid nitrogen and stored at -15°C until used.

Lipid extraction - 10g of dry and lyophilized mycelium was extracted with chloroform-methanol (1:2, v/v) as described by Kates (4).

Column fractionation - The total lipid was first fractionated on acid-treated Florisil, using chloroform, acetone and methanol as eluants. Three classes of lipids were obtained in this way: neutral lipids glycolipids and phospholipids, respectively. A further fractionation of the neutral lipid class was carried out on 7% hydrated Florisil, eluting the column as described by Kates (4). The identification of neutral lipid class was by thin layer chromatography (TLC) on silica gel G, using: hexane-ether-acetic acid (80:20:1, v/v) as mobile phase.

The polar lipids were separated by two dimensional TLC on commercial plates (60H Merck, Germany) using the following solvent systems: 1:chloroform-methanol-ammonia 25%, w/v - water (160:88:11:11, v/v); 2:chloroform-methanol-diisobutyl ketone-acetic acid-water (45:15:30:20:4, v/v).

Results and Discussion

The total lipid content (g/100g dry mycelium) was found to be 22.5 in MMM and 6.8 in N & S medium. However the medium composition seems to have little effect on the proportion of neutral lipids, glycolipids and phospholipids classes, where no statistically significant differences were found (at the 5% level) between the means of four repetition. Thus *A. nidulans* 16040 lipid consist of about 75% neutral lipid, 8% glycolipid and 17% phospholipid. However, further fractionation of neutral lipid class showed that there is a striking difference between the neutral lipid composition in the two media. In MMM the major class, was identified by comparison with standards on TLC as sterol, with triacylglycerols as the second major fraction. On the other hand, in N & S medium, triacylglycerols appear as the major fraction. Therefore, it is concluded that the enhanced lipid content in the former medium is accounted for mainly an increase in the amount of sterols. The results of the two fractionation are shown in Table 1.

High sterol content has also been observed in *Saccharomyces cerevisiae* (2, 3), where about 40-50% of accumulated lipid was shown to be sterol, either free or esterified. Ratledge (9) considered this organism as non-oleaginous, despite its production of large amounts of lipid, since the class which is usually of potential

commercial interest is the triacylglycerol. Microorganisms defined as oleaginous exhibit triacylglycerol as the major constituent, usually about 80-90% of their lipids (9). Nevertheless, the importance of sterols can be exemplified by the exploitation by the pharmaceutical industry of ergosterol, as a precursor of other economically important sterols (1).

The polar lipid composition is also clearly influenced by the medium. TLC of phospholipids of cells grown in N & S medium showed phosphatidyl choline and phosphatidyl ethanolamine as the major components and phosphatidyl inositol, phosphatidyl serine, phosphatidyl glycerol, cardiolipin and phosphatidic acid as minor components, while in MMM only phosphatidyl ethanolamine was produced.

The basis for the difference in the sterol content in the two media is not understood, but it may have physiological significance, since sterols are known to play an important role in the growth and development of fungi and also in the permeability of membranes by affecting internal viscosity and molecular motion of the lipids in the membranes.

Acknowledgment

RTRM is grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) for a post-graduate research studentship (Grant nº 20 0999/81).

References

1. Brennan, P.J.; Griffin, P.F.S.; Losel, D.M. & Tynnel, D. - The lipids of fungi. *Progr. Chem. Fats Other Lipids*, 14:51-58, 1974.
2. Christiansen, K. - Triacylglycerol synthesis in lipid particles from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Biochim. Biophys. Acta*, 530:78-90, 1978.
3. Clausen, M.K.; Christiansen, K.; Jensen, P.K. & Behnke, O. - Isolation of lipid particles from baker's yeast. *FEBS Microbiol. Lett.*, 43:176-179, 1974.
4. Kates, M. - Techniques in lipidology. In: - Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Amsterdam, Work & Work North Holland Publishing, v.3, p.269-610, 1982.
5. Naguib, K. - Growth and metabolism of *Aspergillus nidulans* Eidam in surface culture. *Can. J. Bot.*, 37:353-364, 1959.
6. Naguib, K. & Saddik, K. - Growth and metabolism of *Aspergillus nidulans* Eidam on different nitrogen sources in synthesis media conducive to fat formation. *Can. J. Bot.*, 38:613-622, 1960.
7. Naguib, K. & Saddik, K. - The use of ammonium source of nitrogen in the metabolism of *Aspergillus nidulans* Eidam. *Can. J. Bot.*, 39:955-964, 1961.
8. Pontecorvo, G.; Roper, J.A.; Hemmons, L.M.; MacDonald, K.D. & Bufton, A.W.J. - The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.*, 5:141-238, 1953.
9. Ratledge, C. - Microbial oils and fats: an assessment of their commercial potential. *Progr. Ind. Microbiol.*, 16:119-206, 1982.
10. Shapiro, B.E. & Gealt, M.A. - Ergosterol and lanosterol from *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.*, 128:1053-1056, 1982.
11. Woodbine, M. - Microbial fat: microorganisms as potential fat producers. *Progr. Ind. Microbiol.*, 1:181-245, 1959.

Table 1 - Lipid class composition of *A. nidulans*.

Symbols: Others = mono + diacylglycerol + free fatty acids; Abbreviations = TG = triacylglycerol; S = Sterol; SE = Sterol ester; PL = Phospholipids; GL = Glycolipids

Medium	TG	S	SE	PL	GL	Others
MMM	22,2	36,9	6,3	15,1	8,9	10,6
N & S	47,3	12,5	8,6	19,2	7,0	5,3

EFEITO DO CLORANFENICOL SOBRE A FUNÇÃO IN VITRO DOS LEUCÓCITOS POLIMORFONUCLEARES (PMN)

Luiz Eduardo Bermudez*
Vera M. Marques Silva
& Eraldo Vidal

Deptº de Microbiologia e Divisão de Doenças Infecciosas
Instituto Nacional de Câncer
Praça Cruz Vermelha, 23
20230 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Resumo

O efeito do cloranfenicol sobre a fagocitose de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* pelo leucócito polimorfonuclear (PMN) foi estudada in vitro. Leucócitos humanos, incubados na presença de cloranfenicol mostraram uma capacidade reduzida de fagocitar cepas de *P. aeruginosa*. Este efeito foi máximo após 60 minutos de incubação. Portanto, o cloranfenicol parece suprimir de forma significativa os mecanismos de endocitose dos PMNs.

Summary

Effect of chloramphenicol on the phagocytic function of polymorphonuclear leukocytes

The effect of chloramphenicol on the phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* strains by human neutrophils was studied. Human leukocytes incubated in vitro with different strains of *P. aeruginosa* showed an impaired capacity to phagocytize. This effect was maximum after 60 minutes of incubation. Then, chloramphenicol appears to suppress the mechanisms of endocytosis by PMNs.

Introdução

Já têm sido demonstrados os efeitos adversos de agentes antimicrobianos sobre os mecanismos de defesa do hospedeiro, incluindo a fagocitose pelos PMNs, quimiotaxia, ação do complemento, produção de anticorpos e imunidade celular (1, 7, 12, 15, 16, 17).

Pela sua habilidade de fagocitar e digerir microrganismos, PMN serve como primeira linha de defesa do hospedeiro contra bactérias invasoras. Pacientes imunossuprimidos, particularmente aqueles com doenças neoplásicas, os quais requerem tratamento com vários esquemas quimioterápicos, possuem um risco elevado de desenvolver infecções, principalmente quando se tornam neutropênicos, devido à terapia (4, 13). A sobrevivência, durante este período crítico, depende do tratamento agressivo com antibióticos e, quando necessário, transfusões de granulócitos.

* Endereço atual: Kuzell Institute for Infectious Diseases Research, 2200 Webster Street, room 305, San Francisco, CA 94115-1896, USA.

Dada a importância dos PMNs para a sobrevivência do hospedeiro, é fundamental o conhecimento dos efeitos de determinadas drogas sobre estas células. A inibição da função leucocitária, por antibióticos bacteriostáticos, pode ter importantes implicações terapêuticas. A possibilidade de que as funções dos leucócitos possam ser alteradas durante a terapia antimicrobiana, não tem sido investigada exaustivamente. A maioria de alguns estudos foi inconclusiva e as doses utilizadas do antibiótico foram muito acima das doses terapêuticas (16).

Nosso estudo mostra que PMNs humanos apresentam a capacidade de fagocitose significativamente diminuída, após a exposição à doses terapêuticas de cloranfenicol.

Material e Métodos

Bactérias - Foram utilizadas cepas virulentas de *Pseudomonas aeruginosa*, procedentes do Hospital do Instituto Nacional do Câncer, RJ, todas resistentes à ação do cloranfenicol. As bactérias foram isoladas em meio "cetrimide" (NNN tri-metil-amônia, 0,5g/l) sendo identificadas após este período, através de provas bioquímicas específicas. A sensibilidade ao cloranfenicol foi estudada em placa, pela técnica de difusão com discos (2). As culturas foram lavadas em solução tampão de PES (phosphate buffer solution), e o número de bactérias foi ajustado em 2×10^8 /ml, no espectrofotômetro.

Preparo dos neutrófilos - 40ml de sangue total, obtidos de um doador saudável, foram heparinizados (10U de heparina aquosa/ml) e combinados com dextran 6% (peso molecular 40.000) a uma relação de dois volumes de sangue para 1 volume de dextran. Após 1 hora de sedimentação a temperatura ambiente, a camada sobrenadante, rica em leucócitos, foi obtida, centrifugada a 400rpm durante 30 minutos (23°C), lavada uma vez em solução de Hanks e ressuspensa em solução de cloreto de amônia a 0,83%. Após a lise hipotônica das hemácias, o preparado foi outra vez lavado, centrifugado e ressuspensa em solução salina balanceada de Hanks (pH 7,2). A viabilidade dos leucócitos foi verificada pela habilidade de excluir o tripan-blue a 0,4%. Mais do que 98% dos leucócitos mostravam-se viáveis. A contagem quantitativa e diferencial dos leucócitos foi realizada e a suspensão final foi ajustada a uma concentração de 10^7 PMN/ml.

Estudo da função dos neutrófilos - O cloranfenicol utilizado (CEME, Brasil) foi diluído à concentração de 30µg/ml e sua presença não alterou o pH dos meios utilizados. Tubos plásticos duplicados, contendo 0,5ml da suspensão de PMNs, 0,1ml de uma suspensão com 2×10^8 bactérias, 0,3ml de solução salina de Hanks e 1ml de cloranfenicol à concentração de 30µg/ml foram colocados em rotação contínua no homogeneizador a 37°C, durante 2 horas. Tubos duplicados, contendo leucócitos, solução salina de Hanks, 2×10^8 bactérias, porém sem cloranfenicol, foram incluídos como grupo controle. Amostras foram colhidas após 0, 30, 60 e 120 minutos, diluídas em água estéril e colocadas em placa (0,1ml da última diluição) para a determinação do número de colônias. As placas foram permitidas secar durante 15 minutos e após isto incubadas a 37°C, durante a noite. A porcentagem de bactérias fagocitadas e mortas pelos PMNs foi calculada utilizando a diferença na contagem obtida dos tubos com e sem cloranfenicol.

Medida visual da fagocitose - O índice visual de fagocitose foi determinado combinando-se as bactérias com os leucócitos, previamente expostos ao cloranfenicol, em

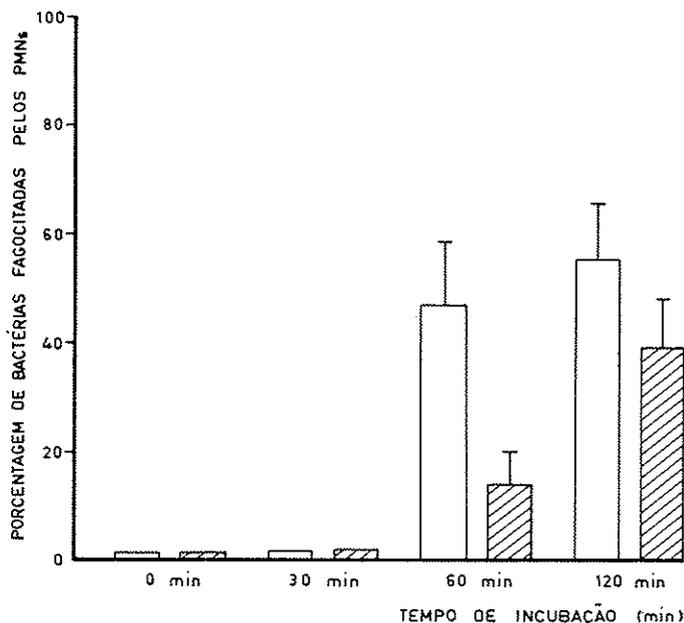
Tabela 1 - Número médio de colônias de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas do supernadante, após incubação com leucócitos polimorfonucleares

Tubos contendo PMN e cloranfenicol	Número de colônias isoladas			
	0 min	30 min	60 min	120 min
A	56±2	56±1	56	22±0,5
B	642±6	640±4	380±1	283±3
C	150±2	150±1	150±2	150±1
Tubos contendo ape nas PMN				
A	60±2	60±2	60	30
B	615±4	615±3	100±2	95±0,5
C	79±1	79±2	66±2	53

solução salina de Hanks. Após 20 minutos de agitação contínua a 37°C, uma amostra foi colhida, colocada em lâmina, corada pelo método de Wright e examinada ao microscópio. A porcentagem de granulócitos associados a bactérias e o número de bactérias por granulócitos, foram determinados contando-se 200 células.

Análise estatística - A comparação entre os tubos com e sem cloranfenicol, e a resistência das bactérias à fagocitose, foram analisadas pelo teste de Student.

Figura 1 - Porcentagem de bactérias fagocitadas pelos PMNs. Comparação entre PMN previamente expostos ao cloranfenicol (▨) e PMN sem prévia exposição (□)



Resultados

A capacidade de fagocitose do PMN foi testada após a exposição ao cloranfenicol. As cepas de *Pseudomonas* foram utilizadas na ausência de soro humano, a fim de evitar a ação de substâncias opsonizantes; porém, foi adicionada albumina humana à solução, para que houvesse, no meio, íons importantes nos mecanismos de fagocitose. Os resultados do experimento são mostrados na Tabela 1 e nas Figuras 1, 2, 3.

Tanto nos tubos contendo cloranfenicol, assim como naqueles não contendo a droga, nenhum grau de fagocitose foi observado após 30 minutos de incubação, possivelmente pela ausência de substâncias opsonizantes no meio. Quando a fagocitose foi testada com PMNs previamente expostos ao cloranfenicol, observou-se que após 60 minutos, o valor médio de bactérias fagocitadas foi de 14% do inóculo inicial ($p > 0,5$). Após 120 minutos de incubação, 39% das bactérias havia sido fagocitado ($p < 0,05$). Para determinar a importância desses resultados, foi realizado o mesmo experimento, porém sem exposição dos PMNs ao cloranfenicol. Após 60 minutos de incubação, 44% do inóculo inicial foi fagocitado pelos PMNs ($p < 0,01$); após 120 minutos a porcentagem de bactérias fagocitadas subiu para 56% ($p < 0,01$).

Figura 2 - Número de colônias de bactérias viáveis no supernadante após incubação das cepas A (●), B (○) e C (△) com PMNs previamente expostos ao cloranfenicol

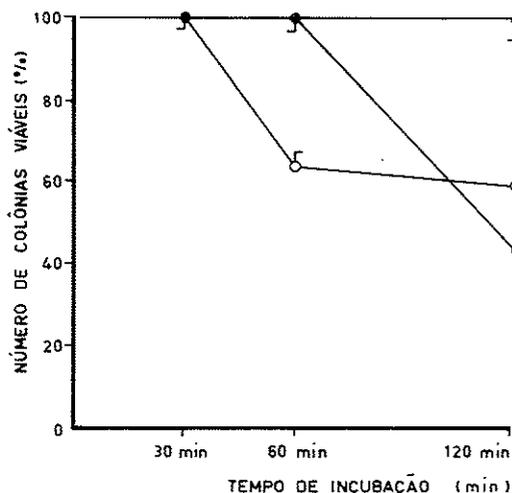
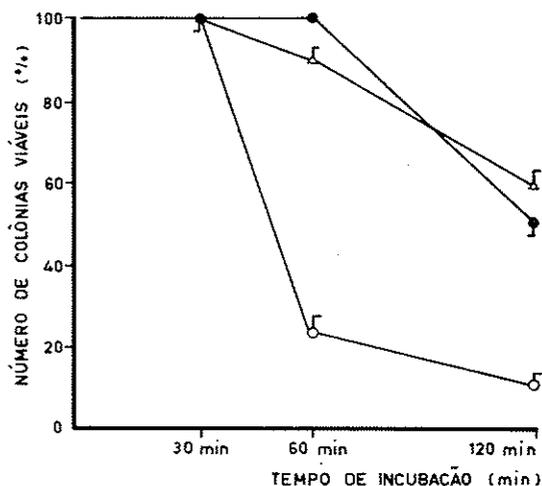


Figura 3 - Número de colônias de bactérias viáveis no supernadante após a incubação das cepas A (●), B (○) e C (△) com PMNs não expostos ao cloranfenicol



Discussão

Drogas bacteriostáticas, como tetraciclina e sulfonamidas, são capazes de reduzir a capacidade de fagocitose dos PMNs (9, 10). A ação do cloranfenicol sobre a fagocitose, sempre foi estudada em concentrações da droga muito acima das concentrações terapêuticas (15, 16), não preenchendo portanto, os critérios para relevância do estudo.

O cloranfenicol é uma droga bacteriostática, que age primariamente sobre a subunidade 50S do ribossomo, suprimindo a peptidiltransferase, que catalisa a formação da ponte peptídica. O mecanismo de ação é, portanto, inibidor da síntese proteica. A possível inibição da síntese proteica na célula fagocítica, pode levar a alterações na motilidade da mesma, alterações na capacidade de formar fagossomos, sabidamente dependente do mecanismo microtubular e alterações na morte intracelular das bactérias.

Sabe-se que a capacidade de endocitose pelos PMNs varia de um organismo para outro (18). No presente estudo, foram usadas cepas virulentas de *Pseudomonas aeruginosa* devido à alta incidência nas infecções observadas em pacientes imunossuprimidos, em vigência de quimioterapia (3, 5). Forsgren & Gnarp (8), recentemente relataram a interferência da tetraciclina com o efeito bactericida do complemento. Devido à possibilidade de interferência entre o cloranfenicol e os fatores do complemento, nós optamos por não utilizar os fatores opsonizantes do soro. Estudando a ação do cloranfenicol, o mesmo autor descreveu alterações na quimiotaxia do leucócito, quando na presença do antibiótico (12).

Nosso estudo demonstra que o cloranfenicol, em concentrações terapêuticas, pode suprimir, de forma significativa, a ação fagocítica, *in vitro*, dos PMNs. Após 60 minutos de incubação, foi possível observar uma diferença significativa na capacidade de fagocitose do PMN previamente exposto ao cloranfenicol quando comparada à capacidade de fagocitose do PMN não submetido a este processo. O primeiro mostrou uma capacidade de fagocitar 30% menos bactérias do que o último. Após 120 minutos de incubação, esta diferença caiu para 19%, o que a torna menos significativa. Quando são comparadas cepa por cepa, observa-se que em uma delas a diferença obtida foi de apenas 10%, após 120 minutos. Isto pode ser explicado pela capacidade desta cepa em

particular, em resistir à fagocitose na ausência de fatores opsonizantes do soro. Porém, nas demais, a diferença na capacidade de fagocitose após 60 minutos de incubação foi sempre maior do que 30% ($p < 0,01$).

Os resultados indicam que a supressão induzida pelo cloranfenicol é significativa após 60 minutos de exposição, mostrando que a droga induz alterações no mecanismo de endocitose dos PMNs. Este comportamento pode ter importância fundamental em doentes imunossuprimidos durante a fase de leucopenia pós-quimioterapia, quando um retardo ou uma incapacidade funcional do leucócito pode ser fatal para o paciente. Alguns estudos realizados em pacientes imunossuprimidos que desenvolveram meningite por *Listeria monocytogenes*, mostram que o uso do cloranfenicol está associado à má evolução clínica do paciente (6, 14).

O interesse nos efeitos do cloranfenicol sobre os leucócitos não é somente teórico. O cloranfenicol é um antibiótico bacteriostático, requerendo um mecanismo de fagocitose e morte intracelular intactos para erradicar a maioria das infecções. A redução observada na fagocitose pelo PMN, mesmo que temporária, pode contribuir para a infecção sistêmica em pacientes com deficiências nos mecanismos de defesa.

Referências Bibliográficas

1. Alexander, J.W. - Antibiotics agents and the immune mechanisms of defense. Bull. N.Y. Acad. Med., 51:1039-1056, 1975.
2. Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M. & Sherris, J.C. - Antibiotics susceptibility testing by a standardized single disk method. Am.J. Clin. Pathol., 45:493-498, 1966.
3. Bermudez, L.E.; Panza, M.; Vidal, E.; Velasco, E.; Nascimento, M.C. & Medeiros Vaz, A.M. - Controle de infecção hospitalar: experiência de dois anos. Rev. Bras. Cancerologia, 30:6-13, 1984.
4. Bodey, G.P.; Buckley M.; Sathe, Y.S. & Freireich, E.J. - Quantitative relationships between circulating leukocytes and infection in patients with acute leukemia. Ann. Intern. Med., 64:328-334, 1966.
5. Bodey, G.P. - Infections in patients with cancer. In: - Current problems in cancer. New York Year Book Medical Publisher, p.1-61, 1977.
6. Cherubin, C.; Marr, J.; Sierra, M., & Becker, S. - Listeria and gram-negative meningitis in New York City, 1972-1979. Am.J. Med., 71:199-205, 1981.
7. Dam, W.C.; Malkinson, F.D. & Gewurz, H. - The effect of common antibiotics on lymphocytes transformation. Experientia, 31:375-380, 1975.
8. Forsgren, A. - Tetracycline interference with bactericidal effect of serum. Nature, 244:82-85, 1973.
9. Forsgren, A. & Gnorpe, H. - Tetracyclines and host-defense mechanisms. Antimicrob. Agents Chemother., 3:711-715, 1973.
10. Forsgren, A.; Schneling, D. & Ouie, P.G. - Effect of tetracycline on phagocyte function of human leukocyte. J. Infection Dis., 130:412-417, 1974.
11. Forsgren, A. & Schneling, D. - Effect of antibiotics on chemotaxis of human leukocytes. Antimicrob. Agents Chemother., 11:580-585, 1977.
12. Gardner, D.E.; Holzman, R.S. & Coffin, D.L. - Depression of phagocytosis by sulfamethazine. J. Bacteriol., 96:274-279, 1968.
13. Gurwith, M.J.; Brunton, J.L.; Lank, B.A. & Gordon, S. - Granulocytopenia in hospitalized patients. Am. J. Med., 64:121-128, 1978.
14. Hooper, D.C.; Pruitt, A.A. & Rubin, R.H. - Central nervous system infection in the chronically immunosuppressed. Medicine, 61:166-185, 1982.
15. Kaplan, S.S.; Perillie, P.E. & Finch, S.C. - The effect of chloramphenicol on human leukocyte phagocytosis and respiration. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 130:839-843, 1969.
16. Lehrer, R.I. - Effects of colchicine and chloramphenicol on the oxidative metabolism and phagocytic activity of human neutrophils. J. Infect. Dis., 127:40-47, 1973.
17. Martin, R.R.; Warr, G.A.; Cough, R.B. & Olsson, N.O. - Effects of tetracycline on leukotaxis. J. Infect. Dis., 129:110-117, 1974.
18. Smith, H. - Microbial surfaces in relation to pathogenicity. Bacteriol. Rev., 41:475-503, 1977.

ETIOLOGIA BACTERIANA DA MASTITE BOVINA NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL

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

Dept^o de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP
Cidade Universitária USP
05508 São Paulo SP, Brasil

Walderez Gambale
Claudete Rodrigues de Paula Gandra
& Maria de Fátima Costa Pires

Dept^o de Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas USP
Av. Prof^o Lineu Prestes, 1374/2^o
05508 São Paulo SP, Brasil

Resumo

Exames microbiológicos em 2533 amostras de leite procedentes de 32 propriedades de exploração leiteira, de 18 municípios do Estado de São Paulo, Brasil, sendo 11,21% de amostras negativas ao exame microbiológico. Nas amostras positivas foram isolados: *Staphylococcus* sp. (49,23%); *Streptococcus* sp. (27,08%); *Corynebacterium* sp. (30,67%); Enterobacteriaceae (4,26%); *Pseudomonas* sp. (1,06%) e 5,64% correspondente a várias bactérias (*Actinobacillus* sp.; *Moraxella* sp.; *Brucella* sp.; *Listeria* sp.; *Aeromonas* sp.; *Kurthia* sp.; *Alcaligenes* sp.; *Lactobacillus* sp.; *Chromobacterium* sp.; *Neisseria* sp.; *Acinetobacter* sp.; *Nocardia* sp.; *Streptomyces* sp.). Fungos filamentosos e leveduras representaram 11,68%. Predominaram os isolamentos em cultura pura, mas foram registradas culturas mistas tanto de fungos como bactérias.

Summary

Bacterial aetiology of bovine mastitis, São Paulo State, Brazil

Microbiological examination of 2533 milk samples from 32 dairy herds in 18 districts of the State of São Paulo, Brazil. From these samples 11.21% resulted negative. Positive cultures yielded 49.23% *Staphylococcus* sp.; 27.08% *Streptococcus* sp.; 30.67% *Corynebacterium* sp.; 4.26% Enterobacteriaceae; 1.06% *Pseudomonas* sp. Others isolates bacteria added 5.64% [*Actinobacillus* sp.; *Moraxella* sp.; *Brucella* sp.; *Listeria* sp.; *Kurthia* sp.; *Aeromonas* sp.; *Neisseria* sp.; *Lactobacillus* sp.; *Chromobacterium* sp.; *Alcaligenes* sp.; *Acinetobacter* sp.; *Nocardia* sp.; *Streptomyces* sp.). Moulds and yeasts reached 11.68%. Pure cultures prevailed but mixed fungi and bacteria were recovered as well.

Tabela 1 - Resultados dos exames microbiológicos realizados em 2533 amostras de leite colhidas em 32 propriedades de exploração leiteira, localizadas em 18 municípios do Estado de São Paulo, Brasil (1979-1984).

Símbolos: * = *Escherichia coli*, *Citrobacter* sp., *Hafnia* sp., *Serratia* sp., *Klebsiella* sp., *Shigella* sp., *Proteus* sp.

Microbiológico	Leite tipo "B" (2060 amostras)		Leite tipo Especial (473 amostras)		(2533 amostras)	
	nº	(%)	nº	(%)	nº	(%)
Total de <i>Staphylococcus</i> sp.	990	48,05	257	54,33	1247	49,23
<i>Staphylococcus</i> sp. isolado	399	19,36	147	31,07	546	21,55
<i>Staphylococcus</i> sp. associado a <i>Streptococcus</i> sp.	264	12,81	093	19,66	357	14,09
<i>Staphylococcus</i> sp. associado a outras bactérias	327	15,87	017	3,59	344	13,58
Total de <i>Streptococcus</i> sp.	540	26,21	146	30,86	686	27,08
<i>Streptococcus</i> sp. isolado	165	8,00	052	10,99	217	8,56
<i>Streptococcus</i> sp. associado a outras bactérias	111	5,38	001	0,21	112	4,42
<i>Corynebacterium</i> sp.	732	35,53	045	9,51	777	30,67
Enterobacteriaceae*	101	4,90	007	1,47	108	4,26
<i>Micrococcus</i> sp.	075	3,64	011	2,32	86	3,39
Actinomicetales	026	1,26	003	0,63	29	1,14
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	027	1,31	-	0,00	27	1,06
<i>Acinetobacter</i> sp.	005	0,24	-	0,00	5	0,19
<i>Aeromonas</i> sp.	003	0,14	001	0,21	4	0,15
<i>Neisseria</i> sp.	003	0,14	-	0,00	3	0,11
<i>Alcaligenes</i> sp.	003	0,14	-	0,00	3	0,11
<i>Kurthia</i> sp.	002	0,09	-	0,00	2	0,07
<i>Listeria</i> sp.	002	0,09	-	0,00	2	0,07
<i>Chromobacterium</i> sp.	001	0,04	001	0,21	2	0,07
<i>Noraxella</i> sp.	001	0,04	-	0,00	1	0,03
<i>Lactobacillus</i> sp.	001	0,04	-	0,00	1	0,03
<i>Actinobacillus</i> sp.	001	0,04	-	0,00	1	0,03
<i>Brucella</i> sp.	001	0,04	-	0,00	1	0,03
Fungos filamentosos e leveduras	236	11,45	060	12,68	296	11,68
Negativo	213	10,33	071	15,01	284	11,21

Introdução

A mastite bovina é o mais sério problema a ser considerado no desenvolvimento da pecuária leiteira.

Os prejuízos econômicos causados pela afecção já foram analisados em diferentes países (2).

Há necessidade de estudos epidemiológicos, através de levantamentos etiológicos frequentes, com reavaliações periódicas, que permitam pelo conhecimento da casuística predominante e da extensão do problema, adoções de medidas profiláticas eficazes (9).

No presente trabalho estão relacionados bactérias e fungos a processos inflamatórios da glândula mamária de bovinos leiteiros em lactação, em estudo no Estado de São Paulo, Brasil.

Material e Métodos

Foram analisadas 2533 amostras de leite, colhidas em 32 propriedades de exploração leiteira, sendo 25 produtoras de leite tipo B* (2060 amostras) e 07 de leite tipo especial** (473 amostras) de 18 municípios do Estado de São Paulo, Brasil, (Amparo*, Araras*, Atibaia*, Avaré*, Bragança Paulista*, Colina*, Cotia*, Fernandópolis**, Iperô**, Itai**, Pindamonhangaba*, Pinhal**, Pirajuí**, Pirassununga***, São Carlos*, São João da Boa Vista*, São Paulo** e Tambaú*) (*Leite tipo B - Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Aprovado pelo Decreto nº30.691 de 29.03.52, alterado pelo Decreto nº 1.255 de 25.06.62 e

Portaria da Secretaria de Inspeção de Produto Animal nº8 de 26.06.84; **Leite tipo Especial - Portaria Ministerial da Secretaria de Inspeção de Produto Animal nº005 de 24.04.80).

Para tanto foram examinadas vacas primíparas e múltiparas das raças Holandesa, Jersey, Dinamarquesa, mestiças Holandes x Zebu, em diferentes estágios de lactação.

A prova de triagem para detecção de processo inflamatório foi o "California Mastitis Test" - CMT (17). Todas as amostras positivas (2283) e 10% das negativas (250) ao teste, foram colhidas assepticamente e transportadas sob refrigeração ao laboratório, onde foi realizada a prova de Whiteside modificado (16).

Procedeu-se a sementeira das 2533 amostras colhidas nos meios de: ágar infusão cérebro coração (BHI-Difco); ágar acetado de tâlio-esculina-cristal violeta (TKT-Merck); ágar levine (Difco); "Mannitol salt agar" (Difco); ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol (100mg/l). As placas foram incubadas a 37°C por 72 horas e os tubos de ágar Sabouraud dextrose foram mantidos por pelo menos 15 dias à temperatura ambiente. Procedeu-se o exame bacterioscópico pelos métodos de Gram e Kynoun (5). Os microrganismos isolados foram identificados de acordo com o Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (4). As provas utilizadas foram: produção de catalase, plasma coagulase, urease, dnase, indol; redução de nitrato a nitrito; motilidade em ágar semi-sólido; acidificação de carboidratos; oxidação-fermentação em meio de Hugh & Leifson; hidrólise da esculina; produção de H₂S; crescimento em TSI, ágar citrato de Simmons, KCN; "Camp Test". As técnicas bacteriológicas foram empregadas conforme descrito por Lennette & col. (14).

Tabela 2 - Distribuição do percentual dos principais agentes etiológicos de mastite em diferentes municípios do Estado de São Paulo, Brasil (1979-1984).

Símbolos: * = Ordenha mecânica; ** = Ordenha manual

Localidade	Total amostras	<i>Staphylococcus</i> sp.		<i>Streptococcus</i> sp.		<i>Corynebacterium</i> sp.	
		nº	(%)	nº	(%)	nº	(%)
Amparo*	060	039	65,00	034	56,66	003	5,00
Araras*	157	086	54,77	028	17,83	096	61,14
Atibaia*	301	163	54,15	050	16,61	121	40,19
Avaré*	348	109	31,32	074	21,26	031	8,90
Bragança Paulista*	016	004	25,00	007	43,75	004	25,00
Colina*	264	158	59,84	107	40,53	065	24,62
Fernandópolis**	039	015	38,46	000	0,00	002	5,12
Itai*	052	034	65,38	012	23,07	013	25,00
Pindamonhangaba*	073	040	54,79	027	36,98	020	27,39
Pinhãl**	069	027	39,13	011	15,94	011	15,94
Pirajuí**	023	013	56,52	002	8,69	001	4,34
Pirassununga*,**	369	184	49,86	104	28,18	009	2,43
São Carlos*	488	239	48,97	168	34,42	346	70,90
São João da Boa Vista*	066	041	62,12	024	36,36	000	0,00
São Paulo**	046	044	95,65	009	19,56	002	4,34
Tambau*	146	043	29,45	025	17,12	052	35,61

Resultados

Na amostras examinadas (2533 amostras) obteve-se o isolamento de 24 diferentes gêneros de bactérias (Tabela 1).

No exame global (Tabela 1) destacam-se: *Staphylococcus* sp. (48,05% no leite tipo B e 54,33% no leite tipo Especial); *Streptococcus* sp. (26,21% no leite tipo B e 30,86% no leite tipo Especial); *Corynebacterium* sp. (35,53% no leite tipo B e 9,51% no leite tipo Especial); *Pseudomonas* sp. ocorreu em baixo percentual no leite tipo B (1,31) e não foi isolada das amostras de leite tipo Especial.

A distribuição dos microrganismos por municípios (Tabela 2) revela a maior prevalência de: *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. e *Corynebacterium* sp., registrando-se maior percentual de *Staphylococcus* sp., à exceção do que se observa em

Araras, São Carlos e Tambaú, onde predomina *Corynebacterium* sp. e Bragança Paulista, onde predomina *Streptococcus* sp. Não foram incluídos os dados dos municípios de Coitia e Iperô, dada a pequena amostragem, respectivamente 10 e 6.

Os gêneros predominantes foram correlacionados à intensidade do processo inflamatório determinado (Tabela 3), destacando-se que mastite clínica por *Streptococcus* sp. ocorreu em 52,99% ; por *Staphylococcus* sp. em 36,08% e por *Corynebacterium* sp. 32,06%.

Tabela 3 - Principais gêneros correlacionados à intensidade do processo inflamatório isolados de 2533 amostras de leite colhidas em 32 propriedades de 18 municípios do Estado de São Paulo, Brasil (1979-1984).

Símbolos: (1) = Isolados em cultura pura

Patogenicidade Agentes isolados (1)	Mastite clínica		Mastite subclínica		Portador	
	nº	(%)	nº	(%)	nº	(%)
<i>Staphylococcus</i> sp.	197	36,08	158	28,93	191	34,98
<i>Streptococcus</i> sp.	115	52,99	069	31,79	033	15,20
<i>Corynebacterium</i> sp.	110	32,06	078	22,74	155	45,18

Discussão

Grande número de gêneros e espécies bacterianas está envolvido na etiologia da mastite bovina (Tabela 1). A comparação dos dados apresentados com os de outros autores (6, 8) revela que alguns germes estão sendo, pela primeira vez, correlacionados à afecção no país, a saber: *Aeromonas* sp., *Kurthia* sp., *Neisseria* sp., *Alcaligenes* sp., *Listeria* sp., *Moraxella* sp., *Actinobacillus* sp., e *Chromobacterium* sp.

O percentual de ocorrência de Enterobacteriaceae foi baixo (Tabela 1): 4,90%, em leite procedente de propriedades produtoras de leite tipo B e 1,47%, de leite Especial, o que está de acordo com outros trabalhos realizados no país. Embora, a nível de consumo, estes agentes tenham importante participação na contaminação do produto final, na etiologia da mastite bovina, as enterobactérias não constituem problema relevante. Portanto, pode-se inferir que a contaminação do leite por enterobactérias ocorre, principalmente, pós-ordenha, em outras fases de produção, industrialização e distribuição.

Apesar do número elevado de agentes, três grupos se destacaram: *Staphylococcus* sp. (49,23%), *Streptococcus* sp. (27,08%) e *Corynebacterium* sp. (30,67%). Os resultados relacionados ao gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* concordam com os de outros autores (7, 9, 10, 13) pela proximidade dos percentuais obtidos. Não obstante a maior prevalência de *Staphylococcus* sp., verifica-se, quando se considera a intensidade do processo inflamatório, que os estreptococos apresentaram maior patogenicidade, uma vez que 52,99% foram isolados em cultura pura, de processos de mastite clínica, percentual este superior ao observado em relação aos estafilococos, 36,08%; (Tabela 3).

O primeiro relato da participação de corinebactérias na etiologia da mastite bovina no país ocorreu no Estado de São Paulo em 1954 (12), com isolamento de 6,6% de *C. pyogenes* de 88 amostras examinadas. Posteriormente, outros trabalhos relataram o isolamento desta espécie em diferentes percentuais de ocorrência: Rio Grande do Sul, 10% (7) e 10,0% (18); Paraná, 1,3% (15); Pernambuco, 1,4% (10); Rio de Janeiro, 4,2% (13); São Paulo, 3,13% (6) e 9,1% (1). Somente em 1981 foi descrito no país *Corynebacterium bovis* associado à mastite bovina (9), com o isolamento, em Minas Gerais, de quatro cepas das 1007 amostras de leite examinadas. No mesmo trabalho, os autores mencionaram o isolamento de quatro cepas de *Corynebacterium pyogenes*.

Ao contrário do até então observado no Brasil, neste trabalho é relatado alto percentual de isolamento de *Corynebacterium* sp., de fazendas produtoras de leite tipo B (Tabela 1). Resultados estes condizentes com os referidos em trabalhos internacionais, onde *Corynebacterium bovis* é atualmente considerado como um dos microrganismos mais prevalentes na mastite bovina (3, 11). Essas observações evidenciam que agentes considerados de baixa patogenicidade, como *Corynebacterium bovis*, assumiram importância crescente, principalmente pela ação do próprio homem, que interfere combatendo os patógenos clássicos, chamados de patógenos maiores, interfere com o sistema imune através de alimentação e medicamentos, interfere com a resistência natural pela seleção para produção, permitindo que microrganismos pouco adaptados à vida parasitária, prevalentes no meio ambiente, se instalem e produzam doença. Assim, verifica-se que propriedades produtoras de leite tipo Especial apresentaram corinebactérias em apenas 9,51% das amostras. Nestas propriedades, os animais são normalmente mais rústicos, mestiços de holandês com zebu, e a participação do homem na seleção para produção, assim como a utilização de medicamentos é menos acentuada. Sem dúvida, a constatação do aumento significativo da participação de bactérias do gênero *Corynebacterium* em processos de mastite é um dos aspectos mais revelantes deste estudo, uma vez que ressalta o caráter dinâmico da etiologia desta afecção, justificando a necessidade de avaliações periódicas nas bacias leiteiras. Portanto, o estudo da etiologia da mastite bovina deve merecer atenção dos pesquisadores brasileiros como medida de apoio ao desenvolvimento da pecuária de leite, pois somente o conhecimento da extensão e características do problema permitirá adoção de medidas profiláticas e terapêuticas necessárias e efetivas, como foi também salientado por Ferreiro & col. (9).

Agradecimentos

Agradecimentos a Ana Lúcia Siqueira Cabral e Deborah Maria da Conceição pela competente datilografia; aos médicos veterinários Vania Maria de Carvalho, Ligia Frões Lopes, Sergio Morgulis, Ana Maria Schmidt, Nilson Benites, Maria Inês Liberatori, estagiários do Departamento e ao falecido Prof. Dr. Rolando Cury, a quem este trabalho é dedicado, pelo seu exemplo e orientação.

Referências Bibliográficas

1. Birgel, E.H. - Avaliação das provas utilizadas no diagnóstico da mastite bovina. In: - Birgel, E.H. & Benesi, F.J., eds. - Patologia clínica veterinária. São Paulo, Soc. Paulista Med. Vet., 1982.
2. Blosser, T.H. - Economic losses from the National Research Program on Mastitis in the United States. J. Dairy Sci., 62:119-127, 1977.
3. Brooks, B.W.; Barnum, D.A.; Meek, A.H. - An observational study of *Corynebacterium bovis* in selected Ontario dairy herds. Can. J. Comp. Med., 47:73-78, 1983.
4. Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E., ed. - Bergey's manual of determinative bacteriology. 8.ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1974.
5. Conant, N.F.; Smidt, D.T.; Baker, R.D. & Callaway, J.L. - Manual of clinical mycology. 3.ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 1971.
6. Cury, R. & Belleza, W. - Mastite bovina. In: - 19 Curso de Pecuária Leiteira. São Paulo, Ed. Cia. Ind. Com. Bras. Prod. Aliment., Assist. Nestlé, v.3, p.408-430, 1966.
7. Fernandes, J.C.T.; Moojen, V. & Ferreiro, L. - Agentes etiológicos das mastites bovinas na bacia leiteira de Porto Alegre, R.S., Brasil. Arq. Fac. U.F.R.G.S. (Porto Alegre), 1:41-46, 1973.
8. Ferreiro, L. - Agentes etiológicos e terapêutica da mastite bovina no Brasil. Arq. Fac. Vet. U.F.R.G.S (Porto Alegre), 6:77-88, 1978.
9. Ferreiro, L.; Santos, E.C. & Silva, N. - Ocorrência e etiologia da mastite bovina na "Zona da Mata" do Estado de Minas Gerais. Arq. Esc. Vet. U.F.M.G. (Belo Horizonte), 33:31-37, 1981.

10. Harrop, M.H.U.; Pereira, L.J.G.; Brito, J.R.F. & Mello, A.M.B. - Incidência de mastite bovina na bacia leiteira da Zona do agreste meridional de Pernambuco. *Pesq. Agrop. Bras. Ser. Vet.*, 10:65-67, 1975.
11. Honkanen-Buzalski, T.; Griffin, J.K. & Dadd, F.H. - Observations on *Corynebacterium bovis* infection of the bovine mammary gland. I - Natural infection. *J. Dairy Res.*, 51:371-378, 1984.
12. Lacerda Junior, P.M.G.; Zani Neto, L. & Freitas, D.C. - Estudos sobre mastites bovinas. I - Contribuições ao estudo dos agentes etiológicos das mastites bovinas. *Rev. Fac. Med. Vet. (São Paulo)*, 5:55-64, 1954.
13. Langenegger, J.; Coelho, N.M.; Langenegger, C.H. & Castro, R.P. - Estudo da incidência da mastite bovina na bacia leiteira do Rio de Janeiro. *Pesq. Agrop. Bras. Ser. Vet.*, 5:437-440, 1970.
14. Lennette, L.H.; Spaulding, L.H. & Truant, J.P. - Manual of clinical microbiology. 2.ed. Washington, D.C., American Society for Microbiology, 1974.
15. Muller, E.E. - Estudo da prevalência de mastite bovina. *Semina (Londrina)*, 1:47-48, 1978.
16. Murphy, J.M. & Hanson, J.J. - A modified Whiteside test for the detection of chronic bovine mastitis. *Cornell Vet.*, 32:439-444, 1942.
17. Schalm, O.W. & Noorlander, D.O. - Experimental and observations leading to development of California Mastitis Test. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 130:199-204, 1957.
18. Williams, B.M. & Silva, A.B. - Sobre um surto agudo de mastite bovina por *Corynebacterium pyogenes*. *Arq. Inst. Pesq. Vet. Desidério Finamor (Guaíba, RS)*, 3:45-51, 1966.

ISOLAMENTO DE SALMONELLA TENNESSEE EM FEZES HUMANAS NO RIO GRANDE DO SUL

Paulo Fausto Cauduro
 Agelina Mezzari
 Cicero A.G. Dias

Depto. de Bacteriologia
 Laboratório Weinmann
 Rua Ramiro Barcelos, 910/59
 90000 Porto Alegre RS, Brasil

& Ernesto Hofer

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

Resumo

Relato de dois isolamentos de *Salmonella tennessee* em fezes humanas. São apresentados resumos clínicos dos dois casos e feita revisão bibliográfica. Conclusão alertando para a importância clínica e epidemiológica que a *S. tennessee* poderá eventualmente exibir.

Summary

Salmonella tennessee from human feces in Rio Grande do Sul, Brazil

Two cases of *Salmonella tennessee* isolated from human feces with a brief clinical report and a bibliographical review are presented. The authors point out the potential clinical and epidemiological importance of these findings.

Introdução

As referências sobre presença de *S. tennessee* têm sido pouco frequentes. A primeira delas data de 1942, quando Burner & Edwards (1), em amostra enviada pelo Departamento de Saúde do Tennessee, isolaram uma *Salmonella* nas fezes de um portador que operava como manipulador de alimentos; os citados autores determinaram a fórmula antigênica do novo microrganismo (6,7 : 2₂₉) que ficou conhecido como *Salmonella tennessee*. No Brasil, *S. tennessee* tem sido isolada de modo eventual. Em 1972, Hofer (5) relata o isolamento em água de esgoto e Costa & col. (3) registram dois casos identificados em gânglios linfáticos de suínos abatidos em Salvador, BA.

O primeiro registro de isolamento em fezes humanas aparece no trabalho de Souza & col. (10) em 1975, de uma amostra em Fortaleza, CE.

Em 1978, Miranda & col. (8) ao pesquisarem a incidência de *Salmonella* em farinhas empregadas como ração animal, obtiveram isolamento de uma amostra em farinha de carne. Finalmente, Pessoa & col. (9), ainda em 1978, em exaustivo levantamento de *Salmonella* isoladas na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, provenientes de materiais variados do septênio 1970-1976, apresentam quatro casos (correspondendo a 0.05% dos casos no período), sendo dois casos isolados em fezes, um em alimento e outro da ração para aves. O Deptº de Bacteriologia do I.O.C. (comunica-

ção pessoal) refere 22 isolamentos a partir de materiais diversos em cerca de 10.000 salmonelas tipificadas no Instituto Oswaldo Cruz no período 1976-1983.

Em nosso serviço, Laboratório Weinmann, de julho de 1984 a abril de 1985, obtivemos 21 isolamentos de salmonelas tipificadas em fezes; as duas amostras de *S. tennessee* corresponderiam à alta incidência de 9,52%.

Material e Métodos

Coprocultura - As fezes foram semeadas em MacConkey ágar (Biobrás), SS-ágar (Bio-brás) e em caldo de enriquecimento (Caldo Selenito de sódio - Biobrás).

Após permanência de 18-24 horas a 37°C no meio de enriquecimento o inóculo fecal foi transplantado para nova placa de SS-ágar.

As colônias lactose-positivas foram transferidas para CV (11) modificado, lisina (Lysine Iron Agar - BBL) e SIM (Biobrás), buscando o isolamento de *E. coli* enteropatógena e *E. coli* invasiva; as lactose-negativas repicadas em CV, lisina, SIM e citrato (Simmons citrate - ágar, BBL) obedecendo rotina preconizada por Cauduro (2), acrescida de algumas provas específicas para a classificação de *Salmonella* em sub-gêneros, segundo Le Minor & col. (6).

Os resultados compatíveis com o perfil bioquímico de *Salmonella*: positivo para: glicose (gás); H₂S; motilidade; lisina desc.; Dulcitol*; lise fago O1*; ornitina desc.*; e negativo para: uréia; lactose; sacarose; citrato; indol; ONPG (2h)*; KNC*; malonato* (*Complemento realizado no I.O.C.).

Sorologia - A análise sorológica foi realizada de acordo com as orientações de Kauffmann (7) e Edwards & Ewing (4).

Foram feitas reações com anti-soros *Salmonella* O Antiserum Poly A-I and Vi (Difco) e *Salmonella* H Antiserum Poly a-z (Difco), resultando ambas aglutinações positivas. No entanto, as tentativas de caracterizar *S. typhi* ou *S. typhimurium* (espécies mais frequentes em nosso meio) através de anti-soros *Salmonella* O Antiserum 9, 12 e Vi (Difco); *Salmonella* O Antiserum i, resultaram negativas.

A tipificação sorológica completa, foi feita no Instituto Oswaldo Cruz. Ambas amostras foram caracterizadas como *Salmonella tennessee* (6,7 : z₂₃), integrante do Grupo C₁.

Conclusão

As duas amostras de *S. tennessee* foram isoladas a partir das fezes de dois pacientes, uma criança de cinco anos (GB) e um adulto de 47 anos (SRV).

O paciente GB apresentava gastroenterite. Foi instituído tratamento sintomático, com hidratação, antitérmico e antiemético, resultando cura clínica.

O paciente SRV apresentava história de úlcera duodenal há 10 anos, alteração do hábito intestinal há 45 dias e fezes semi líquidas. Referia astenia e emagrecimento. Foi submetido a retossigmoidoscopia que revelou retite ulcerada. A biópsia retal demonstrou retite crônica com eosinofilia. Na colonoscopia pode-se constatar lesões ulceradas no cólon ascendente. Através de biópsia colônica observou-se colite crônica erosiva e supurativa. O paciente foi tratado com sulfametoxazol e trimetoprim por duas semanas e tornou-se assintomático com recuperação de peso. A coprocultura de controle foi negativa.

Não se obteve nenhum fato que pudesse explicar e ajudar o estudo destes dois casos, no entanto julgamos correta a notificação dos mesmos e ao mesmo tempo lançar discreto alerta para a ocorrência deste sorotipo de *Salmonella* em nosso meio, até então constatada em fezes humanas somente em São Paulo (SP) e Fortaleza (CE).

Concluimos destacando o significado que o isolamento de *Salmonella* spp. não *S. typhi* ou *S. typhimurium* - *Salmonella tennessee* em particular - pode ter para o microbiologista pela eventual importância clínica e epidemiológica deste microrganismo.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos Drs. Marco Aurélio G. Alves e Helaine F. Bicca pelos laudos clínicos.

Referências Bibliográficas

1. Brunner, D.W. & Edwards, P.R. - Two new *Salmonella* types with undescribed flagellar antigens. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 50:174-175, 1942.
2. Cauduro, P.F. - Rotina bacteriológica. Rio de Janeiro, Artes Gráficas e Editora, 1980.
3. Costa, G.A.; Hofer, E.; Costa, M.D.M.; Silva, J.A.H.; Santos, J.V. & Doria, J.D. - Sobre o isolamento de *Salmonella* de gânglios linfáticos de suínos no matadouro da cidade de Salvador, Bahia. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 70:417-431, 1972.
4. Edwards, P.R. & Ewing, W.H. - Identification of Enterobacteriaceae. 3.ed. Minneapolis, Burgess Publ., 1972.
5. Hofer, E. - Avaliação de diferentes meios de enriquecimento para o isolamento de *Salmonella* ocorrentes em água de esgoto. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 70:299-308, 1972.
6. Le Minor, L.; Véron, M. & Popoff, M. - Taxonomie des *Salmonella*. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 133B:223-243, 1982.
7. Kauffmann, F. - The bacteriology of Enterobacteriaceae. 2.ed. Munksgaard, Copenhagen, 1966.
8. Miranda, J.B.N.; Pessoa, G.V.A.; Irino, K. & Calzada, C.T. - Ocorrência de *Salmonella* em farinhas utilizadas como matéria-prima na composição de rações de animais. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 38:157-160, 1978.
9. Pessoa, G.V.A.; Irino, K.; Calzada, C.T.; Melles, C.E.A. & Kano, E. - Ocorrência de bactérias enteropatogênicas em São Paulo no septênio 1970-76. I - Sorotipos de *Salmonella* isolados e identificados. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 38:87-105, 1978.
10. Souza, T.T.; Noronha, M.C.C. & Riedel, O.O. - Significado das salmonelas nas diarreias infantis em Fortaleza. Rev. Med. Univ. Fed. Ceará, 15:39-44, 1975.
11. Suassuna, I. & Suassuna, I.R. - Duplo-açúcar-uréia ágar (DAU), um meio de triagem para enterobactérias: nota técnica. Rev. Bras. Patol. Clín., 14:201-202, 1978.

INVESTIGATION ON AN ADHESIVE PROPERTY (LOCALIZED ADHERENCE)
CHARACTERISTIC OF CLASSIC ENTEROPATHOGENIC SEROGROUPS OF
ESCHERICHIA COLI

João Ramos Costa Andrade

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

& Milden Rodrigues de Santa Rosa

Instituto de Microbiologia UFRJ
Laboratório de Microscopia Eletrônica
Deptº de Virologia
Centro de Ciências da Saúde
Bloco I - Ilha do Fundão
21944 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Summary

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from outbreaks and sporadic cases of infantile gastroenteritis and some non-EPEC *E. coli* and other enterobacteria associated to intestinal and extraintestinal infections were studied. Using Hep-2 cells, it was verified that the previously described "localized adherence" (L.A.) only occurred among EPEC strains. Enterobacteria with different virulence traits and non-EPEC *E. coli* producing type 1 pili or colonization factors CFA/I, CFA/II, K88, K99 and 987P as well as some EPEC strains from an old collection were all negative for L.A. Serial cultivation on solid medium (CFA-agar) inhibited L.A. whereas EPEC grown exponentially in non-aerated liquid media were L.A.-positive. A quantitative test for L.A. was introduced and L.A. indexes were obtained for inhibition tests with carbohydrates, concanavalin A, semipurified O111 LPS and divalent cations (Ca^{++} and Mg^{++}). L.A. indexes were also obtained for pretreated bacteria and cells with trypsin, glutaraldehyde, heat and U.V. radiation. Most epidemic EPEC strains, producing type 1 pili and L.A. adhesin had higher L.A. indexes than non-epidemic EPEC, suggesting a cooperation between both adhesins. Inhibition of L.A. by carbohydrates and by pretreatment of bacteria and cells with trypsin suggests that cell surface glycoproteins and bacterial proteins mediate L.A. A wide variation was verified on sugar-inhibition profiles suggesting structural variation in cell receptors and bacterial adhesins, even among EPEC strains of the same serogroups. L.A. was strongly dependent on bacterial and cellular viability and on previous EPEC cultivation in Ca^{++} containing medium, both evidences suggesting a internalization step on L.A. Studies on ultrastructural interaction between EPEC and Hep-2 cells and L.A. role on EPEC virulence are currently underway.

Resumo

Investigações sobre propriedade adesiva (aderência localizada) característica dos sorogrupos enteropatogênicos de *Escherichia coli*

Estudamos *E. coli* enteropatogênicas clássicas (EPEC) isoladas de surtos epidêmicos e casos esporádicos de diarreia e amostras de *E. coli* e de outras enterobactérias associadas a infecções intestinais e extraintestinais. Empregando células Hep-2 verificamos que a "aderência localizada" (AL) ocorreu apenas em EPEC. *E. coli* não-EPEC produtoras de pili tipo 1, CFA/I, CFA/II, K88, K99 ou 987P, enterobactérias apresentando diferentes mecanismos de virulência e EPEC provenientes de coleção foram negativas para AL. O cultivo seriado em meio sólido inibe a AL enquanto o cultivo em meio líquido não-aerado em fase exponencial, mas não em fase estacionária, a estimula. EPEC produtoras de pili tipo 1 e de adesina de AL provinham principalmente de surtos epidêmicos e apresentavam elevados índices de AL, sugerindo cooperação entre ambas as adesinas. Testes de inibição da AL por carboidratos, concanavalina A, LPS semipurificado e cations divalentes (Ca^{++} , Mg^{++}) e o tratamento prévio de bactérias e células por tripsina, glutaraldeído, calor e radiação U.V., sugerem que a AL é mediada por glicoproteínas da superfície celular e por proteínas bacterianas. Variações nos perfis de inibição por carboidratos, sugerem variação estrutural nos receptores celulares e nas adesinas bacterianas, mesmo entre EPEC de idênticos sorogrupos. A AL é dependente da viabilidade bacteriana e celular e do prévio cultivo dos microrganismos em meio contendo Ca^{++} sugerindo internalização das bactérias aderidas às células.

Introduction

Some enteropathogenic serogroups of *Escherichia coli* ("classic" or EPEC) specially 0111:K58, 055:K59 and 0119:K69 are recognized as important agents of infantile gastroenteritis (11, 22). However, results concerning enterotoxic as well invasive properties have been negative, despite some EPEC strains producing cytotoxins and enterotoxins, whose meaning in natural infections remains to be proved, were described (14, 15). On the other hand, significance of adherence to the EPEC virulence is inferred from early observations describing intense EPEC colonization of the intestinal, oral and nasal mucosal surfaces of diarrheic children and of the nosocomial staff involved with their care (17).

The *E. coli* adherence to erythrocytes and epithelial cells is usually mediated by pili and its meaning on the intestinal virulence is well established for enterotoxigenic *E. coli* (10). However, the meaning of pili on the EPEC virulence is disputed (1, 6).

Scaletsky & col. (20), while performing a new adherence test carried out by an extended incubation of cell monolayers with exponentially-grown bacteria, described a typical microscopic aspect for the EPEC adherence referred to as "localized adherence" (L.A.). There were several bacterial nests on paranuclear regions of the cell surface. In the present report we studied L.A. of pilated and non-piliated strains of EPEC and introduced a quantitative L.A. test to evaluate the influence of some factors on L.A.

Material and Methods

Organisms - EPEC strains were obtained from outbreaks or sporadic cases of infantile gastroenteritis. Non-EPEC *E. coli* strains were isolated from feces of normal individuals. Serogrouping was performed with OK antisera (Difco) and the bacterial strains were stored at -25°C. The adhesive properties of these strains were described previously (1) and the origins of the other enterobacteria and EPEC tested are listed in Table 2.

Cell culture - Hep-2 cells were cultivated in Eagle MEM (Gibco) with Earle salts, supplemented with 10% calf serum (Instituto Adolfo Lutz), gentamicin (5µg/ml) and fungizone (2,5µg/ml). Monolayers grew on 24 X 8mm rectangular coverslips and were used soon after confluence (24-48h).

L.A. test - Bacterial strains were grown for 16h at 37°C in TSB broth (Difco). An inoculum of 250µl of each culture was mixed with 2.5ml of antibiotic-free Eagle MEM with 2% calf serum and incubated for 2.5h at 37°C before being added to cell monolayers. After the contact time (15min) cell monolayers were washed with PBS-Dulbecco pH 7.2 (PBS-D), fresh medium was added and incubation was continued for 2h, at 37°C. Monolayers were washed in PBS-D, fixed in methanol, stained with Giemsa (Merck), dehydrated and mounted in Caedax (Merck). In some tests bacteria were serially cultured either in nutrient broth or on CFA agar, respectively stimulating or inhibiting type 1 pili (7). For tests performed with bacteria inactivated by heat, glutaraldehyde or U.V. radiation a contact time of 30min was used without further incubation.

Inhibition of L.A. - To carry out sugar-inhibition tests, 10 and 100µg/ml of D-glucose, L-rhamnose, D-mannose (Merck), galactose (Allied) or lactose (Difco) were added to Eagle-grown bacteria immediately before their contact with the cells. The effect of cations on L.A. was evaluated with bacteria grown in Eagle MEM deficient in Ca⁺⁺ (1mM), Mg⁺⁺ (1mM) or both. In additional tests, bacteria grown in complete or in Ca⁺⁺ deficient media were harvested by centrifugation, washed in deionized water and suspended to original concentration in media with or without Ca⁺⁺ before contact with the cell monolayers. Influence of cellular and bacterial pretreatments on L.A. were evaluated with Hep-2 cells treated with: (a) 100 and 200µg/ml concanavalin A (Con A - Sigma) for 30min, (b) 2mg/ml trypsin (Difco), (c) *E. coli* 0111a, b alkali-extracted lyopolysaccharide (LPS) (23), (d) heat (56°C, 30min) or (e) 0.25% glutaraldehyde (5min). Bacterial cells were pretreated with 2mg/ml of trypsin or inactivated by (a) U.V. radiation (245nm, 15min), (b) heat (56°C, 60min) or (c) 0.25% glutaraldehyde (30min) immediately before contact with Hep-2 monolayers.

L.A. index - Stained monolayers were coded and read at 1000x magnification. Two hundred cells were observed at random and bacterial nests with four or more bacilli were counted. L.A. index was obtained from the total number of bacterial nests counted in three coverslips divided by 600 and multiplied by 100.

Electron microscopy - Negative staining of bacterial cells was performed with 1% phosphotungstic acid solution (pH 7.0) with 0.1% saccharose and 0.01% dimethylsulfoxide.

Results

Freshly isolated EPEC strains were positive for L.A. independently of their origin, serogroup or pili production. Non-EPEC *E. coli* were all negative (Table 1) as well as *E. coli* and enterobacteria expressing different virulence traits or adhesins responsible for the colonization of human and animal intestinal mucosa (Table 2). *Citrobacter freundii* with O-specific side chains antigenically identical with *E. coli* 0111 LPS and some smooth EPEC strains obtained from old collections were also negative for L.A. (Table 2).

Table 1 - Occurrence of pili and of localized adherence (L.A.) to Hep-2 cells in EPEC strains and non-EPEC *E. coli*.

Symbols: * = Pili identified by electron microscopy (negative staining) and hemmagglutination tests (see reference 1); MR = Mannose-resistant pili, t-1 = type 1 pili; ND = Not determined

Origin	Serogroup	Strain	Pili (*)		L.A.	
			t-1	MR		
EPEC Outbreaks	0111:K58	386	+	-	+	
		409	+	-	+	
		410	+	-	+	
	0119:K69	329	-	-	+	
		341	+	-	+	
	086a:K61	262	+	-	+	
		351	+	-	+	
	EPEC Sporadic Cases	0111:K58	24	-	-	+
			53	-	-	+
			54	-	-	+
59			-	-	+	
61			-	-	+	
055:K59		94	-	-	+	
		68	+	-	+	
		1415	+	-	+	
		0119:K69	60	-	-	+
		086a:K61	57	+	-	+
Non-EPEC <i>E. coli</i> Normal feces	ND	F. 2	-	-	-	
		F. 3	+	-	-	
	020	F. 4	+	-	-	
		F. 6	+	-	-	
	016, 017	F. 9	+	-	-	
		F. 10	+	-	-	
	rough	F. 11	+	-	-	
		F. 18	-	-	-	
	ND	F. 21	-	-	-	
		F. 30	+	+	-	

Effect of the culture conditions on the L.A. of piliated (PIL⁺) and non-piliated (PIL⁻) EPEC were studied with a quantitative test. A great drop of the L.A. indexes resulted from serial culture on agar and a significant recovery was observed after the subsequent culture in Eagle MEM. Serial culture in nutrient broth even for PIL⁺ strains causes a reduction of the L.A. without recovery after culture in Eagle MEM. Results obtained for some representative EPEC strains are shown in Table 3.

Electron micrographs of PIL⁻ strains grown in conditions favourable (Fig. 1-a) or unfavourable (Fig. 1-b) for L.A. expression did not reveal structures resembling pili or capsule on bacterial cells cultivated in IA-stimulant conditions.

Micrographs of Giemsa-stained cell monolayers incubated with PIL⁻ and PIL⁺ EPEC are shown in Figure 2. Typical L.A. pattern, with compact paranuclear nests of short bacillary forms can be seen on Figure 2-a. A second pattern of bacterial adhesion is observed on Figure 2-b. There were loosely clustered patches of large bacillary forms without preferential localization on the cell surface. This "loose" adherence pattern was found only among PIL⁺ strains.

A 50% reduction in L.A. index was accepted as evidence of significant L.A.-inhibition by any treatment. Great variations were verified on the carbohydrate-Con A inhibition profiles

even among EPEC strains of the same serogroup (Table 4). EPEC strains with different inhibition profiles were tested for influence of several treatments on the L.A. It was verified that L.A. required Ca⁺⁺ ions in media where bacteria grew and its effect could not be replaced by Mg⁺⁺ (Table 5). Additional tests showed that Ca⁺⁺ availability during the contact time did not restore L.A. of bacteria grown in Ca⁺⁺ deficient medium (Table 6). Pretreatment of bacteria or cells with trypsin did not affect their viability but significantly reduced L.A. whereas bacterial or cell inactivation by heat, U.V. and glutaraldehyde completely abolished L.A. (Table 5).

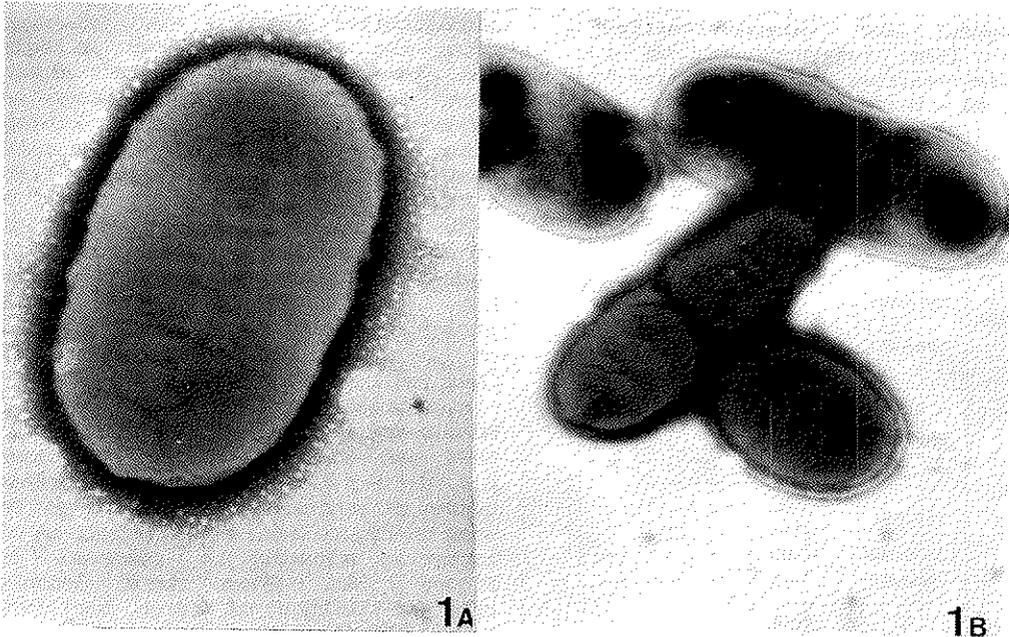
Discussion

L.A. was only found among EPEC strains while non-EPEC *E. coli* from intestinal or extraintestinal infections were negative for L.A. Pili involved in *E. coli* colonization of human or animal intestines as CFA/I, CFA/II, K88, K99 and 987P did not induce L.A. as well as type 1 pili or mannose-resistant pili from uropathogenic *E. coli* (2).

Cravioto & col. (6) and more recently Baldini & col. (3) described Hep-2 adhesive properties in EPEC. These latter authors also found a close association between Hep-2 adherence, colonization of animal intestine and a 55-72 mDal plasmid whose loss abolished both intestinal colonization and Hep-2 adherence. Our EPEC strains

Figure 1 - Negatively stained EPEC *E. coli* 68 grown in culture conditions favourable (A) or unfavourable (B) for L.A. to Hep-2 cells.

Symbols: Capsule or pili were not found on L.A. - positive bacteria. (A), X 50000; (B), X 30000



derived from an old collection were negative for L.A. despite of long-term incubation (6-8h) with cell monolayers. The same was observed by Carvalho (5), and Cravioto & col. (6) also verified that EPEC strains isolated from earlier outbreaks were noticeably less adherent to Hep-2 cells than strains obtained from recent outbreaks. Recently, Nataro & col. (16) showed that L.A. is encoded on plasmid varying in size from 55 to 70 mDal. Thereby it seems plausible that the Hep-2 adherence described by different authors is mediated by an identical adherence factor, peculiar to EPEC and controlled by extrachromosomal DNA, lost during bacterial storage.

As already described (5) culture conditions influence on L.A. expression, suggesting interference of regulatory mechanisms similar to those affecting phenotypic expression of mannose-resistant and of type 1 pili (7, 10). In a former report, both adhesins were investigated in our EPEC strains and only type 1 pili was found (1). L.A. and type 1 pili were both strongly inhibited by serial cultivation in solid media. Nevertheless, serial cultivation in static, non-aerated liquid media stimulated type 1 pili and the L.A. adhesin differently, the former being favoured in stationary-phase cultures and the latter in exponential-phase-cultures.

L.A. tests performed with PIL^+ and PIL^- EPEC strains grown in culture conditions favourable or not to L.A. expression indicated that type 1 pili play no direct role on L.A. Notwithstanding, on the cell monolayers incubated with PIL^+ strains two receptors for EPEC adhesins, localized at different regions on the cell surface.

Brinton (4) admitted that environmental conditions in non-aerated liquid media simulate conditions prevailing in the intestinal habitat. Thus, coexistence of L.A. adhesin and type 1 pili probably occur "in vivo". In the present investigation, it was verified that EPEC strains possessing both adhesins had higher L.A. indexes than PIL^- strains. Hydrophobic properties and the spatial arrangement of type 1 pili could facilitate initial contact with the cellular surface thereby improving

Table 2 - Occurrence of L.A. in *E. coli* and in enterobacteria with different virulence traits and surface antigens associated to colonization of intestinal and extraintestinal epithelial surfaces.

Symbols: * = Expressed during adherence tests; ** = Adherence to Hep-2 cells without typical pattern; + = Moderate; ++ = Intense; ETEC = Enterotoxigenic *E. coli*; INV = Invasive *E. coli* or *Shigella*; EPEC = Enteropathogenic serotypes of *E. coli*; unk. = Unknown virulence mechanisms. Source of strains: a. A.F. Pestana de Castro - UNICAMP; b. L.R. Trabulsi - EPM; c. I. Suassuna - UERJ; d. H.L. DuPont - Tex. Med. Sch.; e. E.H. Ewing - CDC; t-1 pili = type 1 pili; MR pili = Mannose-resistant pili

Origin	Virulence trait	Strain	Relevant surface characteristics (*)	L.A.	Adherence (**)
Diarrhea	ETEC	<i>E. coli</i> 40 T ^a	-	-	-
		<i>E. coli</i> H10407 ^a	CFA/I pili	-	+
		<i>E. coli</i> PB176 ^b	CFA/II pili	-	+
		<i>E. coli</i> 987 P ^a	987 P pili	-	+
		<i>E. coli</i> 0101:K99 ^a	K99 pili	-	+
		<i>E. coli</i> 681 (0141:K85ab;K88a,b) ^a	K88 pili	-	++
Diarrhea	INV	<i>E. coli</i> Fx97(0164) ^c	-	-	+
		<i>E. coli</i> 208-8p (S. Paulo II) ^b	-	-	-
		<i>E. coli</i> 4608-58 (0143:K?;H) ^d	-	-	-
		<i>S. flexneri</i> 1225/53 ^c	t-1 pili	-	++
Diarrhea	unk.	<i>S. flexneri</i> Hr-94 ^c	-	-	-
		<i>C. freundii</i> 5377 ^c	<i>E. coli</i> 0111ab antigen	-	-
Collection	EPEC	<i>C. freundii</i> I312 ^c	<i>E. coli</i> 0111 antigen; t-1 pili	-	++
		<i>E. coli</i> 3943-67 (0111a,b;K58:NM) ^e	t-1 pili	-	-
		<i>E. coli</i> 931-54 (0111a,c;K58:NM) ^e	t-1 pili	-	+
Normal feces	EPEC	<i>E. coli</i> ECT-122 (055:K59) ^e	t-1 pili	-	+
		<i>E. coli</i> F-13(055:K?:NM)	t-1 pili	-	++
Urinary infection	unk.	<i>E. coli</i> UTI-1 (06:K53)	MR pili	-	+
		<i>E. coli</i> UTI-30 (06:K2)	MR pili	-	+
		<i>E. coli</i> UTI-4 (04:K12)	t-1 pili	-	++

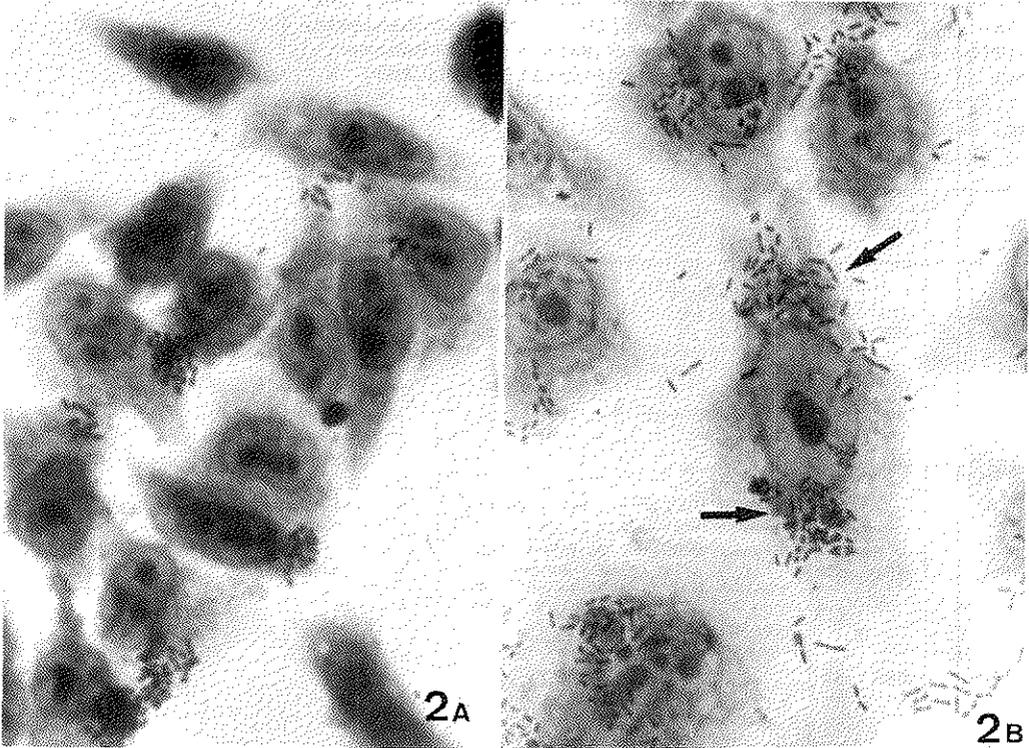
interaction between L.A. adhesin and its receptors.

Cooperation between EPEC adhesins is also suggested by earlier results indicating that PIL⁺ strains were more frequent among epidemic strains of EPEC than among strains isolated from sporadic cases of diarrhea. Those strains also had adherence indexes for HeLa cells higher than adherence indexes of PIL⁻ strains (1). Simultaneous occurrence of both adhesins in outbreak-associated EPEC could contribute, perhaps, for the rapid spreading of EPEC in pediatric wards.

Concerning the nature of the L.A. adhesin no bacterial surface appendages like pili or capsule were seen in negatively stained preparations of EPEC. However, L.A. adhesin was demonstrated to be firmly cell bound and its release in culture media was not observed in specially designed L.A.-inhibition tests (data not shown). L.A. inhibition by carbohydrates and degradation of surface proteins by cellular and bacterial treatments with trypsin suggests that cell surface glycoproteins and bacterial proteins are involved in L.A. Glycoproteins and glycolipids also function as receptors for ETEC attachment to animal cell surfaces (10).

Figure 2 - Giemsa-stained monolayers of Hep-2 cells infected with EPEC *E. coli*.

Symbols: (A). Type 1 pili-negative *E. coli* 54 showing paranuclear nests of short bacillary forms typical of LA pattern; (B). Piliated *E. coli* 386 showing two different adherence patterns (arrows), as described in the text. X600



A considerable diversity on L.A. adhesins and their cell receptors is suggested from variations verified on tests of L.A.-inhibition by carbohydrates and by Con A, a lectin that binds to D-mannose and D-glucose residues on cell surface glycoproteins (21).

Among certain non-piliated bacteria, attachment to cell surfaces seems to be partially mediated by LPS (12, 13, 18). Evidences against LPS participation on L.A. arise from observations of L.A. reduction in trypsin-treated EPEC and complete absence of L.A. among smooth EPEC strains obtained from collections and enterobacteria expressing EPEC O antigens.

However, pretreatment of Hep-2 cells with alkali-treated *E. coli* 0111 LPS impaired L.A. of EPEC 54 (0111) whereas stimulating adherence of EPEC 68 (055). It is possible that in 0111 LPS-treated cells, surface electrical charge equilibrium between bacteria and cells was altered, resulting in attraction or repulsion of differently charged bacterial surfaces. Kihlstrom (13) verified that the binding of bacterial LPS changes physico-chemical properties of cellular surfaces depending on the LPS preparation used and that these changes influence differently the attachment of diverse bacterial strains.

Heat or formaldehyde treatment of EPEC adhesins (9) and mannose-resistant pili of *E. coli* (7, 8) causes direct lesions on adhesins and results in impairment of bacterial adherence. It was verified that similar treatments completely abolished both viability and L.A. However, L.A. impairment was not probably related to destruction of bacterial surface antigens mediating adherence because L.A. was also

Table 3 - Effect of culture conditions on type 1 pili production and on L.A. indexes of some representative EPEC strains.

Symbols: * - TSB-Eagle = Culture in TSB (16-18h), culture in Eagle MEM (2.5h), contact with Hep-2 monolayers for 15 min and additional incubation for 2h; CFA = Serial culture in CFA agar, contact and incubation with cells as above; NB = Serial culture in nutrient broth, contact and incubation as above; CFA-Eagle/NB-Eagle = Serial culture in CFA or NB, culture in Eagle MEM (2.5h), contact and incubation with cells as above; ** - Per cent of L.A. in TSB-Eagle-grown bacteria; α = type 1 pili-producing (PIL⁺) or not producing (PIL⁻) strains

Strain	Culture conditions (*)		L.A. index (% of control L.A.) (**)
	Type 1 pili production		
54 (0111:K58, PIL ⁻) [*]	TSB-Eagle	-	49.0 (100)
	CFA	-	0
	CFA-Eagle	-	15.0 (30.6)
	NB	-	11.5 (23.4)
	NB-Eagle	-	7.0 (14.2)
386 (0111:K58, PIL ⁺)	TSB-Eagle	+	145.0 (100)
	CFA	-	14.0 (9.6)
	CFA-Eagle	-	120.0 (82.7)
	NB	+	80.0 (55.1)
	NB-Eagle	+	94.0 (64.8)
341 (0119:K69, PIL ⁺)	TSB-Eagle	-	77.0 (100)
	CFA	-	0.7 (0.9)
	CFA-Eagle	-	70.0 (90.9)
	NB	+	30.0 (38.9)
	NB-Eagle	+	47.0 (61.0)

abolished by U.V. treatment which preserves thermolabile antigens due to its lethal action directed upon bacterial DNA.

L.A. also required Ca⁺⁺ ions and this effect was not related to neutralization of electrical charges between bacterial and cellular surfaces since cation replacement by Mg⁺⁺ did not restore L.A. Additional tests showed that Ca⁺⁺ requirement was not dependent on Ca⁺⁺ availability during contact time but to previous bacterial culture in Ca⁺⁺-containing medium.

Attachment and internalization of *S. typhimurium* and *S. flexneri* into animal cells are dependent on bacterial metabolism (12, 18) and on divalent cations (19) which activate or stabilize bacterial products involved in the internalization step. Despite L.A. dependence on Ca⁺⁺ ions and on bacterial and cellular viability suggested internalization of attached EPEC, a direct evidence was not obtained since our tests were not designed to distinguish between surface attachment or intracellular localization. Studies on ultrastructural interaction of EPEC and Hep-2 cells and L.A. role on EPEC virulence to laboratory animals are currently underway.

Table 4 - Inhibition of L.A. in EPEC strains by carbohydrates (10mg/ml) or by cellular (Hep-2) pretreatment with concanavalin A (100µg/ml).

Symbols: * = Tests without carbohydrates or Con A; ** = L.A. indexes ≤50% of control L.A. were accepted as L.A. inhibition; *** = In tests using 100mg/ml carbohydrates and 200µg/ml Con A, only strain 94 had L.A. inhibited: D-glucose (12.1%); D-mannose (14.8%); Lactose (21.5%); Con A (13.6%)

Strains	Control L.A. index (*)	L.A. indexes (% of control L.A.) (**)					
		D-glucose	L-rhamnose	D-mannose	Galactose	Lactose	Con A
54 (0111:K58)	79.0 (100)	10.0 (12.6)	20.0 (25.3)	8.8 (11.1)	22.6 (28.6)	67.0 (84.8)	68.0 (86.2)
94 (***)	40.0 (100)	40.0 (100)	40.0 (100)	24.6 (61.5)	8.5 (21.2)	38.6 (96.5)	28.6 (71.5)
68 (055:K58)	35.5 (100)	9.4 (26.4)	3.3 (9.2)	4.0 (11.2)	37.3 (105)	1.7 (4.7)	4.4 (12.3)
351 (086a:K61)	27.8 (100)	18.0 (64.7)	21.7 (78)	16.8 (60.4)	27.9 (100)	17.5 (62.9)	9.7 (34.8)
329 (0119:K69)	17.5 (100)	6.7 (38.2)	17.6 (100)	8.1 (46.2)	8.4 (48)	4.6 (26.2)	18.0 (102.8)

Table 5 - Effect of different cellular and bacterial treatment on L.A. indexes of EPEC strains.

Symbols: * = Eagle MEM with calf serum (2%) and with or without Ca^{++} and/or Mg^{++} (1mM); ** = Bacterial and cellular viability unaltered by trypsin or LPS and abolished by the other treatments; in tests using inactivated bacteria, L.A. indexes were obtained immediately after a contact time of 30min without further incubation with cell monolayers. Control L.A. indexes obtained in identical experimental conditions were 23.4 (strain 54) and 13.7 (strain 68); α = Alkali-treated LPS of *E. coli* 3943-67 (O111a, b:K58:NM); Glut. = Glutaraldehyde

Strain	L.A. indexes (% of control L.A.)											
	Control L.A. index	Bacteria grown in Eagle-MEM (*)			Cellular treatments (**)				Bacterial treatments (**)			
		without $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$	with Ca^{++}	with Mg^{++}	trypsin	0111 LSP ^a	heat	glut.	trypsin	heat	U.V. glut.	
54 (0111:K58)	53.5 (100)	5.8 (10.8)	55.5 (103)	10.0 (18.0)	4.2 (7.8)	4.3 (8.0)	6.5 (12.2)	0	2.5 (4.6)	0	0	0
68 (055:K59)	15.2 (100)	6.2 (40.7)	11.2 (73.6)	4.9 (32.2)	5.0 (32.8)	22.0 (144.7)	2.8 (18.4)	0	5.7 (37.5)	0	0	0

Table 6 - Effect of Ca^{++} ions on L.A. of EPEC strains

Symbols: * - Ca^{++} = 1mM; α = L.A. index (% of control L.A.).

Strain	Bacteria grown in Eagle-MEM(*)		L.A. tests in Eagle-MEM	
	with Ca^{++}	without Ca^{++}	with Ca^{++}	without Ca^{++}
54 (0111:K58)	with Ca^{++}		32.8 (100) ^a	25.3 (77.1)
	without Ca^{++}		4.3 (13.1)	4.4 (13.4)
68 (055:K59)	with Ca^{++}		18.4 (100)	30.2 (164.1)
	without Ca^{++}		3.6 (19.5)	7.2 (39.1)

Acknowledgements

We thank Maria Angelica Pereira da Silva (Cell Culture Laboratory, SMI-UERJ) for excellent technical assistance. This work was supported by FINEP (Conv. FINEP-UERJ 4.3.85.0310.00).

References

1. Andrade, J.R.C.; Caniné, G.A.; Parentoni, L.S. & Santa Rosa, M.R. - Pili e aderência para células HeLa em *Escherichia coli* enteropatogênicas. Rev. Microbiol. (S. Paulo), 15:239-245, 1984.
2. Andrade, J.R.C.; Melo, F.M.; Dickie, L.; Santa Rosa, M.R. & Suassuna, I. - Mannose-resistant hemagglutinins and pili in *Escherichia coli* associated to urinary tract infections. Rev. Microbiol. (S. Paulo), 15:137-139, 1984.

3. Baldini, M.M.; Kaper, J.B.; Levine, M.M.; Candy, D.C.A. & Moon, H.W. - Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Pediat. Gastroenterol. Nutr.*, 2:534-538, 1983.
4. Brinton Jr., C.C. - The piliation phase syndrome and the uses of purified pili in disease control. *Proc. 30th US-Japan Conference on Cholera, Atlanta*, p.34-60, 1977.
5. Carvalho, R.L.B. - Adesão de *Escherichia coli* enteropatogênica clássica a células HeLa. São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1981. (Tese de Mestrado).
6. Cravioto, A.; Gross, R.J.; Scotland, S.M. & Rowe, B. - An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr. Microbiol.*, 3:95-99, 1979.
7. Duguid, J.P.; Clegg, S. & Wilson, M.I. - the fimbrial and non-fimbrial haemagglutinins of *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.*, 12:213-227, 1978.
8. Eden, C.S.; Eriksson, B. & Hanson, L.A. - Adhesion of *Escherichia coli* to human uroepithelial cells in vitro. *Infect. Immun.*, 18:767-774, 1977.
9. Faris, A.; Wadstrom, T. & Freer, J.H. - Hydrophobic adsorptive and hemagglutinating properties of *Escherichia coli* possessing colonization factor antigens (CFA/I or CFA/II), type 1 pili, or other pili. *Curr. Microbiol.*, 5:67-72, 1981.
10. Gaastra, W. & de Graaf, F.K. - Host-specific fimbrial adhesins of non-invasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Microbiol. Rev.*, 46:129-161, 1982.
11. Gurwith, M.; Hinde, D.; Gross, R. & Rowe, B. - A prospective study of enteropathogenic *Escherichia coli* in endemic diarrheal disease. *J. Infect. Dis.*, 3:292-297, 1978.
12. Kihlstrom, E. & Edebo, L. - Association of viable and inactivated *Salmonella typhimurium* 395 MS and MR10 with HeLa cells. *Infect. Immun.*, 14:851-857, 1976.
13. Kihlstrom, E. - The effects of lipopolysaccharides on the association of *Salmonella typhimurium* with HeLa cells. *Scand. J. Infect. Dis. (Suppl.)*, 24:141-143, 1980.
14. Klipstein, F.A.; Rowe, B.; Engert, R.F.; Short, H.B. & Gross, R.J. - Enterotoxigenicity of enteropathogenic serotypes of *Escherichia coli* isolated from infants with epidemic diarrhea. *Infect. Immun.*, 21:171-178, 1978.
15. Konowalchuk, J.; Speirs, J.I. & Stavric, S. - Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 18:775-779, 1977.
16. Nataro, J.P.; Scaletsky, I.C.A.; Kapper, J.B., Levine, M.M. & Trabulsi, L.R. - Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 48:378-383, 1985.
17. Neter, E. - Enteritis due to enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Pediat.*, 55:223-239, 1959.
18. Ogawa, H., Nakamura, A.; Nakaya, R.; Mise, K.; Honjo, S.; Takasaka, M.; Fujiwara, T. & Imaizumi, K. - Virulence and epithelial cell adhesiveness of dysentery bacilli. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, 20:315-328, 1967.
19. Osada, Y.; Une, T.; Ikeuchi, T. & Ogawa, H. - Divalent cation stimulation of the cell infectivity of *Shigella flexneri* 2a. *Jpn. J. Microbiol.*, 19:163-166, 1975.
20. Scaletsky, I.C.A.; Silva, M.L.M. & Trabulsi, L.R. - Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect. Immun.*, 45:534-536, 1984.
21. Sharon, N. & Lis, H. - Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. *Science*, 177:949-959, 1975.
22. W.H.O. Scientific Working Group - *Escherichia coli* diarrhoea. *Bull. W.H.O.*, 58:23-36, 1980.
23. Young, V.M.; Gillem, H.C.; Massey, E.D. & Baker, H.J. - A study on the detection and specificity of antibodies to *Shigella flexneri* types using preserved polysaccharide-sensitized human erythrocytes. *Am. J. Public Hlth.*, 50:1866-1872, 1960.

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS INFANTIS

Beatriz T. Cullen (Bolsista Fapesp 81/0874-8)

Deptº de Alimentos e Nutrição
Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP
Rua Expedicionários do Brasil, 1621
14800 Araraquara SP, Brasil

Deise P. Falcão

Deptº de Ciências Bio-Clinicas
Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP

& Mariza Landgraf

Deptº de Alimentos e Nutrição Experimental
Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP
Caixa Postal 30786
01051 São Paulo SP, Brasil

Resumo

Realizou-se exame microbiológico em 54 amostras de alimentos infantis destinados a crianças de 0 a 2 anos de idade, sendo 23 amostras de produtos industrializados adquiridos em supermercados e 16 amostras de sopas e 15 de mamadeiras, coletadas em creches da cidade de Araraquara, no Estado de São Paulo. Realizaram-se as seguintes análises: contagens de bactérias aeróbicas ou facultativas mesófilas e termófilas, de *Staphylococcus aureus*, de *Bacillus cereus*, de organismos anaeróbios clostrídios sulfito-redutores, de bolores e leveduras, pesquisa de *Salmonella* e *Yersinia enterocolitica* e a determinação do Número Mais Provável de coliformes totais e fecais. Não foram encontrados *S. aureus*, *Salmonella*, *Y. enterocolitica*, clostrídios sulfito redutores em nenhuma das amostras. Em proporções variáveis foram encontrados, nos três tipos de alimentos analisados, *B. cereus*, microrganismos aeróbios ou facultativos mesófilos e bolores e leveduras. Coliformes totais e fecais foram constadas em amostras de mamadeiras.

Summary***Microbiological examination of infant foods***

A microbiological examination was carried out on 54 samples of foods to be eating to 0-2 years old children. Twenty-three of them were baby-food samples bought at supermarkets, 16 of soups and 15 samples of milk or milk substitute infant formulas from feeding bottles collected at day-care children's institutions in Araraquara, State of São Paulo, Brazil. The following tests were made: presence or absence of *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica* and verification of the Most Probable Number (MPN) of coliforms, counts of mesophilic and thermophilic bacteria, yeasts and molds, sulphite reducing anaerobic bacteria, *Staphylococcus*

aureus and *Bacillus cereus*. All samples were negative for *Salmonella*, *S. aureus*, *V. enterocolitica* and anaerobic organisms. There were *B. cereus* and deteriorative microorganisms present in varying proportions in the three types of foods. Coliforms and faecal coliforms were present in samples from feeding bottle.

Introdução

A gastroenterite infantil, doença relacionada a condições precárias de higiene, é considerada uma das principais causas de morbidade e mortalidade infantil em nosso meio. Os alimentos e a água representam os principais veículos transmissores dos agentes etiológicos dessa doença (14).

Depois do leite materno, a utilização de alimentos infantis industrializados ("baby-foods") pode ser de grande importância na prevenção de infecções gastrintestinais, principalmente entre as crianças do grupo etário mais suscetível, ou seja, de zero a dois anos de idade. Tais alimentos, por serem submetidos a tratamento térmico, tornam-se praticamente isentos de bactérias, a não ser que sofram contaminação após o seu tratamento. Por outro lado, alimentos desidratados utilizados no preparo de mamadeiras podem tornar-se veículos de microrganismos patógenos, assim como os alimentos não industrializados, por exemplo, sopas e mamadeiras preparadas com leite de vaca, além de outros alimentos semi-sólidos, dependendo das condições higiênicas do seu preparo (2, 7, 15, 16, 17, 18).

A presente investigação teve por objetivo verificar as condições microbiológicas de alimentos infantis industrializados que sofreram tratamento térmico, adquiridos em supermercados e de sopas e mamadeiras preparadas em creches e servidos a crianças de zero a dois anos de idade. Esta avaliação foi feita através da determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e fecais, das contagens de microrganismos aeróbios ou facultativos mesófilos e termófilos, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, organismos anaeróbios sulfito-redutores e de bolores e leveduras e da pesquisa de *Salmonella* e *Yersinia enterocolitica*.

Material e Métodos

Origem das amostras de alimentos - Foram analisadas 54 amostras de alimentos infantis destinados a crianças de zero a dois anos de idade, sendo 23 de produtos industrializados adquiridos em supermercados e 31 coletadas em 3 creches, todas situadas no município de Araraquara, Estado de São Paulo.

As amostras analisadas apresentavam composição variada cujos ingredientes eram: carne, macarrão, legumes, frango, gema de ovos, cereais, batata e mandioquinha para os produtos industrializados (todos da mesma procedência); leite, açúcar, mistura achocolatada em pó, amido de milho e leite em pó para as mamadeiras e carne, macarrão, legumes e verduras para as sopas.

Preparo das diluições das amostras - Alimentos industrializados: após a realização da prova de incubação para verificação de esterilidade comercial (19), homogeneizavam-se 25g da amostra em 225ml de água fosfatada, pH 7,2, esterilizada (12), obtendo-se assim, a diluição do alimento a 10^1 . A partir desta diluição inicial, preparavam-se duas diluições, a 10^2 e 10^3 , empregando-se o mesmo diluente.

Alimentos não industrializados - Homogeneizavam-se 25g ou 25ml (para as mamadeiras) em 225ml de diluente para a obtenção da diluição inicial a 10^{-1} . A partir desta preparava-se, para cada alimento, uma série de diluições decimais até 10^{-4} .

Contagem padrão de microrganismos aeróbios ou facultativos mesófilos e termófilos - Para os alimentos infantis industrializados empregava-se o ágar glicose-extrato de levedo triptona (agar padrão Difco) e as incubações a 35°C por 48h para mesófilos e 55°C por 48h para termófilos (12). Com relação as sopas e mamadeiras preparadas em

creches, realizou-se apenas a contagem de microrganismos mesófilos em ágar padrão, com incubação a 35°C e 32°C por 48h, respectivamente (1, 12).

Tabela 1 - Variação na microflora geral de bactérias mesófilas, bolores e leveduras, *B. cereus* e termófilas em alimentos infantis.

Símbolos: * UFC = Unidade Formadora de Colônia por ml ou g

Natureza da amostra	Nº de amostras examinadas	Bactéria indicadora	Variação da microflora contaminante									
			0 - 10 ²		10 ² - 10 ³		10 ³ - 10 ⁴		10 ⁴ - 10 ⁵		> 10 ⁵	
			nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
Mamadeiras	16	Bact. mesófilas (UFC/ml)*			5	31,25	5	31,25	4	25,0	2	12,5
		Bolores e leveduras (UFC/ml)	12	75,0	4	25,0						
		<i>B. cereus</i> (UFC/ml)	7	43,7	2	12,5	3	18,7	4	25,0		
		Bact. mesófilas (UFC/g)	1	6,7	7	46,7	5	33,3	2	13,3		
Sopas	15	Bolores e leveduras (UFC/g)	15	100,0								
		<i>B. cereus</i> (UFC/g)	2	13,3	4	26,7	3	20,0	4	26,7	2	13,3
		Bact. mesófilas (UFC/g)	23	100,0								
Alimentos industrializados	23	Bolores e leveduras (UFC/g)	23	100,0								
		<i>B. cereus</i> (UFC/g)	22	95,65			1	4,35				
		Bact. termófilas (UFC/g)	23	100,0								

Determinação do NMP de coliformes totais e fecais - Foi realizada segundo a técnica dos tubos múltiplos, com cinco tubos por diluição. O teste presuntivo era realizado utilizando-se o caldo lauril-sulfato-triptose com incubação a 35°C por 48h para as amostras de sopas e alimentos industrializados (12) e 32°C por 48h para as mamadeiras (1). O teste confirmatório era realizado empregando-se os caldos lactose-bile-verde brilhante e EC para os coliformes totais e fecais, respectivamente. O teste completo era feito para os coliformes totais segundo o preconizado pelo ICMSF (12).

Contagem de microrganismos anaeróbicos sulfito-redutores - Nesta determinação utilizou-se o ágar SPS (Difco) com incubação a 44°C por 48h, em sistema Gas Pak.

Contagem de *B. cereus* - Foi utilizado o ágar vermelho de fenol (Difco) adicionado manitol, sulfato de polimixina B, emulsão de gema de ovos, segundo o ICMSF (12). As cepas isoladas eram identificadas de acordo com o esquema de Gordon & col. (11).

Contagem de *S. aureus* - Foi empregado o ágar Baird-Parker (Difco) incubado a 35°C por 48h. As cepas isoladas eram identificadas através da prova da coagulase, de acordo com o ICMSF (12).

Contagem de bolores e leveduras - Foi empregado nesta determinação, o ágar glicose batata, pH 3,5, com incubação a 22°C por 3 a 5 dias.

Pesquisa de *Salmonella* - 25g de amostras de alimento industrializado ou 25g de sopa ou 25ml do conteúdo dos frascos de mamadeiras eram adicionados a 225ml de caldo lactosado, para o pré-enriquecimento. Após incubação a 35°C por 24h, a partir das culturas em caldo lactosado, eram semeados 1ml em 10ml de caldo selenito-cistina e caldo tetrationato de Kauffmann, os quais eram incubados a 43°C para enriquecimento de *Salmonella*. Após 24h eram realizadas semeaduras em placas contendo ágar SS e ágar verde-brilhante. Posteriormente, as cepas suspeitas eram submetidas às provas bioquímicas e sorológicas (12).

Pesquisa de *V. enterocolitica* - No processo de enriquecimento, 25g do alimento eram colocados na proporção de 1:10 em caldo tampão de fosfatos, pH 7,2, adicionado de 0,15% de sais biliares e 1% de sorbitol, seguido de incubação a 4°C por 21 dias. A

cada sete dias semeava-se uma alçada em placas de ágar MacConkey que eram incubadas a 25°C por 48h. As cepas suspeitas eram identificadas de acordo com o esquema proposto por Falcão (5).

Tabela 2 - Contaminação de alimentos por bactérias indicadoras de contaminação fecal.

Símbolos: * NMP = Número Mais Provável por ml ou g

Natureza da amostra	Nº de amostras examinadas	Bactéria indicadora	Contaminação %	Variação da microflora contaminante									
				0 - 10		10 - 10 ²		10 ² - 10 ³		10 ³ - 10 ⁴		>10 ⁴	
				nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
Mamadeiras	16	Coliformes totais (NMP/ml)*	41,9	8	50,0	4	25,0	1	6,25	1	6,25	2	12,5
		Coliformes fecais (NMP/ml)	16,13	13	81,25	3	18,75						
Sopas	15	Coliformes totais (NMP/g)	0	15	100								
		Coliformes fecais (NMP/g)	0	15	100								
Alimentos infantis industrializados	23	Coliformes totais (NMP/g)	0	23	100								
		Coliformes fecais (NMP/g)	0	23	100								

Resultados e Discussão

Os resultados mostram variações no grau de contaminação das amostras (Tabelas 1 e 2).

A contaminação por bactérias mesófilas aeróbicas ou facultativas nas 16 amostras de mamadeiras e 15 amostra de sopas ocorre em níveis superiores a 10² UFC/g (Tabela 1). A presença de bactérias mesófilas aeróbicas ou facultativas indica, quando em números altos, condições inadequadas de preparo, bem como a possibilidade de ocorrência de patógenos mesófilos (12).

A contaminação de quatro amostras de mamadeiras por bolores e leveduras, em níveis de 10²-10³ UFC/g, deve-se, provavelmente, à presença desses microrganismos nos ingredientes utilizados no preparo das mesmas, como por exemplo, chocolate em pó, amidos, ou ainda nos frascos de mamadeiras.

Os esporos de *B. cereus* encontram-se amplamente distribuídos na natureza e sua presença já foi constatada em diversos alimentos. No Brasil, estudos realizados com amostras de leite desidratado integral e desnatado, mistura achocolatada para preparo de bebida e sopas ricas em proteínas utilizadas na alimentação infantil, amostras de farinha láctea, de milho, de trigo, de mandioca, de soja e de feijão, amido de milho e leite pasteurizado, apresentaram contaminação por essa bactéria em menor ou maior grau (3, 4, 13). Pelo fato dos alimentos ora analisados apresentarem em sua constituição vários ingredientes semelhantes a esses, tais como, leite pasteurizado, farinha láctea, amido de milho, leite desidratado integral, mistura achocolatada, a presença de *B. cereus* não constitui grande surpresa.

A presença dessa bactéria em níveis baixos só virá a constituir problema quando houver condições para sua multiplicação no alimento uma vez que o número de células necessário para causar toxinfecção é da ordem de 10⁵-10⁹/g do alimento em adultos (7, 9). Como não se conhece a dose necessária que pode causar doenças em crianças, mesmo níveis baixos devem ser analisados, epidemiologicamente, com cautela. Sabe-se, por exemplo, que em dois surtos de toxinfecção, crianças necessitaram de hospitalização enquanto que adultos apresentaram apenas sintomas leves (10).

A presença de alimentos infantis industrializados contaminados por bactérias mesófilas (13,04%) e por bolores e leveduras (21,47%) pode indicar manipulação e/ou armazenamento inadequados pós-processamento uma vez que, nesta pesquisa, os microrganismos termófilos foram os indicadores utilizados para verificação das boas práticas de processamento e os mesmos revelaram-se ausentes.

Quanto às condições higiênicas dos alimentos coletados em creches (Tabela 2), verifica-se a presença de coliformes totais em 13 amostras (41,9%) de mamadeiras e de coliformes fecais em 5 (16,13%). A presença destas bactérias pode indicar a possibilidade de microrganismos enteropatógenos, tais como, *Shigella*, as diversas linhagens patogênicas de *E. coli*, enterovírus, rotavírus estarem presentes e, portanto, risco potencial de crianças contraírem infecções intestinais.

De modo geral e do ponto de vista microbiológico, os alimentos industrializados examinados representaram, pelos valores obtidos, risco menor de exposição das crianças a agentes patogênicos, do que as sopas e mamadeiras analisadas preparadas nas creches visitadas.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com recursos da FAPESP, 81/873-1.

Referências Bibliográficas

1. American Public Health Association - Standard methods for the examination of dairy products. 14.ed. Washington, DC, 1978.
2. Barrel, R.A.E. & Rowland, M.G.M. - Commercial milk products and indigenous weaning foods in a rural West African environment: a bacteriological perspective. *J. Hyg.*, 84:191-202, 1980.
3. Delazari, I.; Leitão, M.F.F.; Geraldini, A.M. & Eiroa, M.N.U. - *Bacillus cereus* em alimentos desidratados. *Bol. ITAL*, 60:31-40, 1978.
4. Eiroa, M.N.U., Leitão, M.F.F. & Vitti, P. - Caracterização microbiológica de farinhas e amidos. *Col. ITAL*, 6:459-473, 1975.
5. Falcão, D.P. - *Yersinia enterocolitica*. In: - Trabulsi, L.R. - Microbiologia das infecções intestinais. Rio de Janeiro, Atheneu, p.79-89, 1981.
6. Frazier, W.C. & Westhoff, D.D. - Food microbiology. 3.ed. New York, McGraw Hill, 1978.
7. Garcia, V.; Lastreto, C. & Montoya, A. - Evaluación de la presencia de *Bacillus cereus* en un alimento infantil desidratado. *Rev. Latino-Amer. Microbiol.*, 23:141-144, 1981.
8. Gilbert, R.J. & Taylor, J. - *Bacillus cereus* food poisoning. In: - Skinner, F.A.; Carr, Y.G., ed. - Microbiology in agriculture, fisheries and food. Apud: - Jay, J.M. - Modern food microbiology. 2.ed. New York, Van Nostrand Reinhold, p.197-213, 1978.
9. Gilbert, Y. - *Bacillus cereus* gastroenteritis. In: - Reimann, H.L. & Bryan, F.L. - Food-borne infections and intoxications. 2.ed. New York, Academic Press, p.497-518, 1979.
10. Goepfert, Y.M.; Spira, W.M. & Kim, H.V. - *Bacillus cereus* - Food poisoning organisms: a review. *J. Milk Food Technol.*, 35:213, 1972.
11. Gordon, R.E.; Haynes, W.C. & Pang, C.H. - The genus *Bacillus*. Agriculture Research Service, United States Department of Agriculture Handbook n° 427. Washington, D.C., US Government Printing Office, 1973.
12. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) - Microorganisms in foods. 1 - Their significance and methods of enumeration. Toronto, University of Toronto, 1978.
13. Leitão, M.F.F.; Delazari, I. & Mazzoni, H. - Microbiologia de alimentos desidratados. *Col. ITAL*, 5:223-241, 1973/1974.
14. Murahovschi, Y. & Trabulsi, L.R. - Aspectos etiológicos e epidemiológicos das diarreias infecciosas bacterianas. In: - Trabulsi, L.R. - Microbiologia das infecções intestinais. Rio de Janeiro, Atheneu, p.11-24, 1981.

15. Rosa, M.C. de la & Mosso, M.A.; Fernandez-Sanfrancisco, M.T. & Gastón de Iriarte, E. - Microbiología de alimentos infantiles. Anal. Bromat., XXXI:127-136, 1979.
16. Rowland, M.G.M.; Barrel, R.A.E. & Whiteheard, R.G. - Bacterial contamination in traditional Gambian weaning foods. Lancet, 1:136-138, 1978.
17. Singh, R.S., Singh, S.; Batish, V.K. & Ranganathan, B. - Bacteriological quality of infant milk foods. J. Food Prot., 43:340-342, 1980.
18. Schwab, A.H.; Swartzentruber, A.; Wentz, B.A. & Read Jr., R.B. - Microbiological quality of dry milk mixes and milk substitute infant formulas. Appl. Environm. Microbiol., 43:389-391, 1982.
19. Speck, M.L. - Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, D.C. American Public Health Association, 1976.

ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E ANTIFÚNGICA DE DERIVADOS MESOIÔNICOS

Edeltrudes de Oliveira Lima
Ricardo Fernandes Maia
José Maria Barbosa Filho
& Lauro Xavier Filho

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

Resumo

Dois compostos da série mesoiônica 4,5-difenil-2-tiolato-1,3, 4-tiodiazólio (I) e 1,4,5-trifenil-2-tiolato-1,3,4 -triazólio (II) foram analisados em várias concentrações contra alguns microrganismos patogênicos e oportunistas. Foram testadas as bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces griseus* e os seguintes fungos: *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula* sp., *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum*, *Penicillium* sp., *Paracoccidioides brasiliensis* e *Sporothrix schenckii*. Os ensaios foram realizados em meios líquidos e sólidos. Os resultados indicaram que, a dose ideal de inibição para todos os microrganismos testados é de 400µg/ml.

Summary

Antibacteria and antifungic activities of the mesoionic derivatives

Two compounds from the mesoionic series, 4,5-diphenyl-1,3,4-thiadiazolium-2-thiolate (I) and 1,4,5-triphenyl-1,3,4-triazolium-2-thiolate (II) were analysed in various concentrations against microorganisms. The bacteria *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces griseus* and the yeasts: *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula* sp., *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum*, *Penicillium* sp., *Paracoccidioides brasiliensis*, *Sporothrix schenckii* were tested. The essays were carried out in liquid and solid media. The results indicate that ideal dosage which inhibits all microorganisms tested is 400µg/ml.

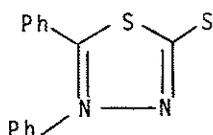
Introdução

Muitos estudos sobre os compostos mesoiônicos somente tiveram importância há três décadas atrás. Os referidos compostos, além de apresentarem comportamento químico ímpar (12), tem chamado atenção para uma série de interessantes atividades farmacológicas.

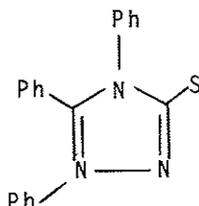
Os compostos mesoiônicos e seus derivados têm apresentado importância dentro da química médica, bem como várias atividades biológicas têm sido evidenciadas. Entre as extensas atividades biológicas observadas, destacam-se a antibacteriana (16, 17, 18), antifúngica (4, 14), antiparasitária e antiinflamatória (15), anticancerígena (7), antimalárica (3, 11), inseticida, herbicida, hipoglicêmica, diurética (7), analgésica (6), sedativa (8), estimulante do sistema nervoso central, inibidor da monoaminoxidase (4), agente hipertensor e cardiovascular (5, 13).

Dois derivados da série mesoiônica, 4,5-difenil-2-tiolato-1,3,4-tiodiazólio (I) e 1,4,5-trifenil-2-tiolato-1,3,4-triazólio (II) foram sintetizados (1) e são avaliados neste trabalho através de ensaios microbiológicos "in vitro" frente à várias espécies de fungos e bactérias.

Composto I



Composto II



Material e Métodos

a) Na elaboração do trabalho foi utilizado vidraria e equipamento de uso corrente em laboratório de microbiologia.

b) As amostras de fungos foram obtidas no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo: *Candida albicans* (FCF-243), *Cryptococcus neoformans* (FCF-119), *Rhodotorula* sp. (FCF-118), *Epidermophyton floccosum* (FM-564), *Trichophyton rubrum* (FCF-249), *Microsporum canis* (FCF-258), *Penicillium* sp. (FCF-181), *Paracoccidioides brasiliensis* (FM-621) e *Sporothrix schenckii* (FCF-94). As amostras de bactérias foram adquiridas no Instituto de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco e Instituto Adolfo Lutz de São Paulo: *Staphylococcus aureus* (ATCC-29737), *Escherichia coli* (ATCC-10536), *Streptococcus faecalis* (ATCC-6057), *Streptomyces albus* (CBS) e *Streptomyces griseus* (NRRL-150).

c) Os meios de cultura usados nos ensaios para os fungos foram ágar e caldo Sabouraud, e para as bactérias ágar e caldo nutritivo (2, 9, 10).

d) As drogas testadas, compostos mesoiônicos I (4,5-difenil-2-tiolato-1,3,4-tiodiazólio) e II (1,4,5-trifenil-2-tiolato-1,3,4-triazólio), nas concentrações de 400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13 e 1,56 µg/ml. Os referidos compostos foram obtidos por síntese no Instituto de Química de Produtos Naturais da Universidade Federal de Santa Maria-RS.

e) Na primeira parte do trabalho, o ensaio foi realizado em meio líquido, usando uma bactéria de tubos de ensaio 14x140mm, contendo 5ml de meio líquido, e o tubo nº1, 7ml. Todo o material foi esterilizado em autoclave a 120°C durante 30 minutos. Os compostos mesoiônicos foram pesados e solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO), sendo adicionados ao tubo nº1, obtendo-se a concentração inicial de 400 µg/ml. Daí, foram feitas as diluições seriadas à razão de 2 até 1,56 µg/ml. A suspensão, de fungos leveduriformes e de bactérias foram preparadas, respectivamente, em água destilada e solução salina esterilizadas, a partir de culturas recentes, com 48 horas de repique. As referidas suspensões foram padronizadas através da escala MacFarland (tubo nº3) e contagem celular. Em seguida, inoculou-se 0,1ml da suspensão leveduriforme e bacteriana na bateria de tubos de ensaio contendo o meio líquido com os compostos diluídos. Nos ensaios com fungos filamentosos, inoculou-se um fragmento da colônia repicada antecipadamente 7 dias.

Na segunda parte do trabalho, o ensaio foi realizado em meio sólido, usando os compostos químicos nas concentrações de 400, 50 e 6,25µg/ml, selecionadas a partir do ensaio em meio líquido. Nas placas de Petri, anteriormente esterilizadas, foram colocados 0,1ml das suspensões de fungos leveduriformes e de bactérias e 1ml da suspensão de fungos filamentosos feita em água destilada estéril, triturando um fragmento da colônia.

Os ensaios com fungos leveduriformes e bactérias foram incubados durante 48 horas a 37°C, e com fungos filamentosos durante 7 dias a temperatura ambiente.

Tabela 1 - Resultados do ensaio com os compostos I e II, em meio líquido, frente a fungos e bactérias.

Símbolos: C.n. = *C. neoformans*; C.al. = *C. albicans*; Rh. = *Rhodotorula*; E.f. = *E. floccosum*; M.g. = *M. gypseum*; T.r. = *T. rubrum*; Pen. = *Penicillium*; P.b. = *P. brasiliensis*; S.c. = *S. schenckii*; S.au. = *S. aureus*; E.c. = *E. coli*; S.f. = *S. faecalis*; S.g. = *S. griseus*; S.al. = *S. albus*; ++++ = Excelente inibição; +++ = Boa inibição; ++ = Regular inibição; + = Valor discutido; 0 = Sem efeito

Composto em µg/ml	Composto I														
	Microrganismos														
	C.n.	C.al.	Rh.	E.f.	M.g.	T.r.	Pen.	P.b.	S.c.	S.au.	E.c.	S.f.	S.g.	S.al.	
400	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++++	++++	++	++++	++++	++++	++++	++++	
200	++++	+++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	++++	+++	+++	+++	
100	++++	+++	++++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
50	++++	++	++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	
25	++	++	+	++	+++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	
12,5	+	+	+	++	++	+	++	++	++	0	0	++	+	+	
6,25	0	0	0	+	0	0	0	0	0	+	0	+	0	0	
3,13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1,56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Composto em µg/ml	Composto II														
	Microrganismos														
	C.n.	C.al.	Rh.	E.f.	M.g.	T.r.	Pen.	P.b.	S.c.	S.au.	E.c.	S.f.	S.g.	S.al.	
400	++++	++++	++++	++++	+++	++++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	
200	+++	+++	++	+++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
100	+++	++	++	+	+	+	++	+	++	++	+	++	++	++	
50	++	++	+	++	+	++	+	++	++	+	+	++	++	++	
25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
12,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
6,25	0	0	0	0	0	0	0	+	0	+	0	+	0	0	
3,13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1,56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Resultados e Discussão

Do ensaio em meio líquido, observou-se que, a concentração de 400µg/ml do composto I (4,5-difenil-2-tiolato-1,3,4-tiadiazólio), exerceu intensa atividade sobre todos os fungos e bactérias testados no ensaio, significando isto, que o composto inibiu todos os microrganismos, não permitindo nenhum crescimento. A concentração de 200µg/ml mostrou resultados muito bons para todos microrganismos testados, apresentando inibição do crescimento fúngico e bacteriano de forma mais ou menos intensa. O composto nas concentrações de 100 e 50µg/ml apresentou razoável inibição no crescimento de fungos e bactérias, variando um pouco de intensidade conforme as espécies testadas. O restante das concentrações, de 25 a 1,56µg/ml deram resultados intensamente irregulares, não merecendo nenhum comentário, sendo concentrações muito baixas, não tiveram capacidade de inibir o crescimento fúngico e bacteriano. Quando o ensaio foi realizado em meio sólido, foi observado que, os resultados obtidos foram semelhantes aos do meio líquido em suas devidas concentrações de 400, 50 e 6,25µg/ml. Ficando claro, portanto, o poder de atividade inibitório do composto I sobre fungos e bactérias (Tabela 1).

Na segunda parte do trabalho, correspondente ao ensaio em meio líquido com o composto II (1,4,5-trifenil-2-tiolato-1,3,4-triazólio) frente à vários microrganismos, as concentrações de 400 e 200µg/ml inibiram intensamente os fungos e bactérias testados, não havendo o menor vestígio de crescimento. As concentrações de 100, 50 e 25µg/ml, mostraram resultados irregulares, exercendo de forma geral muito pouca atividade antimicrobiana. Abaixo de 25µg/ml, os resultados não merecem discussão. Os resultados obtidos com o referido composto, em meio sólido, demonstrou que apenas a concentração de 400µg/ml inibiu satisfatoriamente todos os fungos e bactérias de forma semelhante ao ensaio em meio líquido. As duas concentrações, 50 e 6,26µg/ml não apresentaram a menor atividade antifúngica e antibacteriana (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultados do ensaio com os compostos I e II, em meio sólido, frente à fungos e bactérias.

Símbolos: C.n. = *C. neoformans*; C.al. = *C. albicans*; Rh. = *Rhodotorula*; E.ǰ. = *E. floccosum*; M.g. = *M. gypseum*; T.r. = *T. rubrum*; Pen. = *Penicillium*; P.b. = *P. brasiliensis*; S.c. = *S. schenckii*; S.au. = *S. aureus*; E.c. = *E. coli*; S.ǰ. = *S. faecalis*; S.g. = *S. griseus*; S.al. = *S. albus*; ++++ = Excelente inibição; +++ = Boa inibição; ++ = Regular inibição; + = Valor discutido; 0 = Sem efeito

Composto em µg/ml	Composto I													
	Microrganismos													
	C.n.	C.al.	Rh.	E.ǰ.	M.g.	T.r.	Pen.	P.b.	S.c.	S.au.	E.c.	S.ǰ.	S.g.	S.al.
400	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
50	+++	++	++	+++	++	++	+++	++	++	+++	++	++	++	+
6,25	++	+	++	++	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0
Composto II	Composto II													
	Microrganismos													
	C.n.	C.al.	Rh.	E.ǰ.	M.g.	T.r.	Pen.	P.b.	S.c.	S.au.	E.c.	S.ǰ.	S.g.	S.al.
400	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
50	++	+	++	++	+	++	++	++	+	++	+	+	+	+
6,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

A equivalência maior dos resultados dos dois compostos foi nas concentrações de 400 e 200µg/ml. A partir de 100µg/ml, o composto I sempre apresentou maior atividade de inibitória sobre fungos e bactérias que o composto II, principalmente no ensaio em meio líquido.

Embora a avaliação microbiológica não tenha sido tão extensiva, dá uma noção de importância desses compostos como agentes antimicrobianos.

A dose ideal para inibição de fungos e bactérias, comprovado neste ensaio, foi a de 400µg/ml tanto no composto I como no II.

Referências Bibliográficas

1. Baker, W. & Ollis, W.D. - Mesoionic compounds. *Quant. Rev.*, 11:15-29, 1957.
2. Bier, O. - Bacteriologia e imunologia. São Paulo, Melhoramentos, 1970.
3. Boots, S.G. & Cheng, C.C. - Synthesis of piperonyl: substituted pyrazoles, isoxazoles, triazoles, oxidiazoles and thiadiazoles. *J. Heterocycl. Chem.*, 4:272-283, 1967.
4. Davis, D.; Beker, H.J. & Rogers, E.F. - The chemotherapy of wheat and rust diseases with sydones. *Phytoterapy*, 49:821-823, 1959.
5. Goetz, M.; Freter, K. & Zeile, K. - Hypotensive 3-aminosydnone imines (Boehringer, C.H. Sohn). *Ger. Offen.*, 1:752-765, 1970.
6. Kamitani, T.; Saito, Y. & Terachi, T. - N-acyl-3-ethoxy-carbonil-methylsydnone imines (Fugisawa Pharmaceutical Co. Ltd.). *Japan*, 72:375-378, 1972.

7. Kier, L.B. & Roche, E.B. - Medical chemistry of the mesoionic compounds. *J. Pharm. Sci.*, 56:149-168, 1967.
8. Koenig, H.; Thieme, P. & Amann, A. - Mesoionic thiadiazolines (Boudische Amilin-und Soda-Fabrik A.G.). *Ger. Offen.*, 2:25-33, 1973.
9. Lacaz, C.S. - *Micologia médica*. 6.ed. São Paulo, Sarvier, 1977.
10. Minami, P.S. - *Técnicas micológicas: roteiro de aulas práticas*. 2.ed. São Paulo, 1978.
11. Nyberg, W.H. & Cheng, C.C. - Piperonylsydnone: a new type of malarial agent. *J. Med. Chem.*, 8:531-533, 1965.
12. Ollis, W.D. & Ranschen, C.A. - Mesoionics compounds. In: - Katritzky, A.R. & Boulton, A.I., eds. - *Advances in heterocyclic chemistry*. New York, Academic Press, 19:1-122, 1976.
13. Regnier, G.; Canavari, R. & Laubie, M. - Sydnonimines derivatives (Science-Union at Cies-Société Française de Recherche Medicale). *Ger. Offen.*, 2:991-1008, 1973.
14. Rogers, E.F. & Daves, D. - Fungicidal phenylsydnones. (To Merck & Co. Inc.) *U.S.*, 3:520-522, 1965.
15. Saito, Y. & Kamitami, T. - Sydnone-3 or 4-acetic acids. (Takeda Chemical Industries Japan), 70:509-512, 1970.
16. Steworth, T.G. & Kier, L.B. - Synthesis of several mesoionic 1,3,4-thiadiazoles. *J. Pharm. Sci.*, 54:731-734, 1965.
17. Takano, T. & Kamitami, T. - Mesoionic thiadiazolylacetic acid derivatives of 6-aminopenicillanic acid or 7-aminocephalosporanic acid. (Fugisawa Pharmaceutical Japan), 71:747-751, 1971.
18. Takano, T. - Sydnone and sydnone imino derivatives of 7-aminocephalosporanic acids. (Fugisawa Pharmaceutical S. African) 68:695-793, 1968.

ATIVIDADE "IN VITRO" DE ALGUNS ANTI-SÉPTICOS SOBRE *CANDIDA*

Arlete Emily Cury

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

Resumo

Foram estudadas as concentrações inibitórias e fungicidas mínimas do cloreto de cetilpiridino, hexaclorofeno, iodo (sob forma de tintura) merbromino, permangato de potássio, rubiazol, timerosal, triclosan e violeta de genciana, para seis espécies de *Candida*. Os valores das concentrações inibitórias mínimas do cloreto de cetilpiridino, hexaclorofeno, iodo, merbromino, timerosal, rubiazol, triclosan e violeta de genciana, mantiveram-se em níveis iguais ou inferiores aos usuais em preparações farmacêuticas. Nestes níveis de concentração, somente as cinco primeiras drogas exerceram ação fungicida sobre as 70 cepas estudadas. O permanganato de potássio, ao contrário das outras drogas, demonstrou pequena ação fungistática e ausência de ação fungicida para essas leveduras.

Summary

"In vitro" activities of some antiseptic drugs for Candida

The minimal inhibitory and cidal concentrations of several antiseptic drugs were studied for 6 different species of *Candida*. The minimal inhibitory concentration values of cetylpyridinium chloride, hexachlorophene, iodine (in the form of tincture), merbromin, thimerosal, rubiazol, triclosan, and gentian violet were kept in the same levels than those usually used on pharmaceutical preparations. Under these concentration levels only the five former drugs were lethal to all the 70 tested strains. Unlikely the other drugs potassium permanganate showed a little fungistatic but no fungicidal action on this yeasts.

Introdução

Várias substâncias classificadas como anti-sépticos são comercializadas sob forma de produtos indicados no controle e no tratamento de infecções superficiais ou na prevenção de infecções locais e gerais. Embora referidas como não seletivas, inúmeros trabalhos comprovam a ação dessas substâncias sobre as bactérias, sendo limitados os estudos com outros microrganismos (1, 5).

Entre os agentes considerados oportunistas, destacam-se várias espécies de *Candida*. Participando como componente da flora normal da pele e mucosas, essas leveduras podem, em determinadas condições, implantar-se como elementos primários ou secundários de infecções humanas e animais (4).

Tabela 1 - Atividade "in vitro" do cloreto de cetilpiridino sobre *Candida*.
Símbolos: * = CIM - Concentração Inibitória Mínima e CFM - concentração Fungicida Mínima; ** = Estes valores representam a média aritmética de 3 determinações

Levedura	CIM e/ou CFM* g/l	% de amostras sensíveis à ação inibitória**	% de amostras sensíveis à ação fungicida**
<i>C. albicans</i>	≤0,07	87,5	37,5
	0,15		37,5
	0,31	4,2	
	0,62	8,3	25,0
<i>C. guilliermondii</i>	≤0,07	80,0	30,0
	0,31		10,0
	0,62	20,0	60,0
<i>C. krusei</i>	≤0,07	100,0	62,5
	0,15		25,0
	0,62		12,5
<i>C. parapsilosis</i>	≤0,07	100,0	20,0
	0,15		40,0
	0,31		20,0
	0,62		20,0
<i>C. pseudotropicalis</i>	≤0,07	100,0	62,5
	0,15		25,0
	0,62		12,5
<i>C. tropicalis</i>	≤0,07	100,0	90,0
	0,31		10,0

Tabela 2 - Atividade "in vitro" do iodo sobre *Candida*.

Símbolos: * = O iodo foi utilizado sob forma de tintura; ** = CIM - Concentração Inibitória Mínima e CFM - Concentração Fungicida Mínima; *** = Estes valores representam a média aritmética de 3 determinações

Levedura	CIM e/ou CFM** g/l	% de amostras sensíveis à ação inibitória***	% de amostras sensíveis à ação fungicida***
<i>C. albicans</i>	≤0,07	33,3	
	0,15	54,2	4,1
	0,31	12,5	16,7
	0,62		16,7
	1,25		62,5
<i>C. guilliermondii</i>	0,31	100,0	
	0,62		100,0
<i>C. krusei</i>	≤0,07	12,5	
	0,15	75,0	
	0,31	12,5	
	1,25		100,0
<i>C. parapsilosis</i>	0,15	80,0	
	0,31	20,0	
	0,62		40,0
	1,25		60,0
<i>C. pseudotropicalis</i>	0,15	75,0	
	0,31	25,0	
	1,25		100,0
<i>C. tropicalis</i>	0,15	50,0	
	0,31	50,0	
	0,62		20,0
	1,25		80,0

Em medidas preventivas, para assepsia local são indicadas, muitas vezes, substâncias cuja ação sobre *Candida* é pouco conhecida (1, 5). No tratamento das candidíases superficiais é amplamente preconizada a utilização de antibióticos considerados específicos. Entretanto, da mesma forma que para outros microrganismos, tem-se observado a existência de cepas resistentes a esses quimioterápicos (2, 3, 10).

O estudo da atividade dos anti-sépticos sobre *Candida* é de interesse, pela ação que podem exercer sobre diferentes microrganismos que coabitam em tecidos superficiais, bem como, pelo baixo custo que apresentam, sob forma de produtos comercializáveis.

O presente trabalho tem como objetivo verificar a atividade antifúngica "in vitro" de várias substâncias anti-sépticas, utilizadas em preparações farmacêuticas, sobre algumas espécies de *Candida*, consideradas patogênicas para o homem, através de técnicas que permitam avaliar as concentrações fungistáticas e fungicidas mínimas.

Material e Métodos

Drogas - Foram avaliadas as atividades antifúngicas do cloreto de cetilpiridino, hexaclorofeno, iodo (sob forma de tintura), merbromino, permangato de potássio, rubiazol, timerosal, triclosan e violeta de genciana.

O cloreto de cetilpiridino foi gentilmente cedido pelos Laboratórios Lepetit e as outras substâncias foram adquiridas no comércio.

Tabela 3 - Atividade "in vitro" do merbromino sobre *Candida*.

Símbolos: * = CIM - Concentração Inibitória Mínima e CFM - Concentração Fungicida Mínima; ** = Estes valores representam a média aritmética de 3 determinações

Levedura	CIM e/cu CFM* g/l	% de amostras sensíveis à ação inibitória**	% de amostras sensíveis à ação fungicida**
<i>C. albicans</i>	≤0,62	25,0	8,3
	1,25	25,0	16,7
	2,50	33,3	33,3
	5,00	16,7	29,2
	10,00		4,2
	20,00		8,3
<i>C. guilliermondii</i>	≤0,62	40,0	
	1,25	40,0	20,0
	2,50	20,0	40,0
	5,00		30,0
	10,00		10,0
<i>C. krusei</i>	≤0,62	37,5	
	1,25	50,0	50,0
	2,50		37,5
	5,00	12,5	12,5
<i>C. parapsilosis</i>	≤0,62	60,0	20,0
	1,25	20,0	20,0
	2,50	20,0	20,0
	5,00		20,0
	20,00		20,0
<i>C. pseudotropicalis</i>	≤0,62	25,0	12,5
	1,25	25,0	12,5
	2,50	12,5	12,5
	5,00	37,5	37,5
	10,00		25,0
<i>C. tropicalis</i>	1,25	30,0	10,0
	2,50	30,0	20,0
	5,00	40,0	30,0
	10,00		40,0

Tabela 4 - Atividade "in vitro" do rubiazol sobre *Candida*.

Símbolos: * = CIM - Concentração Inibitória Mínima e CFM - Concentração Fungicida Mínima; ** = Estes valores representam a média aritmética de 3 determinações

Levedura	CIM e/cu CFM* g/l	% de amostras sensíveis à ação inibitória**	% de amostras sensíveis à ação fungicida**
<i>C. albicans</i>	6,25	4,2	
	12,50	95,8	
	25,00		4,2
	>50,00		95,8
<i>C. guilliermondii</i>	3,12	10,0	
	12,50	90,0	
	>50,00		100,0
<i>C. krusei</i>	12,50	100,0	
	>50,00		100,0
<i>C. parapsilosis</i>	12,50	100,0	
	>50,00		100,0
<i>C. pseudotropicalis</i>	12,50	100,0	
	50,00		12,5
	>50,00		87,5
<i>C. tropicalis</i>	12,50	100,0	
	25,00		10,0
	>50,00		90,0

Microorganismos e inóculos - Foram estudadas 70 amostras de *Candida* isoladas de casos suspeitos de candidíase e representadas por: 24 amostras de *C. albicans*, 10 amostras, respectivamente, de *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* e 8 amostras, respectivamente, de *C. krusei* e *C. pseudotropicalis*.

As leveduras foram mantidas em ágar Sabouraud dextrose (ASD) a 30°C, durante 24h. A partir destas culturas foram preparadas suspensões em água destilada estéril contendo, aproximadamente, 10⁶ unidades formadoras de colônias por ml (7).

Atividade fungistática - O estudo da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizado em triplicata, utilizando-se o teste em meio sólido (7). O hexaclorofeno e o triclosan foram solubilizados, inicialmente, em volume conhecido de etanol. Foram preparadas diluições seriadas das drogas em caldo Sabouraud dextrose e 1ml de cada diluição foi adicionado a 19ml de ASD fundido a 45°C. Neste meio, as concentrações finais variaram de 20,00 a 0,07g/l para cloreto de cetilpiridino, iodo e timerosal; de 20,00 a 0,62g/l para merbromino, triclosan e violeta de genciana; de 30,00 a 0,93g/l para o hexaclorofeno, e de 50,00 a 0,78g/l para permanganato de potássio e rubiazol. Após solidificação em placas de Petri, os meios contendo drogas e os controles foram inoculados com 0,05ml da suspensão de leveduras. Cada placa foi semeada com 14 inóculos e as leituras do teste foram realizadas após 24h do início da incubação a 30°C. Foi considerada CIM, a menor concentração da droga que não permitiu crescimento do cultivo.

Atividade fungicida - O teste para verificação da concentração fungicida mínima (CFM) foi realizado em ASD (7). Foram repicados os cultivos das placas que no teste

anterior mostraram inibição do crescimento e todos os cultivos controle. A leitura do teste foi realizada após incubação dos subcultivos a 30°C e observação de crescimento abundante dos controles (aproximadamente 72h). Foi considerada CFM, a menor concentração da droga que não permitiu crescimento do subcultivo.

Resultados

Nas Tabelas de 1 a 6 estão relacionadas CIM, em diferentes períodos de incubação, e CFM de algumas das drogas estudadas para *Candida* e a porcentagem de amostras sensíveis.

O cloreto de cetilpiridino, em concentrações $\leq 0,07\text{g/l}$ exerceu ação fungistática sobre a maior parte das amostras. Sobre *C. albicans* e *C. guilliermondii* esta ação ocorreu, também, em concentrações até 3 vezes superiores. A CFM foi variável entre as diferentes cepas, atingindo valor máximo de $0,62\text{g/l}$ (Tabela 1).

A CIM do iodo variou de $\leq 0,07\text{g/l}$ a $0,31\text{g/l}$ entre as várias espécies e a CFM atingiu valor máximo de $1,25\text{g/l}$ para a maior parte das amostras (Tabela 2).

O merbromino apresentou CIM até 3 vezes superior a menor concentração empregada no seu estudo. A CFM foi, em alguns casos, até 5 vezes superior à CIM, atingindo valor máximo de $20,00\text{g/l}$ para *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Entre as cepas destas espécies, ocorreram variações de até 5 diluições na CFM (Tabela 3).

A CIM do rubiazol, para a maior parte das amostras, foi de $12,50\text{g/l}$ (Tabela 4). Para 100% das leveduras, a concentração inibitória não ultrapassou $50,00\text{g/l}$, enquanto, a fungicida para 96% das mesmas foi considerada superior.

O triclosan, mostrou atividade fungistática em concentrações de até $10,00$ ou $20,00\text{g/l}$, para as diferentes espécies. Para 58,6% das amostras inibidas, o triclosan não exerceu ação letal em concentrações de até $20,00\text{g/l}$ (Tabela 5).

A CIM e a CFM do hexaclorofeno e do timerosal, para 100% das amostras, foram consideradas, respectivamente, $\leq 0,93$ e $\leq 0,07\text{g/l}$.

A maior parte das leveduras cresceu nos meios contendo permanganato de potássio em concentrações de até $50,00\text{g/l}$. Foram exceções 20,00% das cepas de *C. parapsilosis* e 12,5% de *C. pseudotropicalis* sensíveis às concentrações, respectivamente, de 6,25 e $12,50\text{g/l}$. Entretanto, o permanganato de potássio em concentrações de até 50g/l também não foi letal para essas cepas.

A violeta de genciana, apresentou CIM $\leq 0,62\text{g/l}$, invariável para todas as amostras. Este valor correspondeu, também, à CFM para a maior parte delas. Para 25,7% das leveduras, a ação letal ocorreu, apenas, em concentrações até 5 vezes superiores. Para as amostras restantes, não se verificou ação fungicida da droga, em concentrações de até $20,00\text{g/l}$ (Tabela 6).

Discussão

A ação dos anti-sépticos sobre os microrganismos e os efeitos tóxicos que podem causar sobre o hospedeiro estão, entre os outros fatores, na dependência da

Tabela 5 - Atividade "in vitro" do triclosan sobre *Candida*.

Símbolos: * = Concentração Inibitória Mínima e CFM - Concentração Fungicida Mínima; ** = Estes valores representam a média aritmética de 3 determinações

Levedura	CIM e/ou CFM* g/l	% de amostras sensíveis à ação inibitória**	% de amostras sensíveis à ação fungicida**
<i>C. albicans</i>	$\leq 0,62$	12,5	
	10,00	83,3	41,7
	20,00	4,2	16,6
	$>20,00$		41,7
<i>C. guilliermondii</i>	$\leq 0,62$	20,0	
	2,50	10,0	
	5,00	10,0	
	$>20,00$	60,0	80,0
<i>C. krusei</i>	$\leq 0,62$	12,5	
	10,00	37,5	
	20,00	50,0	
	$>20,00$		100,0
<i>C. parapsilosis</i>	10,00	60,0	20,0
	20,00	40,0	
	$>20,00$		80,0
<i>C. pseudotropicalis</i>	$\leq 0,62$	25,0	
	1,25		12,5
	10,00	75,0	12,5
<i>C. tropicalis</i>	$>20,00$		75,0
	5,00	10,0	
	10,00	90,0	30,0
	$>20,00$		70,0

concentração empregada. Em consequência, a utilização dessas substâncias é recomendada em limites de concentrações consideradas seguras para aplicação sobre pele e mucosas. Variações entre esses limites podem ocorrer nas formas farmacêuticas comerciais, baseadas nas indicações terapêuticas (1, 5).

O cloreto de cetilpiridino pode ser utilizado em concentrações que variam de 1:100 a 1:10000, sendo usual, a de 1:500. Como detergente catiônico, pode ser considerado potente germicida (5). Essa potência foi evidenciada sobre as diferentes espécies de *Candida*, que sofreram ação inibitória e letal em concentrações muito abaixo da usual.

Preparações contendo hexaclorofeno (0,23 a 3,00%), reduzem sensivelmente a flora bacteriana e a incidência e gravidade de infecções piogênicas da pele. Entretanto, seu uso prolongado pode, entre outros efeitos, determinar maior frequência de candidíase (1). Neste experimento, porém, o hexaclorofeno exerceu ação inibitória e letal sobre as diferentes espécies de *Candida*, em concentrações inferiores às de preparações comerciais. Nestas condições, foi potencialmente mais ativo que o outro derivado do fenol, o triclosan. Este, apresenta propriedades similares às do

hexaclorofeno e efeitos tóxicos menos intensos (6). Utilizado em concentrações que variam de 0,05 a 2,00%, é considerado agente bacteriostático, com pequena atividade sobre fungos (9). Neste trabalho, inibiu a maior parte das leveduras em concentrações de 10,00 e 20,00g/l. Nestas concentrações, a ação fungicida predominou, apenas, sobre as amostras de *C. albicans* e *C. guilliermondii*.

O iodo, na concentração usual (2,0%), é considerado um dos germicidas cutâneos mais potentes e de menor índice de toxicidade tecidual. Em experimentos com fungos, exerceu ação letal em concentrações que variaram de 1:700 a 1:80000, dependendo do agente; espécies de *Candida*, foram sensíveis à primeira concentração (5). Estes dados são coerentes com os resultados do presente trabalho, onde, a 1,25g/l, o iodo foi letal para todas as espécies estudadas.

Os mercuriais orgânicos são considerados bacteriostáticos ativos, com pequena potência bactericida. Embora o emprego de substâncias como o merbromino, seja desaconselhado devido à sua ineficácia (5), seu uso como anti-séptico, assim como de outros mercuriais, ainda é bastante frequente em nosso meio. No atual experimento, o merbromino foi fungistático para *Candida* em concentrações inferiores à usual em preparações farmacêuticas (2,0%) e fungicida em concentrações iguais ou inferiores à esta, dependendo da espécie. Outro mercurial, o timerosal, apresentou ação inibitória e letal para as leveduras, em concentrações muito abaixo da usual (1:1000).

Para alguns autores, o permanganato de potássio é considerado potente germicida, com ação muito mais energética que outros anti-sépticos oxidantes (5). Para outros, tem efeito limitado sobre bactérias e fungos, sendo necessárias concentrações de 1:5000 ou superiores para ação bactericida. Nestas condições, é irritante para tecidos, sendo usual o emprego de soluções a 1:10000 (1). Para as espécies de *Candida*, incluídas no presente trabalho, essa substância, com raras exceções, não exerceu qualquer atividade, mesmo em concentrações tão altas quanto 1:20.

A violeta de genciana tem ação inibitória e letal sobre bactérias gram positivas e sobre vários fungos patogênicos (1, 5). Pode ser empregada em concentrações que

Tabela 6 - Atividade "in vitro" da violeta de genciana sobre *Candida*.

Símbolos: * = CIM - Concentração Inibitória Mínima e CFM - Concentração Fungicida Mínima; ** = Estes valores representam a média aritmética de 3 determinações

Levedura	CIM e/ou CFM* g/l	% de amostras sensíveis à ação inibitória**	% de amostras sensíveis à ação fungicida**
<i>C. albicans</i>	≤0,62	100,0	54,0
	20,00		4,0
	>20,00		42,0
<i>C. guilliermondii</i>	≤0,62	100,0	50,0
	5,00		10,0
	20,00		30,0
	>20,00		10,0
<i>C. krusei</i>	≤0,62	100,0	25,0
	20,00		25,0
	>20,00		50,0
<i>C. parapsilosis</i>	≤0,62	100,0	20,0
	10,00		20,0
	20,00		60,0
	>20,00		
<i>C. pseudotropicalis</i>	≤0,62	100,0	25,0
	20,00		50,0
	>20,00		25,0
<i>C. tropicalis</i>	≤0,62	100,0	10,0
	20,00		30,0
	>20,00		60,0

variam de 0,5 a 2,0%, sendo usual a de 1,0% (5). Neste experimento, mostrou-se fungistático potente, agindo em concentração inferior a 0,5%. Entretanto, a ação fungicida para 41,4% das amostras foi considerada superior a 2,0%.

O rubiazol, é classificado como quimioterápico antibacteriano e não como anti-séptico. Sua inclusão neste estudo foi de interesse, considerando-se que, algumas sulfonamidas já demonstraram ação antifúngica "in vitro" (8, 11). O rubiazol, na concentração usual (5,0%), foi fungistático para todas as espécies de *Candida*. Entretanto, esta concentração não foi suficiente para exercer ação fungicida sobre a maior parte das amostras.

Agradecimentos

À acadêmica Mara Cristina Apostólico pela colobaração prestada durante a execução deste trabalho.

Referências Bibliográficas

1. Gilman, A.G.; Goodman, L.S. & Gilman, A. - The pharmacological basis of therapeutics. 6.ed. New York, Macmillan, 1980.
2. Hejzlar, M. & Vymola, F. - Comparative study of pimarinic acid and fungicidin activity "in vitro". J. Hyg. Epidem. Microbiol. Immun., 14:211-213, 1970.
3. Holt, R.J. & Azmi, A. - Miconazole-resistant *Candida*. Lancet:50-51, 1978.
4. Lacaz, C. da S., ed. - Candidíasis. São Paulo, EPU/EDUSP, 1980.
5. Litter, M. - Farmacología. 3.ed. Buenos Aires, Ateneo, 1964.
6. Lyman, F.L. - Toxicology of 2,4,4'-trichloro-2'-hydroxidiphenil ether. Ind. Med. Surg., 38:64-71, 1969.
7. Mc Ginnis, M.R. - Laboratory handbook of medical mycology. New York, Academic Press, 1980.
8. Pellegrino, J. - Effect, in vitro, of sulphanilamide and derivates upon the development of *P. brasiliensis*. Rev. Bras. Biol., 6:73-83, 1946.
9. Reynolds, J.E.F., ed. - Martindale: the extra pharmacopoeia. 28. ed. London, Pharmaceutical Press, 1982.
10. Ryley, J.F.; Wilson, R.G. & Barret-Bee, K.J. - Azole resistance in *Candida albicans*. Sabouraudia, 22:53-63, 1984.
11. Scholer, H.J. - Sulfonamides in experimental nocardiosis, histoplasmosis, and South American blastomycosis. Chemotherapy, 13:65-80, 1968.

TESTES MICROBIOLÓGICOS E O REGISTRO DE SANIFICANTES, DESINFETANTES E ANTISÉPTICOS JUNTO A SECRETARIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA

Paulo Pinto Gontijo Filho

Instituto de Microbiologia UFRJ
Centro de Ciências da Saúde
Bloco I - Ilha do Fundão
21944 Rio de Janeiro RJ, Brasil

& Celia Maria Carvalho Pereira de Araujo Romão

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS)
Fundação Oswaldo Cruz
Caixa Postal 926
20000 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Resumo

Comentário sobre a diversidade de testes microbiológicos, para avaliação da atividade antimicrobiana de desinfetantes e sanificantes, e análise das portarias do Ministério da Saúde que cuidam do assunto no Brasil.

Summary

The evaluation of the antimicrobial activity of disinfectants, sanitizers and antiseptics and of registration of these products

Report on microbiological tests for evaluation of the antimicrobial efficacy of disinfectants, sanitizers and antiseptics. The positive and negative comments about Brazilian Health Ministry requirements for hospital use and registration of this products are also discussed.

Introdução

Os sanificantes e desinfetantes são amplamente utilizados, principalmente em ambientes hospitalares, para obter a remoção e destruição de microrganismos existentes em superfícies, equipamentos e outros materiais inanimados. Procura-se desta forma, dificultar a transmissão dos microrganismos a pacientes e profissionais de saúde susceptíveis aos mesmos. Eles constituem, juntamente com os antisépticos, um conjunto importante dentro do orçamento hospitalar e devem ser analisados para nos proporcionar a confirmação de sua ação antimicrobiana (1, 27).

Está bem estabelecido, que a análise química destes agentes não fornece informação suficiente para a avaliação de sua ação antimicrobiana, uma vez que esta não é propriedade única da composição química, sendo fortemente afetada por compatibilidades físico-químicas. Embora o ensaio químico demonstre com precisão a presença do princípio ativo, estas preparações usualmente não são soluções simples, mas sim complexas, onde a técnica de formulação influencia as propriedades germicidas dos componentes ativos. Desta maneira, é amplamente reconhecido que os testes microbiológicos, são necessários e indicados na avaliação destes agentes, permitindo verificar se o produto é realmente capaz de matar os microrganismos (5, 6, 12, 23).

Os testes para a avaliação dos desinfetantes são classificados em: preliminares, práticos e em condições de uso. Os testes preliminares ou "in vitro" são os mais tradicionais e podem ser subdivididos, de acordo com a forma de apresentação dos microrganismos, em: a) testes em suspensão, b) testes de capacidade e c) testes com carreadores.

Nos testes em suspensão, as células bacterianas, cultivadas em meio líquido, são expostas ao desinfetante e, após um período de contato estipulado, são retiradas alíquotas para subcultivo e observação de microrganismos viáveis. Como exemplos temos, os testes do Coeficiente Fenólico da Association of Official Analytical Chemists (AOAC) e o 5-5-5 do Dutch Committee on Phytopharmacy (17, 22, 23).

Nos testes de capacidade, são feitas repetidas adições da suspensão bacteriana ao desinfetante em estudo, na tentativa de simular a desinfecção na prática, quando da contaminação repetida do balde com o desinfetante no contato com o esfregão. O método mais conhecido e utilizado na Europa é o de Kelsey-Sykes (6, 23).

Os testes com carreadores preconizam o uso de objetos como cilindros de aço inoxidável ou porcelana ou fragmentos de tecido, como suporte para os microrganismos. Estes materiais são contaminados com os microrganismos-teste e colocados em contato com o desinfetante por tempo determinado e a seguir, são subcultivados para a determinação dos microrganismos sobreviventes. O exemplo mais importante desta categoria de testes é o da Diluição de Uso da AOAC (12, 23).

Cabe assinalar que em todos estes testes há uma rigorosa padronização dos meios de cultura, microrganismos-testes, condições de cultivo e do procedimento dos testes (5, 12, 23).

Os testes práticos são realizados sob condições que procuram reproduzir o seu emprego na rotina e representam um segundo estágio de avaliação. São específicos para cada tipo de aplicação a que se propõem, incluindo principalmente a desinfecção de superfícies e de instrumental médico-cirúrgico (23). Na avaliação de desinfetantes para superfícies, muitos países, como os Estados Unidos (Diluição de Uso) e Inglaterra (Kelsey-Sykes), empregam testes preliminares com esta finalidade (5). Entretanto, na Alemanha, os produtos são analisados através de testes práticos como o descrito por Reybrouck (22), que consiste numa modificação do teste da German Society for Hygiene and Microbiology. A modificação consiste no uso de lâmina de microscopia como carreador dos microrganismos, que é então impressa em meio roldado em placa de Petri, após o tratamento com o desinfetante por tempo determinado (21).

Embora seja o mais rigoroso, o teste de campo é pouco utilizado, em virtude das dificuldades de padronização para a sua execução (22, 23). É baseado no princípio de que o desinfetante para o uso em superfície ou instrumentos, não deve conter microrganismos viáveis. Um dos mais conhecidos é o de Kelsey-Maurer, no qual uma alíquota é retirada após a desinfecção de instrumental ou de um balde quando da desinfecção de pisos. Inicialmente, é feita a diluição em solução neutralizante, seguindo-se o plaqueamento para determinação dos microrganismos viáveis. Outros testes foram propostos com a mesma finalidade, como o da filtração através de membrana (4, 8).

Um dos maiores problemas encontrados na avaliação da atividade bactericida de desinfetantes e antisépticos é a neutralização da sua possível atividade bacteriostática, devida ao carregamento de resíduos do antimicrobiano para o meio de cultura, levando a falsos resultados negativos. Estes produtos devem ser neutralizados após o tempo de exposição o que pode ser realizado através de diluição, filtração ou inativação química. Os métodos de diluição e principalmente o da inativação química são os mais utilizados. Algumas substâncias germicidas (fenóis e álcoois) são rapidamente neutralizadas pela diluição, de forma a atingir níveis sub-inibitórios, enquanto outras (compostos quaternários de amônio, mercuriais orgânicos) requerem o emprego de substâncias químicas. As mais empregadas com esta finalidade são: tween 80, lecitina, histidina, lubrol W, tiossulfato de sódio, tioglicolato de sódio, em soluções simples ou misturas, variando de acordo com o germicida a ser neutralizado (24, 25).

Um desinfetante hospitalar só pode ser registrado nos Estados Unidos se mostrar atividade através do teste de Diluição de Uso contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis* e *Pseudomonas aeruginosa* (5). O acréscimo de outras propriedades tais como, ações fungicidas, tuberculocida, esporocida ou virucida, deve ser

documentado através de testes específicos (10).

O sanificante por sua vez, e definido como um agente que reduz o número de bactérias contaminantes a níveis considerados seguros para a saúde pública. Este agente está intimamente associado com a indústria de alimentos e com a limpeza, de maneira geral. Na opinião de alguns autores (11), o termo sanificante deve ser substituído, no hospital, por desinfetante de baixo nível (26). Desta maneira, seria um produto que não tem atividades esporicida, fungicida, tuberculocida ou capacidade de inativar os vírus não envelopados (vírus da pólio). Os dois microrganismos empregados para testar os sanificantes, nos Estados Unidos, são *S. aureus* e *E. coli*, expostos em suspensões contendo aproximadamente 10^9 microrganismos/ml. O sanificante em contato por 30 segundos, com uma alíquota da suspensão microbiana, em condições rigorosamente padronizadas, e cultivado em meio contendo neutralizante, deve reduzir 99,999% dos microrganismos, deixando portanto menos de 1.000 microrganismos viáveis (11).

Como a ação dos desinfetantes pode ser limitada pela presença de sujeira, a desinfecção pode e deve ser combinada com limpeza ou precedida por esta. A combinação de um detergente com um agente tenso-ativo possibilita melhor penetração e atividade antimicrobiana mais rápida (7, 10, 11).

Em relação aos antisépticos, a situação é um pouco mais complexa, pela ocorrência de múltiplas utilizações, tais como: lavagem cirúrgica das mãos, lavagem higiênica das mãos, sabões medicinais, curativos cirúrgicos, aplicação em mucosas, limpeza de pele, aplicação em ferimentos, etc. Existem testes "in vitro" padronizados, pelos quais podem ser verificadas as ações bacteriostática e bactericida contra microrganismos-teste representativos. Ainda não existe um consenso em relação aos testes "in vivo", mas existem vários bem aceitos por especialistas (2, 16).

Os registros dos desinfetantes são regulamentados, em vários países, por órgãos federais ou entidades que controlam, estabelecem especificações e determinam os métodos microbiológicos para a avaliação destes produtos. Na Alemanha, a DGHM recomenda diversos métodos e normas para a inclusão de desinfetantes na chamada "lista de desinfetante testados e considerados eficazes". Na França, a AFNOR também estipula métodos microbiológicos para analisar desinfetantes. Nos Estados Unidos, estes produtos são controlados e regulamentados pela "United States Environmental Protection Agency (EPA)", que recomenda o emprego do método da Diluição de Uso da AOAC para desinfetantes de superfícies de uso limitado, hospitalar ou geral (5).

No Brasil, a regulamentação destes produtos está a cargo do Ministério da Saúde, através da Divisão de Saneantes Domissanitários (DISAD), que cuida dos sanificantes e desinfetantes, e da Divisão de Medicamentos (DIMED), responsável pela normatização dos antisépticos. Em termos de legislação foi aprovada uma portaria do Ministério da Saúde (Número 196, de 24 de junho de 1983), voltada para o problema de combate às infecções hospitalares, cujo anexo V (Normas para seleção de germicidas em hospitais) destina-se a promover a seleção de germicidas em concentrações adequadas (19). Apesar das considerações feitas nos parágrafos anteriores, contrariando toda literatura existente, esta portaria diz que "a composição dos produtos deverá ser comprovada mediante cópia da fórmula licenciada pela DISAD", ignorando-se a necessidade de comprovação da eficácia destes produtos através de testes microbiológicos. No entanto, uma nova portaria do Ministério da Saúde (Número 67, de 21 de fevereiro de 1985) sobre normas para registro de saneantes domissanitários com ação antimicrobiana vem reparar esta falha (20). Ela classifica o desinfetante hospitalar em: para superfícies fixas e para objetos e equipamentos, sendo os do primeiro grupo destinados à áreas críticas e semi-críticas no hospital. Ele deve possuir atividade tuberculocida (*M. smegmatis* e *M. bovis* BCG) e fungicida (*T. mentagrophytes*), além de ser microbicida para *S. aureus*, *S. choleraesuis* e *P. aeruginosa*. A portaria também determina que é função do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCCQS), da Fundação Oswaldo Cruz, a realização de testes para a comprovação da ação antimicrobiana. Através do Manual Técnico do INCCQS (15) verifica-se que foram adotados em linhas gerais, as técnicas da AOAC.

A propósito de normas nesta área, vale a pena salientar a guisa de informação que uma das principais fontes de orientação das Comissões de Controle de Infecções Hospitalares é o "Centers for Disease Control Guidelines for the Prevention and Control of Nosocomial Infections", e que tem publicado até o momento os seguintes tópicos

(3): prevenção de infecções urinárias associadas a catéteres; controle do ambiente hospitalar, antisépticos e lavagem de mãos, limpeza, desinfecção e esterilização de equipamento, vigilância microbiológica de ambiente e de pessoal hospitalar, lavanderia, lixo, unidades de tratamento intensivo, farmácia; prevenção de infecções intravasculares; prevenção de infecções cirúrgicas; prevenção de pneumonias nosocomiais; precauções com isolamento e precauções com a saúde de funcionários. Entretanto, o D. James Hughes, diretor do Hospital Infections Program, Center for Infections Diseases, Centers for Disease Control, reconhece que, devido ao contínuo desenvolvimento no campo do controle e prevenção das infecções hospitalares, que os hospitais não devem usar o "CDC Guidelines" como uma fonte de consulta atualizada, pois substâncias germicidas agora disponíveis não existiam quando o manual foi preparado ou que outras disponíveis tornaram-se inapropriadas, como aconteceu com os produtos à base de hexaclorofeno (18). A sugestão deste eminente profissional é que as Comissões ou os responsáveis pela seleção de produtos contendo ingredientes antimicrobianos devem se orientar por laudos fornecidos pela EPA (desinfetante e sanificantes) e FDA (antisépticos) sobre as indicações para uso. Também devem considerar informações mais recentes publicadas na literatura científica que tenha tradição ou em testes realizados pelo próprio laboratório do hospital, quando este tem condições e recursos para tal, na decisão quanto a escolha de um produto (13).

Os programas de controle de infecção nos hospitais americanos passaram a ser exigidos a partir de 1976, resultando numa redução significativa nas taxas de infecção, e quando, de uma análise de custos-benefícios, numa economia importante para os hospitais (9). Este trabalho tem sido conduzido e/ou influenciado por vários organizações governamentais e de classe, com destaque para as seguintes: Joint Commission on Accreditation of Hospitals, Health Care Financing Administration, Food and Drug Administration, Environmental Protection Agency, Centers for Disease Control, Local and State Health Departments, American Academy of Pediatrics, American College of Surgeons, American Hospital Association, Association of Operating Room Nurses, Association for Practitioners in Infection Control e a American Society for Microbiology, e deveria servir de exemplo para os países como o Brasil, que estão começando a trabalhar nesta área (14).

Este trabalho visa contribuir para uma reflexão em relação a avaliação de desinfetantes, sanificantes e antisépticos e a sua importância na prevenção e controle de infecções hospitalares, assuntos nos quais, não temos tradição de pesquisa e, portanto, não podemos ainda recorrer à experiências bem idealizadas e desenvolvidas no nosso meio.

Referências Bibliográficas

1. Ayliffe, G.A.J. & Collins, B.J. - Problems of disinfection in hospitals. In: - Russell, A.D.; Hugo, W.B. & Ayliffe, G.A.J., eds. - Principles and practice of disinfection, preservation and sterilisation. London, Blackwell Scientific Publications, 1982.
2. Bruch, K.K.-Methods of testing antiseptics-antimicrobials used topically in humans. In: - Block, S.S, ed. - Disinfection, sterilization, and preservation. 3.ed. Philadelphia, Lea & Febiger, p.946, 1983.
3. Centers For Disease Control - Guidelines for the prevention and control of nosocomial infections: hospital infections program. Atlanta, U.S. Department of Health and Human Services, 1981.
4. Christensen, E.A.; Jepsen, O.B.; Kristensen, H. & Steen, G. - Inuse test for disinfectants. Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B, 90:95-100, 1982.
5. Crémieux, A. & Fleurette, J. - Methods of testing disinfectants. In: - Block, S.S., ed. - Disinfection, sterilization and preservation. 3.ed. Philadelphia, Lea & Febiger, p.918, 1983.
6. Croshaw, B. - Disinfectant testing-with particular reference to the Rideal-Walker and Kelsey-Sykes test. In: - Collins, E.H.; Allwood, M.C.; Bloomfield, F. & Fow, A., eds. - Disinfectants: their use and evaluation of effectiveness. London, Academic Press, p.1, 1981.
7. Dewar, N.E. - Disinfectants, sanitizers, and antiseptics. In: - Sonnenwirth, A.C., & Jaret, C., eds. - Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis. 7.ed. Saint Louis, CV Mosby, p.1429, 1970.

8. Dupre, M. - Investigations on the efficacy of surfaces disinfection and surface cleaning procedures. I - Tests under real-life condition. *Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. Orig. B*, 160:551-567, 1975.
9. Garner, J.S. & Emori, T.G. - Nosocomial infection surveillance and control. In: - Lennette, E.H.; Balows, A.; Hausler Jr., W.J. & Shadomy, H.J., eds. - *Manual of clinical microbiology*. 4.ed. Washington, DC, American Society for Microbiology, p.105, 1985.
10. Groschel, D.H.M. - Hospital disinfectants and antiseptics. In: - Seligson, D., eds. - *Handbook series in clinical laboratory science*. Cleveland, CRC Press, p.393, 1977.
11. Groschel, D.H.M. - Sterilization, disinfection and antiseptics. In: - Sonnenwirth, A.C. & Jaret, L., eds. - *Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis*. 8.ed. Saint Louis, CV Mosby, p.978, 1980.
12. Horwitz, W. - Official methods of analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. 13.ed. Washington, DC, Association of Official Analytical Chemists, 1980.
13. Hughes, J.M. - Revision of the CDC guidelines for the prevention and control of nosocomial infections: letter, 1983.
14. Hughes, J.M. & Jarvis, W.R. - Epidemiology of nosocomial infections In: - Lennette, E.H.; Balows, A.; Hausle Jr., W.J. & Shadomy, H.J., eds. - *Manual of clinical microbiology*. 4.ed. Washington, DC, American Society for Microbiology, p.99, 1985.
15. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCCS) - Manual técnico nº 04/85 - Técnicas para controle de qualidade: avaliação da atividade antimicrobiana de saneantes domissanitários. Rio de Janeiro, Fundação Oswaldo Cruz, 1983.
16. Lowbury, E.J.L. - Special problems in hospital antiseptics. In: - Russel, A.D.; Hugo, W.B. & Ayliffe, G.A.J., eds. - *Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*. London, Blackwell Scientific Publications, p.262, 1982.
17. Klingerren, B.; Leussink, A.B. & Van Wyngaarden, L.J. - A collaborative study on the repeatability and reproducibility of the Dutch Standart Suspension test for the evaluation of disinfectants. *Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. Orig. B*, 164:521-548, 1972.
18. Martin-Bouyer, G.; Lebreton, R.; Toga, M.; Stolley, O.D. & Lockhart, J. - Outbreak of accidental hexachlorophene poisoning in France. *Lancet*, i:91-95, 1982.
19. Ministério da Saúde - Portaria nº96. Diário Oficial, Seção 1/1319, 1983.
20. Ministério da Saúde - Portaria nº67. Diário Oficial, Seção 1/3181, 1985.
21. Reybrook, G. - Evaluation des propriétés bactericides de désinfectants de surface. *Hospitalia*, 17:168-173, 1973.
22. Reybrook, G.A. - Theoretical approach on disinfectant testing. *Zbl. barkt. Hyg. J. Abt. Orig. B*, 160:342-367, 1975.
23. Reybrook, G. - The evaluation of the antimicrobial activity of disinfectants. In: - Russel, A.D.; Hugo, W.B. & Ayliffe G.A.J., eds. - *Principles and practice of disinfection preservation and sterilization*. London, Blackwell Scientific Publications, p.134, 1982.
24. Russel, A.D. - Neutralization procedures in the evaluation of the inactivation of antibiotics and other antimicrobial agents. *J. Appl. Bact.*, 46:207-245, 1979.
25. Russel, A.D.; Akonkhai, I & Rogers, D.T. - Microbiological applications of the inactivation of antibiotics and other antimicrobial agents. *J. Appl. Bact.*, 46:207-245, 1979.
26. Spaulding, E.H.; Cundy, K.R. & Turner, F.J. - Chemical disinfection of medical and surgical materials. In: - Block, S.S., ed. - *Disinfection, sterilization and preservation*. 2.ed. Philadelphia, Lea & Febiger, p.154, 1977.
27. Underwood, E. - Good manufacturing practice. In: - Russel, A.D.; Hugo, W.B. & Ayliffe, G.A.J., eds. - *Principles and practice for disinfection, preservation and sterilization*. Boston, Blackwell Scientific Publications, p.221, 1982.

EFICÁCIA DO TRATAMENTO QUÍMICO E TÉRMICO NA DESTRUIÇÃO DE PATÓGENOS EM LODO DIGERIDO*

Maria Therezinha Martins

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

Petra S. Sanchez
& Elizabeth Marques

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
Av. Prof. Frederico Hermann Jr., 345
05459 São Paulo SP, Brasil

Resumo

Amostras de lodos de esgoto digeridos, submetidas a tratamento químico (cloreto férrico e cal) e a tratamento térmico (50°C a 115°C durante 5 a 15 minutos), foram analisadas quanto à presença de indicadores convencionais de poluição fecal e patógenos. Amostras de lodos digeridos brutos apresentaram alta incidência de indicadores e patógenos. Após tratamento químico obteve-se redução de até 99,9% de coliformes fecais, 99,6% de estreptococos fecais, 98,7% de salmonelas, e 99,6% de ovos de helmintos. O tratamento térmico foi menos eficiente para eliminação de bactérias e de ovos de helmintos. Enterovírus foram totalmente inativados no tratamento térmico, porém no tratamento químico, somente quando o pH atingiu valor 12,0 ou superior.

Summary

Efficacy of chemical and thermic treatment for pathogens destruction in digested sludge

Samples of digested sludge submitted to chemical treatment (ferric chloride and lime) and thermic treatment (50°C to 115°C during 5 to 15min.) were analysed for the presence of conventional indicators of fecal pollution and pathogens. Samples of raw digested sludges presented high incidence of indicators and pathogens. After chemical treatment it was obtained removal of up to 99.9% of fecal coliforms, 99.6% of fecal streptococci, 98.7% of salmonellae, and 99.6% of helminth eggs. The thermic treatment was less efficient in the removal of bacteria and helminth eggs. Enterovirus were totally inactivated in the thermic treatment but, in the chemical treatment, only when pH values were 12.0 or higher.

* Dados apresentados no I Simpósio Latinoamericano sobre Produção de Biogás a partir de Resíduos Orgânicos, São Paulo, 6 a 17 de dezembro de 1982. Painel: Biogás - Pesquisa e aplicação: perspectivas.

Introdução

O grande volume de lodos de esgotos, gerados pelos processos de tratamento, constitui-se em sério problema para administração dos serviços públicos, em relação às decisões sobre sua disposição final.

Foi estimado que apenas a etapa de disposição final dos lodos consome 30 a 40% dos custos de uma Estação de Tratamento (23).

Uma alternativa, para diminuir o custo, é a disposição dos lodos no solo, pois têm importante papel no seu condicionamento para fins agrícolas.

No entanto, umas das grandes limitações do uso de lodos de esgotos no solo, é a presença de patógenos.

Vários autores têm relatado a presença, em lodos digeridos, de uma diversidade de organismos patogênicos, muitos dos quais podem apresentar elevada resistência aos processos de tratamento e persistir durante longos períodos de tempo no solo (1-4, 6, 9-13, 15-28, 22).

A concentração de contaminantes biológicos, nos esgotos domésticos, é influenciada por fatores como idade, condições de saúde da população contribuinte e estações do ano.

Embora não haja casuística, relacionando processos infecciosos resultantes da aplicação de lodos contaminados no solo, o risco potencial é evidenciado pelo isolamento de patógenos (13).

Apresentaremos resultados obtidos na caracterização biológica de lodos de uma Estação de Tratamento de Esgotos de São Paulo (ETE), bem como de lodos submetidos a tratamento térmico e químico.

Material e Métodos

Amostras e amostragem - Em 1981, no período de março a novembro, foram colhidas 67 amostras de lodos de esgoto da ETE de Vila Leopoldina, São Paulo, das seguintes procedências:

- a) lodo digerido, na saída do biodigestor;
- b) lodo centrifugado, na saída da esteira;
- c) lodo prensado, lodo digerido submetido a tratamento químico, com cloreto férrico e cal. Para cada 200ℓ de lodo digerido foram adicionados 6ℓ de solução de cloreto férrico a 7,5%. Após homogeneização durante 30 minutos foram acrescentados 6 litros de solução de cal ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) a 30%, a mistura foi submetida à agitação durante 30 minutos e a seguir foi realizada a prensagem (este tratamento foi realizado por técnicos da SABESP);
- d) lodo fluidizado, lodo digerido submetido ao tratamento térmico (50°C a 115°C, durante 5 a 15 minutos). Neste caso, duas condições foram consideradas: i. amostras colhidas diretamente do pátio de secagem onde não se conhecia o tempo de estocagem e, ii. amostras mantidas no pátio de secagem durante 30 dias.

As coletas foram realizadas em intervalos mensais. No primeiro período, de março a agosto, as amostras sólidas e semi-sólidas foram colhidas ao acaso, no volume final de 6kg, e as amostras de lodo digerido, no volume de 6ℓ.

No 2º período, de setembro a novembro, as amostras, com exceção do lodo digerido, foram colhidas por processo de quarteamento retirando-se alíquotas de diferentes porções do produto em estudo, e compondo uma amostra final de 6kg, que era homogeneizada antes da realização dos exames microbiológicos e parasitológicos.

As condições de operação do biodigestor como, temperatura, tempo de retenção e carga inicial de patógenos não foram registradas, uma vez que neste estudo foram considerados os processos de tratamento de lodo após a digestão.

Metodologia das análises microbiológicas e parasitológicas - *Coliformes totais e fecais, estreptococos fecais e Salmonella* - As determinações do NMP/100g (peso seco) de coliformes totais e fecais, estreptococos fecais e *Salmonella*, foram realizadas segundo métodos descritos no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 15.ed. (2), e Physical Chemical and Microbiological Methods of Solid Waste Testing (3).

Tabela 1 - Coliformes, estreptococos fecais e *Salmonella* spp. em lodo de esgoto - média geométrica por 100g (peso seco)

Amostra		Microrganismos			
		Coliformes totais	fecais	Estreptococos fecais	<i>Salmonella</i> spp.
Lodo digerido	1º Período \bar{x}	$1,1 \times 10^8$	$1,8 \times 10^6$	$1,1 \times 10^5$	160,0
	2º Período \bar{x}	$6,2 \times 10^7$	$1,5 \times 10^6$	$9,5 \times 10^5$	56,0
Lodo prensado	1º Período \bar{x}	$1,1 \times 10^5$	$9,1 \times 10^2$	$4,1 \times 10^3$	2,0
	2º Período \bar{x}	$2,2 \times 10^5$	708	$1,3 \times 10^5$	2,0
Lodo centrifugado	1º Período \bar{x}	$1,9 \times 10^8$	$4,6 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$	10,9
	2º Período \bar{x}	$7,2 \times 10^7$	$6,6 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$	11,0
Lodo fluidizado (após 30 dias)	1º Período \bar{x}	$1,4 \times 10^6$	$2,2 \times 10^4$	$1,3 \times 10^5$	7,7
	2º Período \bar{x}	$2,2 \times 10^6$	$6,9 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$	4,0
Lodo fluidizado (amostras comuns)	1º Período \bar{x}	$2,6 \times 10^7$	$3,6 \times 10^5$	$8,1 \times 10^5$	47,8
	2º Período \bar{x}	$4,5 \times 10^8$	$5,9 \times 10^7$	$2,1 \times 10^7$	115,0

Enterovírus - Para a concentração de enterovírus foi utilizado o método tentativo da EPA (comunicação pessoal do W. Jakubowski - USEPA) com as seguintes modificações: às amostras foi adicionado extrato de carne 10%, pH 7,0, a mistura foi centrifugada a 4000rpm e submetida ao método de floculação orgânica (8). Após concentração as amostras foram submetidas ao teste de esterilidade e toxicidade e inoculadas em culturas de células (BS-C-1). Para isolamento e quantificação dos enterovírus foi utilizado o método de plaqueamento (7) e a identificação foi realizada utilizando-se "pools" de anti-soros específicos (14).

Ovos de helmintos e protozoários - Para a detecção de cistos de protozoários e ovos leves de helmintos foi utilizado o método de Faust e col., e, para ovos pesados o método de Hoffman Pons & Jones, recomendados por Pessoa (19).

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos no 1º período de estudo, quando analisados individualmente revelaram algumas discrepâncias que foram minimizadas quando a amostragem por quartamento foi adotada, possibilitando a obtenção de amostras mais representativas do material em estudo.

Coliformes e estreptococos fecais - Altos índices de coliformes e estreptococos fecais foram encontrados nas amostras examinadas de lodo digerido e centrifugado (Tabela 1). O comportamento destes indicadores, faces aos dois tratamentos, está representado na Tabela 3. Nas amostras de lodo digerido, após tratamento químico (lodo prensado), ocorreu redução bastante significativa de coliformes fecais (99,9%), enquanto que a de estreptococos fecais foi inferior: 99,6% no 1º período e 86,3% no 2º período. Isto vem demonstrar que os estreptococos fecais foram mais resistentes que os coliformes ao tratamento aplicado. Em recente revisão, nos Estados Unidos da América do Norte (18), foi relatada a ocorrência de fato similar.

As amostras de lodo fluidizado (após 30 dias), apresentaram altas densidades de coliformes e estreptococos fecais, entretanto, quando comparados com os resultados de lodo centrifugado, verificou-se significativa redução no número desses microrganismos.

No 2º período de estudo ocorreu um aumento acentuado de coliformes totais 205,5%; aumento de 4,5% para coliformes fecais e 27,3% para estreptococos fecais. Provavelmente isto seja devido ao crescimento destes indicadores, durante a estocagem no pátio.

Dados na literatura (18) relatam a ocorrência deste fato, pois tem-se observado que esses microrganismos podem se desenvolver em amostras de lodo, mesmo após tratamento.

Tabela 2 - Frequência de *Salmonella* spp. em amostras de lodos.

Símbolos: 1º Per. = Primeiro período (março a agosto);
2º Per. = Segundo período (setembro a novembro)

Amostra	Nº de amostras examinadas		Amostras positivas			
			Nº		%	
	1º Per.	2º Per.	1º Per.	2º Per.	1º Per.	2º Per.
Lodo digerido	7	5	6	5	85,7	100,0
Lodo centrifugado	7	6	6	6	85,7	100,0
Lodo prensado	7	5	1	1	14,2	20,0
Lodo fluidizado (após 30 dias)	6	6	3	6	50,0	100,0
Lodo fluidizado (amostras comuns)	13	5	12	5	92,3	100,0

Tabela 3 - Porcentagem da redução de coliformes, estreptococos fecais, *Salmonella* e ovos de helmintos nos tratamentos químico e térmico:

Símbolos: * = Porcentagem de aumento

Organismos	Lodo prensado		Lodo fluidizado (após 30 dias)	
	% em relação ao lodo digerido		% em relação ao lodo centrifugado	
	1º Per.	2º Per.	1º Per.	2º Per.
Coliformes totais	99,9	99,6	99,2	205,5*
Coliformes fecais	99,9	99,9	99,5	4,5*
Estreptococos fecais	99,6	86,3	96,7	27,3*
<i>Salmonella</i> spp.	98,7	96,4	29,3	63,6
Total de ovos de helmintos	99,6	99,4	96,4	94,9

Salmonella - As bactérias do gênero *Salmonella* constituem um excelente indicador, juntamente com os coliformes fecais e estreptococos fecais, para estudos de lodos de esgotos pois são encontrados em quantidades significativas (10, 15, 20) e apresentam elevada resistência aos processos de tratamento e sobrevivência no meio ambiente (5, 10).

No presente estudo, foi observada grande variabilidade dos teores de *Salmonella* spp. nas amostras de lodos digeridos, sendo que o NMP/100g (peso seco) variou de <40 a 2700. A porcentagem de amostras positivas foi de 85,7% (no 1º período) e 100% (no 2º período) (Tabela 2). Os resultados são concordantes com dados da literatura (9, 10, 20).

Salmonella foi isolada em apenas duas das doze amostras de lodo prensado. Nestas amostras o pH foi de 7,9 e 8,3, portanto o tratamento aplicado não foi o adequado, pois não atingiu o nível ideal (pH 12,0), que é o proposto para eliminar estes patógenos.

Quando o pH 12 foi mantido no tratamento químico, houve eliminação de *Salmonella*. Resultados similares foram obtidos por Strauch (20) e Lewin (10), que conseguiram remoção de 100% de *Salmonella* e vírus presentes em lodos submetidos a pH 12,0 ou superior.

Nas amostras de lodo coletado após 30 dias de secagem e submetido ao leito fluidizado, não ocorreu redução significativa de *Salmonella*. Em algumas amostras a temperatura não foi suficiente para eliminação deste patógeno. A faixa de variação de temperatura foi muita ampla (50 a 115°C) e o tempo de contato foi de 5 a 15

minutos, não tendo sido determinada a temperatura, por ocasião da coleta de cada amostra. Nas amostras de lodo fluidizado, armazenadas no pátio de secagem, a frequência de *Salmonella* foi elevada (92,3% a 100% de amostras positivas).

Duas hipóteses podem ser feitas: houve condições de multiplicação de salmonelas presentes ou ocorreu re-contaminação, pois este lodo era mantido próximo ao lodo centrifugado. Este fato deverá ser melhor estudado.

Tabela 4 - Ovos de helmintos e protozoários em amostras de lodo de esgoto - média geométrica/100g (peso seco)

Símbolos: A = Ausente

Amostras		<i>Ascaris lumbricoides</i>	<i>Ancylostomidae</i>	<i>Hymenolepis diminuta</i>	<i>Trichocephalus trichiurus</i>	<i>Toxocaris leonina</i>	<i>Toxocara sp.</i>	Protozoários	Total de ovos de helmintos
Lodo digerido	1º Per. \bar{x}	14670	647	125	194	81	6	A	16303
	2º Per. \bar{x}	22900	692	616	692	275	5	A	25703
Lodo prensado	1º Per. \bar{x}	55	A	3	2	1	A	A	56
	2º Per. \bar{x}	151	1	A	5	2	A	A	162
Lodo centrifugado	1º Per. \bar{x}	5537	43	132	67	37	20	A	6093
	2º Per. \bar{x}	6310	224	129	331	35	6	A	7413
Lodo fluidizado (após 30 dias)	1º Per. \bar{x}	204	2	5	19	8	A	A	218
	2º Per. \bar{x}	309	A	2	22	18	2	A	380
Lodo fluidizado (amostras comuns)	1º Per. \bar{x}	230	2	2	7	2	A	A	240
	2º Per. \bar{x}	347	A	2	26	1	A	A	380

Ovos de helmintos e cistos de protozoários - Verificou-se que o lodo digerido e o centrifugado apresentaram elevada quantidade de ovos de helmintos, tendo havido predominância de ovos de *Ascaris* (Tabela 4). O elevado número de ovos de *Ascaris* encontrado deve-se à alta incidência na população e à elevada resistência, no meio exterior.

A presença de ovos de *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e *Taenia sp.*, em lodos de esgotos, utilizados como fertilizantes poderia constituir um fator de disseminação de parasitas pois os ovos são altamente resistentes às agressões do meio externo, inclusive a dessecação (1).

A elevada resistência de ovos de helmintos, especialmente de *Ascaris*, frente aos vários processos de tratamento de lodo de esgoto, tais como altas temperaturas, reagentes químicos e dessecação é comumente relatada na literatura (5, 6, 11, 20). Cistos de protozoários não foram detectados em nenhuma das amostras examinadas.

A incidência de helmintos e protozoários nos Estados Unidos e vários países da Europa é relativamente pequena, entretanto, nas regiões tropicais, esses parasitas podem se constituir em problema sanitário em lodos de esgotos, dada à sua resistência (6).

Nas amostras de lodo prensado, verificou-se redução bastante significativa de ovos de helmintos, 99,6% no 1º período e 99,4% no 2º período. Este achado vem de encontro com os dados citados por Pederson (18) e Strauch (20), que relatam experimentos com lodos de digestores utilizando cal e pH acima de 12, onde foi possível a inativação de ovos de *Ascaris*, citando porém que isto não ocorreu em todas as amostras.

Nas amostras de lodos submetido ao tratamento térmico ocorreu significativa redução de ovos de helmintos, quando comparados com as de lodo digerido e centrifugado. Entretanto, não se conseguiu a inativação total. Ao que tudo indica, isto foi devido às dificuldades apresentadas na manutenção da temperatura adequada.

Enterovírus - A presença de vírus em lodos de esgoto é motivo de preocupação pelo risco à saúde pública, principalmente devido à probabilidade da contaminação indireta de águas superficiais e subterrâneas. Portanto, a escolha de um bom método de tratamento é essencial antes da disposição no solo.

Tabela 5 - Isolamento de enterovírus nas diferentes etapas do processo de tratamento de lodos de esgoto

Amostras	Nº de amostras testadas	Nº de amostras positivas	% de positividade
Lodo digerido	12	11	91,6
Lodo centrifugado	12	11	91,6
Lodo prensado	12	3	25
Lodo fluidizado (após 30 dias)	12	0	0
Lodo fluidizado (amostras comuns)	18	0	0

Das 12 amostras de lodo digerido analisadas, 11 revelaram enterovírus. O mesmo ocorreu no lodo centrifugado, com 91,6% das amostras positivas para enterovírus. Esses resultados estão concordantes com os citados na literatura, para lodo digerido (5, 9, 12).

Do lodo digerido e centrifugado, foram isolados Poliovírus tipos 1, 2 e 3, Echo 7 e 20 e Coxsackie B₁, B₂, B₄ e B₆.

No lodo prensado, o tratamento químico foi eficaz na remoção total (100%) de enterovírus, sempre que pH 12 ou superior foi mantido. Em 3 amostras com pH 7,9, 8,3 e 9,4, foram isolados Poliovírus tipos 2 e 3 e Coxsackie B₄. Vários pesquisadores têm relatado fato semelhante onde a inativação de vírus é obtida através do tratamento químico e em condições de pH elevado (9, 20, 21).

No lodo fluidizado não se detectou nenhuma partícula viral, sendo portanto o tratamento aplicado bastante eficiente na inativação de enterovírus (Tabela 5). Estes resultados vêm de encontro aos obtidos por vários autores, pois os vírus não resistem ao dessecação e à alta temperatura (20, 24).

Conclusão

Lodos de esgotos provenientes de digestores que operam na fase mesófila apresentam alta carga de contaminantes biológicos e podem se constituir em fator de disseminação de uma série de doenças se não forem tratados ou dispostos adequadamente.

O tratamento químico ou térmico pode contribuir para a diminuição da carga de patógenos nestes lodos. No entanto, deverão ter sua eficácia avaliada, frente a parâmetros biológicos.

No estudo realizado, *Salmonella* e ovos de helmintos, principalmente de *Ascaris*, foram evidenciados como bons indicadores para avaliação da eficácia de processos de tratamento de lodos na remoção de patógenos.

Agradecimentos

À CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental), IPT (Instituto de Pesquisas Tecnológicas) e SABESP (Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo) pelo apoio e permissão para divulgação destes resultados.

Referências Bibliográficas

1. Amaral, A.D.F. & Leal, R.A. - Sobre o encontro de ovos viáveis de *Ascaris lumbricoides* e de *Trichiurus trichiura* em adubo constituído de resíduos de esgotos. Rev. Biol. Hig., 11:35-39, 1940.
2. American Public Health Association - Standard methods for the examination of water and wastewater. 15.ed. New York, APHA/AWWA, 1980.
3. Bender, D.F.; Peterson, M.L. & Stierli, H., eds. - Physical chemical and microbiological methods of solid waste testing. Washington, D.C., Environmental Protection Agency, (EPA-6700-73-01), 1973.

4. Burge, W.D. & Marsh, P.B. - Infectious disease hazards of landspreading sewage wastes. *J. Environ. Qual.*, 7:1-9, 1978.
5. Burge, W.D. & Parr, J.F. - Hazards and fate of pathogens in sewage sludge amended soils. In: - Annual Conference of Applied Research and Practice on Municipal and Industrial Waste, 1, Madison, Wi, 1978: Proceedings.
6. Hays, B.D. - Potential for parasitic disease transmission with land application of sewage plant effluents and sludges. *Water Res.*, 11:583-595, 1977.
7. Hsiung, G.D. & Melnick, J.L. - Morphologic characteristics of plaques produced on monkey kidney monolayer cultures by enteric viruses (poliomyelitis, Coxsackie and ECHO groups). *J. Immunol.*, 78:128-136, 1957.
8. Katzenelson, E.; Fattal, B. & Hostovesky, T. - Organic flocculation: an efficient second-step concentration method for the detection of viruses in tapwater. *Appl. Environ. Microbiol.*, 32:638-639, 1976.
9. Larkin, E.P.; Tierney, J.T.; Lovett, J.; Van Donsel, D.E. & Francis, D.W. - Land application of sewage wastes: potential for contamination of foodstuffs and agricultural soils by viruses and bacterial pathogens. Cincinnati, Bureau of Foods, Food and Drug Administration, Division of Microbiology, 1979.
10. Lewin, V.H.; Jones, P.W. & Redhead, D.L. - The fate of bacterial pathogens in sewage treatment processes. *Water Pollut. Control*, 80:42-53, 1981.
11. Liebmann, H. - Parasites in sewage and the possibilities of their extinction. In: - Utilization of municipal wastewater sludge. Washington, D.C., Water Pollution Control Federation, (WPCF Manual of Practice No. 2), 1971.
12. Lund, E. & Ronne, V. - On the isolation of virus from sewage treatment plant sludges. *Water Res.*, 7:863-871, 1973.
13. Meyer, K.B.; Miller, K.D. & Kaneshiro, E.S. - Recovery of *Ascaris* eggs from sludge. *J. Parasitol.*, 64:380-383, 1978.
14. Melnick, J.L.; Rennick, V.; Hampil, B.; Schmidt, N.J. & HO, H.H. - Lyophilized combination pools of enterovirus equine antisera: preparation and test procedures for the identification of field strains of 42 enteroviruses. *Bull. World Hlth. Org.*, 48:263-268, 1973.
15. Menzies, J.D. - Pathogen considerations for land application of human and domestic animal wastes. In: - Soils for management of organic wastes and wastewaters. Beltsville, Maryland, American Society of Agronomy, p.575-585, 1977.
16. Murray, H.M. - The incidence of *Ascaris* ova in Pretoria sludge and their reduction by storage (maturation) in large heaps. *J. & Proc. Inst. Sewage Purification*, 3:337-342, 1960.
17. Parr, J.F.; Epstein, E. & Willson, G.B. - Composting of sewage sludge for utilization as a fertilizer and soil conditioner. FAO/SIDA Workshop on the Use of Organic Materials as Fertilizers in Asia, 1976.
18. Pederson, D.C. - Density levels of pathogenic organisms in municipal wastewater sludge: literature review. Washington, D.C., Environmental Protection Agency, (EPA-600/52-81-170), 1981.
19. Pessoa, S.B. - *Parasitologia médica*. Rio de Janeiro, Guanabara, 1954.
20. Strauch, D. - Experiences with low and high technology methods for disinfection of municipal sewage sludges. In: - Canada/Germany Wastewater Treatment Technology Exchange Workshop, 19, Ontario, 1979: Proceedings.
21. Sattar, S.A. & Westwood, J.C.N. - Calcium hydroxide (lime) and the elimination of human pathogenic viruses from sewage: studies with experimentally contaminated (poliovirus type 1, Sabin) and pilot plant samples. *Can. J. Public Hlth.*, 67:221-226, 1976.
22. Sagik, B.P.; Moore, B.E. & Sorber, C.A. - Human enteric virus survival in soil following irrigation with sewage plant effluents. Cincinnati, Environmental Protection Agency, 1980 (EPA 600/1-80-004).
23. Vesilind, P.A. - Treatment and disposal of wastewater sludges. Ann Arbor, Science Publ., 1974.
24. Ward, R.L. & Ashley, G.S. - Inactivation of enteric viruses in wastewater sludge through dewatering by evaporation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 34:564-670, 1977.

OPERAÇÃO DE BIODIGESTOR ANAERÓBIO EM ESCALA DE BANCADA PARA A PRODUÇÃO DE BIOGÁS A PARTIR DE SORO DE LEITE

Euclides Honório de Araújo
Giovani Salviano Melo
& Ivanir de Oliveira Júnior

Depto. de Engenharia Química
Centro de Ciências Exatas e Tecnologia da UFU
Caixa Postal 593
38400 Uberlândia MG, Brasil

Resumo

A partir de um inóculo de estrume de gado mantido em anaerobiose, conseguiu-se produzir biogás a partir de soro de leite. A produção de biogás iniciou-se logo após a colocação do soro de leite, que foi devidamente diluído. A carga aplicada máxima foi de 1,8g de sólidos voláteis por litro de reator. Os tempos de retenção hidráulico estudados foram de 20 dias e 30 dias e a temperatura mantida em 36°C. A produção de biogás cresceu até atingir cerca de 1,1 litros de biogás por grama de sólidos voláteis adicionados.

Summary

Operation of the anaerobic digester in bench scale for the production of methane gas by cheese whey

A seed of vaccum manure was used to start the process of obtaining methane gas from cheese whey. The production of biogas began just after the feeding of the whey which had been diluted for a level of up to 1.8 gram of total volatile solids per liter of reactor. The hydraulic retention times studied were of 20 and 30 days and the temperature kept in 36°C. The production of the biogas grew up to 1.1 liters of biogas per gram of the total volatile solids added.

Introdução

Ao se abordar o grave problema da disposição de resíduos orgânicos, surgem dois caminhos principais para tratamento biológico: tratamento aeróbio ou anaeróbio. No primeiro caso pode-se ter um tempo menor de tratamento, mas no segundo caso pode-se conseguir uma maior redução de microrganismos patogênicos, e ao mesmo tempo a produção de gás combustível, o que às vezes pode favorecer a segunda opção técnica.

A alternativa de se produzir biogás como complemento energético e tendo como subproduto o fertilizante orgânico natural é ressaltado no trabalho de Silva (14).

A idéia de se tentar utilizar soro de leite como matéria-prima surgiu da experiência bem sucedida da utilização da vinhaça como matéria-prima para a produção de biogás (7, 13, 15).

O soro de leite contém elevada carga orgânica, 60.000mg/l, em termos de Demanda Química de Oxigênio e a porcentagem de lactose no soro é de 5% (12).

Referências específicas de utilização do soro de leite para a produção de biogás não foram encontradas na literatura, ao contrário de outras utilizações, como por exemplo produção de proteína (12) e produção de etanol (4, 9).

O objetivo principal deste trabalho inicial é ressaltar a possibilidade de se operar um biodigestor convencional em escala de bancada, alimentado apenas com soro de leite, que se apresenta como uma matéria-prima de grande potencial para a produção de biogás.

Material e Métodos

Inóculo - Foi utilizado um inóculo preparado a partir de esterco bovino semi-seco, coletado na Fazenda da Glória da Universidade Federal de Uberlândia. O esterco foi diluído em água potável na proporção de 1:1 em volume e mantido, após ser colocado no biodigestor em anaerobiose até iniciar-se a formação de gás. A partir de então, iniciou-se a alimentação com soro de leite diluído.

Substrato - Foi utilizado soro de leite obtido junto à Cooperativa Agropecuária Ltda. de Uberlândia (CALU), com concentração máxima em sólidos voláteis de 70g/l.

Análise do soro de leite - Foram analisados sólidos voláteis (3), sólidos totais (2) e Demanda Química de Oxigênio (1).

Medidas e análise nos digestores - Foram medidos nos efluentes dos biodigestores estudados, sólidos totais (2); sólidos voláteis (3); pH e análise de Orsat dos gases produzidos.

Esquema do equipamento - Foi utilizado o esquema (Figura 1) proposto por Craveiro (5). Foram montados dois balões de fundo chato com 2,0l de volume útil, que foram mantidos num banho de marca Fanen adaptados para manter a temperatura de 36°C.

Controles - Foram feitas adições de hidróxido de sódio 1N para manter o pH na faixa de 7,0, manutenção da temperatura da água do banho em 36°C e medidas de volume de gás produzido.

Alimentação dos biodigestores - As alimentações foram efetuadas de maneira a se ter em cada um dos biodigestores um tempo de retenção hidráulica de 20 e 30 dias, desta forma alimentou-se o biodigestor. A (td = 20 dias) com 100ml de solução de soro de leite, e o biodigestor B (td = 30 dias) com 67ml de solução de soro do leite.

Resultados e Discussão

As Figuras 2 e 3 apresentam as quantidades adicionadas de soro de leite, em termos de sólidos voláteis, assim como a concentração do efluente em sólidos voláteis; volume de gás produzido; pH medido ao longo do tempo do ensaio e NaOH (1N) adicionado quando necessário. As Figuras 2 e 3 foram construídas com base nos dados contidos nas Tabelas 1 e 2.

Foram estudadas duas condições de tempo de retenção hidráulica, 20 dias e 30 dias, ambas a 36°C e pH entre 6,5 e 7,1.

A dificuldade de se obter um inóculo a partir de uma estação de tratamento de esgotos nos obrigou a desenvolver um inóculo a partir de esterco bovino e o mais adequado foi um esterco semi-seco, que foi diluído em água potável.

Os resultados (Figuras 2 e 3) indicam que o soro de leite pode ser utilizado como matéria-prima para a produção de biogás, sem suplementação de qualquer nutriente, baseado no fato de que se conseguiu altas produções de biogás.

As oscilações, que aparecem na medida de produção de gás, foram devidas, principalmente, à ausência de um importante instrumento de controle: a análise de ácidos voláteis (11), cujo método não havíamos terminado de desenvolver. Em função disso, talvez tenha havido um aumento um pouco rápido na carga de sólidos voláteis adicionados.

Figura 1 - Sistema digestor-gasômetro construído com balões de vidro.

Símbolos: 1. Retirada de efluente e introdução da alimentação; 2. Saída para a amostragem de gás; 3. Passagem de gás; 4. Saída de gás; 5. Passagem da solução salina deslocada pelo gás

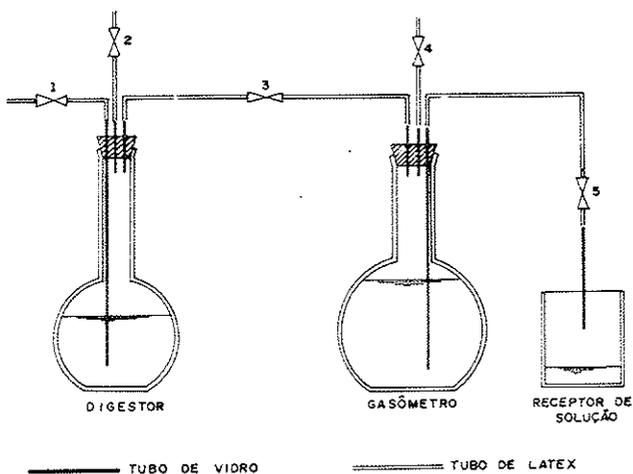


Figura 2 - Volume de gás produzido, S.V. adicionado, pH e NaOH adicionado

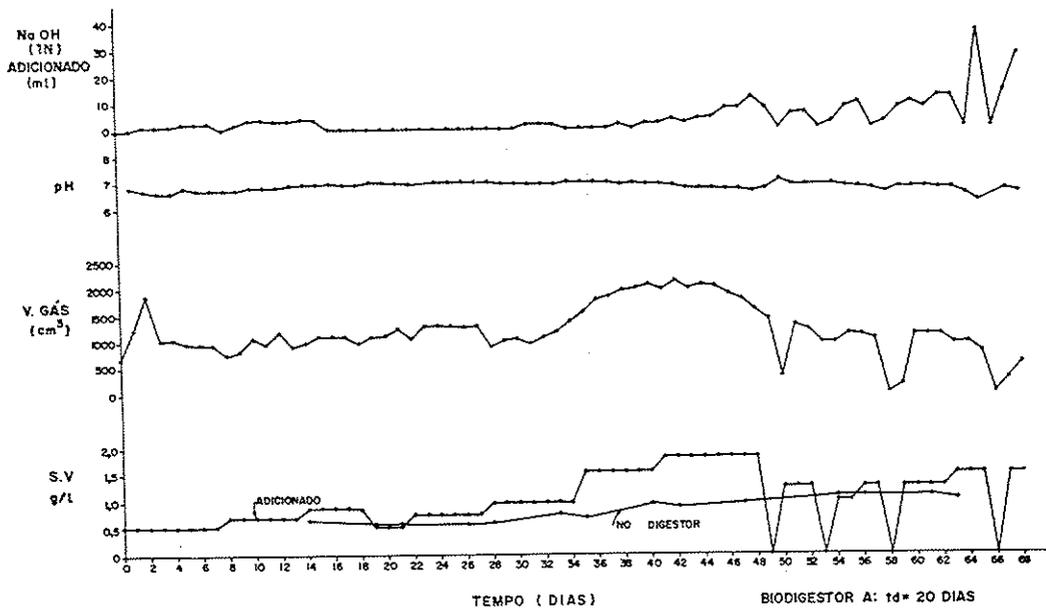
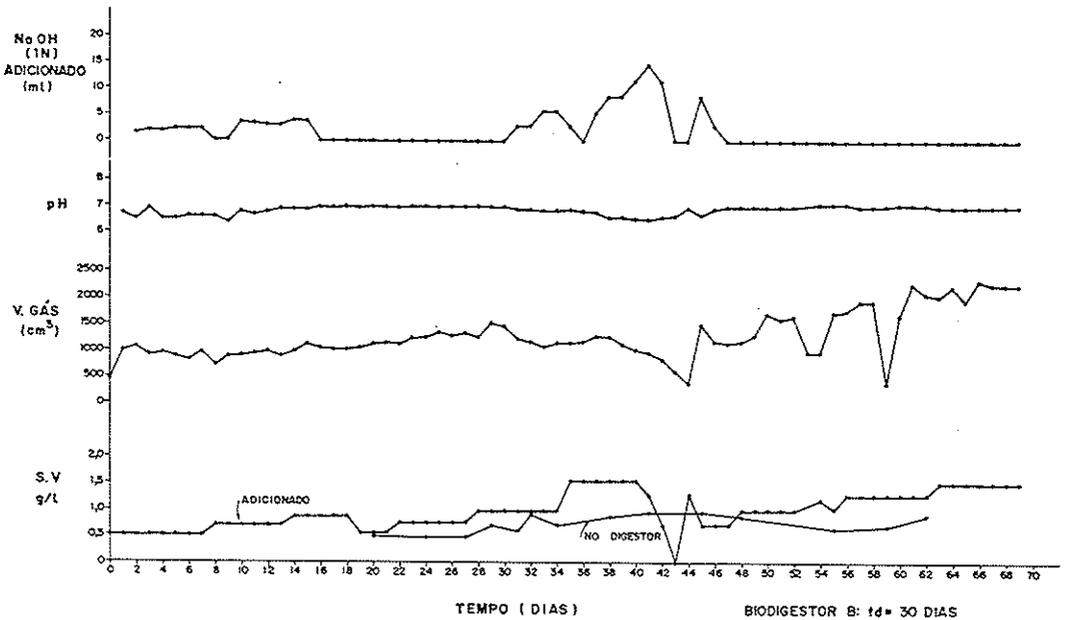


Figura 3 - Volume de gás produzido, S.V. adicionado, pH e NaOH% adicionado



Foram realizadas algumas medidas ao longo dos ensaios da quantidade de CO_2 contido no biogás, que forneceram valores em torno de 40% de dióxido de carbono em volume, o que está de acordo com literatura (8).

Para efeito do cálculo da produção de biogás num determinado dia, considerava-se a quantidade de gás produzido neste dia, dividida pela quantidade de SV adicionada no dia anterior.

Desta maneira, desconsiderados os valores de produção de gás, obtidos no início dos ensaios, obteve-se (Tabela 2), valores máximos de aproximadamente 1,1l gás/g SV ad., valores bem superiores ao encontrado para o lodo do esgoto: 0,54l gás/g SV ad. (5).

Não foram constatadas grandes diferenças na produção de gás para os tempos de retenção estudados (Tabela 2, Figuras 2 e 3). De qualquer forma, a partir do 22º dia de ensaio, a produção do biodigestor B (30 dias) se mantém ligeiramente maior.

Sugere-se, para trabalhos posteriores, que os aumentos na concentração de soro adicionado sejam feitos mais lentamente e que se estude a possibilidade de operar no sistema de fluxo ascendente (10, 15), com o qual se poderá conseguir reduzir os tempos de retenção necessários, possibilitando assim tratar maiores volumes de afluentes com digestores de tamanho reduzidos, conseguindo-se diminuição de custos.

Agradecimentos

Desejamos agradecer ao Prof. Dr. Willibaldo Schmidell Netto da EPUSP e do IPT, pelas sugestões apresentadas e ao técnico de laboratório da UFU, Francisco Carlos da Silva pela colaboração prestada.

Tabela 1 - Carga adicionada aos biodigestores ao longo do tempo em função da concentração de soro de leite e da diluição utilizadas

Tempo (dias)	Concentração de soro (g/l) de SV	Volume de soro utilizado (ml)		Carga adicionada no reator g SV/l. de reator	
		Biodigestor A	Biodigestor B	Biodigestor A	Biodigestor B
0	0,0	15	15	0,525	0,525
1	70,0	15	15	0,525	0,525
2	70,0	15	15	0,525	0,525
3	70,0	15	15	0,525	0,525
4	70,0	15	15	0,525	0,525
5	70,0	15	15	0,525	0,525
6	70,0	15	15	0,525	0,525
7	70,0	15	15	0,525	0,525
8	70,0	20	20	0,700	0,700
9	70,0	20	20	0,700	0,700
10	70,0	20	20	0,700	0,700
11	70,0	20	20	0,700	0,700
12	70,0	20	20	0,700	0,700
13	70,0	20	20	0,700	0,700
14	70,0	25	25	0,875	0,875
15	70,0	25	25	0,875	0,875
16	70,0	25	25	0,875	0,875
17	70,0	25	25	0,875	0,875
18	70,0	25	25	0,875	0,875
19	43,3	25	25	0,541	0,541
20	43,3	25	25	0,541	0,541
21	43,3	25	25	0,541	0,541
22	43,3	35	35	0,758	0,758
23	43,3	35	35	0,758	0,758
24	43,3	35	35	0,758	0,758
25	43,3	35	35	0,758	0,758
26	43,3	35	35	0,758	0,758
27	43,3	35	35	0,758	0,758
28	43,3	45	45	0,974	0,974
29	43,3	45	45	0,974	0,974
30	43,3	45	45	0,974	0,974
31	43,3	45	45	0,974	0,974
32	43,3	45	45	0,974	0,974
33	43,3	45	45	0,974	0,974
34	43,3	45	45	0,974	0,974
35	56,37	55	55	1,550	1,550
36	56,37	55	55	1,550	1,550
37	56,37	55	55	1,550	1,550
38	56,37	55	55	1,550	1,550
39	56,37	55	55	1,550	1,550
40	56,37	55	55	1,550	1,550
41	56,37	65	45	1,832	1,268
42	56,37	65	25	1,832	0,705
43	56,37	65	-	1,832	-
44	56,37	65	45	1,832	1,268
45	56,37	65	25	1,832	0,705
46	56,37	65	25	1,832	0,705
47	56,37	65	25	1,832	0,705
48	56,37	65	35	1,832	0,986
49	56,37	-	35	-	0,986
50	56,37	45	35	1,268	0,986
51	56,37	45	35	1,268	0,986
52	56,37	45	35	1,268	0,986
53	56,37	-	-	-	-
54	56,37	45	45	1,268	1,268
55	46,25	45	45	1,041	1,041
56	46,25	55	55	1,272	1,272
57	46,25	55	55	1,272	1,272
58	46,25	55	-	1,272	-
59	46,25	55	55	1,272	1,272
60	46,25	55	55	1,272	1,272
61	46,25	55	55	1,272	1,272
62	46,25	55	55	1,272	1,272
63	46,25	65	65	1,503	1,503
64	46,25	65	65	1,503	1,503
65	46,25	65	65	1,503	1,503
66	46,25	-	65	-	1,503
67	46,25	65	65	1,503	1,503
68	46,25	65	65	1,503	1,503
69	46,25	-	65	-	1,503

Tabela 2 - Produção de biogás obtido ao longo do tempo em função da carga adicionada em g de SV, e do volume de gás produzido

Tempo (dias)	Volume de biogás produzido (ml)		g de SV adicionado		Produção ml biogás/g SV adicionado	
	A	B	Biodigestor		A	B
			A	B		
0	670	440	1,050	1,050	-	-
1	1220	1000	1,050	1,050	1162,0	952,4
2	1870	1070	1,050	1,050	1781,0	1019,0
3	1030	920	1,050	1,050	981,0	876,2
4	1040	960	1,050	1,050	990,5	914,3
5	960	890	1,050	1,050	914,3	847,6
6	950	830	1,050	1,050	904,8	790,5
7	940	970	1,050	1,050	895,2	923,8
8	750	720	1,400	1,400	714,3	685,7
9	810	890	1,400	1,400	578,6	635,7
10	1075	910	1,400	1,400	767,9	650,0
11	950	940	1,400	1,400	678,6	671,4
12	1180	1000	1,400	1,400	842,9	714,3
13	900	900	1,400	1,400	642,9	642,9
14	980	990	1,750	1,750	700,0	707,1
15	1110	1140	1,750	1,750	634,3	651,4
16	1110	1060	1,750	1,750	634,3	605,7
17	1100	1020	1,750	1,750	628,6	582,9
18	970	1030	1,750	1,750	554,3	588,6
19	1090	1070	1,082	1,082	622,9	611,4
20	1110	1130	1,082	1,082	1025,9	1044,4
21	1240	1160	1,082	1,082	1146,0	1072,1
22	1050	1120	1,516	1,516	970,4	1035,1
23	1300	1250	1,516	1,516	857,5	824,5
24	1310	1260	1,516	1,516	864,1	831,1
25	1300	1350	1,516	1,516	857,5	890,5
26	1270	1290	1,516	1,516	837,7	850,9
27	1300	1340	1,516	1,516	857,5	883,5
28	890	1250	1,948	1,948	587,1	824,5
29	1020	1520	1,948	1,948	523,6	780,3
30	1050	1470	1,948	1,948	539,0	754,6
31	940	1220	1,948	1,948	482,5	626,3
32	1080	1180	1,948	1,948	554,4	605,7
33	1170	1075	1,948	1,948	600,6	551,8
34	1380	1150	1,948	1,948	600,6	590,3
35	1540	1160	3,100	3,100	790,6	595,5
36	1760	1180	3,100	3,100	567,7	380,6
37	1840	1280	3,100	3,100	593,5	412,9
38	1980	1280	3,100	3,100	638,7	412,9
39	1991	1120	3,100	3,100	641,9	361,3
40	2065	1030	3,100	3,100	666,1	332,3
41	1970	970	3,664	2,546	635,5	312,9
42	2125	840	3,664	1,410	580,0	331,2
43	1990	600	3,664	0,000	543,1	425,5
44	2050	400	3,100	2,538	559,5	-
45	2030	1510	3,664	1,410	554,0	595,4
46	1910	1170	3,664	1,410	521,3	829,8
47	1800	1160	3,664	1,410	491,3	822,7
48	1580	1170	3,664	1,972	431,2	829,8
49	1410	1280	0,000	1,972	384,8	649,1
50	320	1710	2,536	1,972	-	867,1
51	1290	1600	2,536	1,972	508,7	811,4
52	1200	1640	2,536	1,972	473,2	831,6
53	1000	1000	0,000	0,000	394,3	507,1
54	1000	1000	2,536	2,536	-	-
55	1130	1720	2,082	2,082	445,6	678,2
56	1100	1750	2,544	2,544	528,3	840,5
57	1020	1930	2,544	2,544	400,9	758,6
58	-	1930	-	2,544	758,6	-
59	150	380	2,544	2,544	59,0	149,4
60	1110	1670	2,544	2,544	436,3	656,4
61	1100	2250	2,544	2,544	432,4	884,4
62	1090	2070	2,544	2,544	428,5	813,7
63	930	2020	3,006	3,006	365,6	794,0
64	940	2230	3,006	3,006	312,7	741,8
65	770	2000	3,006	3,006	256,2	665,3
66	0	2320	-	3,006	-	771,8
67	250	2260	3,006	3,006	83,2	751,8
68	560	2240	3,006	3,006	186,3	745,2
69	0	2240	-	3,006	-	745,2

Referências Bibliográficas

1. American Public Health Organization - Oxigen demand (Chemical). In: - Standard methods for the examination of water and wastewater. 14.ed. Washington DC, APHA, p.550-554, 1976.
2. American Public Health Organization - Total the examination of water and wastewater. 14.ed. Washington DC, APHA, p.91-92, 1976.
3. American Public Health Organization - Total volatile and fixed residue at 550°C. In: - Standard methods for examination of water and wastewater. 14.ed. Washington DC, APHA, p.95, 1976.
4. Castillo, J.F.; Izaquirre, M.E.; Michelena, V. & Moreno, B. - Optimization of fermentations conditions for ethanol production from whey. *Biotechnol. Letters*, 4:567-572, 1982.
5. Craveiro, A.M. - Influência da proporção de lixo e lodo de esgoto no processo de digestão anaeróbica desses resíduos. São Paulo, Escola Politécnica da USP, 1982. (Dissertação de Mestrado).
6. Craveiro, A.M. - Produção de biogás. São Paulo, IPT, Publicação nº 1026, 1982.
7. Craveiro, A.M. - Produção de biogás a partir de vinhaça. *Saccharum*, 6:16-26, 1983.
8. Hawkes, D.L. - Factor affecting net energy production from mesophilic anaerobic digestion. In: - Staffer, D.A.; Wheatley, B.I. & Hughes, D.E. - Anaerobic digestion. London, Applied Science Publishers, p.131-150, 1980.
9. Izaquirre, M.E. & Castillo, F.J. - Selection of lactose-fermenting yeast for ethanol production from whey. *Biotechnol. Letters*, 4:257-262, 1982.
10. Lettinga, G.; Van Velsen, A.F.M.; Hobma, S.W.; Zeeum, W. & Klapwijk, A. - Use of the upflow sludge blanket reactor concept for biological wastewater treatment, specially for anaerobic treatment. *Biotechnol. and Bioeng.*, 22:699-734, 1980.
11. Montgomery, H.A.C.; Dymock, J.F. & Thom, N.S. - The rapid colorimetric determination of organic acids and their salts in sewage sludge liquors. *The Analyst*, 87:944-955, 1962.
12. Shandu, D.K. & Waraich, M.K. - Conversion of cheese whey to single-cell protein. *Biotechnol. and Bioeng.*, 25:797-808, 1983.
13. Sheenan, G.J. & Greenfield, P.F. - Utilization, treatment and disposal of distillery wastewater. *Water Research*, 14:257-277, 1980.
14. Silva, N.A. - O biogás e o biofertilizante no balanço energético do Brasil. *Revista DAE*, 44:22-29, 1984.
15. Vilen, R.A.; Craveiro, A.M.; Rocha, B.M. & Schmidell Netto, W. - Tratamento do vinhoto por digestão anaeróbica sistema de fluxo ascendente. In: - 2º Congresso Nacional da Sociedade de Técnicos Açucareiros do Brasil, Rio de Janeiro, 1981.

INÍCIO DE OPERAÇÃO DE BIODIGESTORES PARA RESÍDUOS SÓLIDOS

Willibaldo Schmidell

Escola Politécnica USP
Deptº de Engenharia Química
Caixa Postal 61548
05508 São Paulo, Brasil

Américo Martins Craveiro
Renato Figueiro Varella
Clarita Schvartz Peres
& Yukie Saito Hirata

Instituto de Pesquisas Tecnológicas do
Estado de São Paulo S.A. - IPT
Agrupamento de Biotecnologia
Caixa Postal 7141
05508 São Paulo, Brasil

Resumo

A operação de se por em marcha, ou a partida de um biodigestor é de extrema importância, a fim de se conseguir atingir um regime estável de operação. Neste trabalho, utilizamos mistura de lixo urbano e lodo de esgoto, como matéria-prima para a produção de biogás e estudamos alternativas viáveis para a obtenção da estabilidade acima mencionada, em reatores convencionais de 2 litros de capacidade. Incluímos também algumas informações experimentais sobre a partida de um digestor indiano de 4,5m³, operando com esterco bovino. Para o lixo urbano, as progressões semanais de carga orgânica acima de 15%, podem causar riscos para o sistema, bem como o emprego de um período de aclimação, operando o reator a baixas cargas orgânicas, permite uma ampliação semanal de até 35%. Para o digestor indiano, o início de operação com água no reator e carga final desde o início, é preferível à partida com mistura de esterco e água em igual proporção.

Summary

Start-up of biodigesters for solid wastes

The start-up of biodigesters is a very important step, in order to obtain a stable steady state operation. In this paper some alternatives for start-up have been investigated, using urban solid waste in 2l CSTR type digestors. Some results regarding the start-up of rural digesters fed with cow manure are also presented. For urban solid waste it was observed that 15% weekly loading rate increase is a acceptable and that higher increase can compromise the stability of the system. If a previous acclimation period is allowed, a 35% weekly loading rate increase is possible. The best start-up for the rural digester, fed with cow manure, is obtained starting up the digester filled up with water and beginning the feeding already with the final loading rate.

Introdução

O processo de digestão anaeróbia de resíduos orgânicos tem recebido muita atenção nos últimos anos, tendo em vista sua capacidade em eliminar carga orgânica poluidora, gerar gás combustível (biogás) que contribui para uma melhora no balanço energético de um sistema e, finalmente, possibilitar o uso do material digerido como adubo orgânico.

Por estes atrativos, é evidente que, na literatura, há muita informação sobre a influência de diversos fatores no processo de biodigestão, muitos dos quais devem ser controlados dentro de limites restritos. No entanto, isto não ocorre quanto à importante operação de partida de um reator, sendo raras as publicações neste sentido (1, 7).

Como se sabe (4), um material orgânico complexo, em um biodigestor anaeróbio, sofre uma série de transformações causadas por diferentes bactérias, desde a hidrólise até a geração de metano e gás carbônico. Assim, após a hidrólise, os compostos mais simples são convertidos em ácidos voláteis (acético, propiônico, butírico, etc.), sendo o ácido acético convertido pelas metanobactérias a CH_4 e CO_2 , enquanto que os ácidos orgânicos de cadeia mais longa são convertidos pelas acetogênicas em ácido acético, gerando-se no processo hidrogênio. Para que esta sequência continue há necessidade absoluta de eliminação do H_2 , o que é realizado pelas metanobactérias que consomem o H_2 e o CO_2 produzindo CH_4 .

Por esta sequência observa-se a necessidade de haver um perfeito equilíbrio entre as várias espécies microbianas no sistema, que encontra nas metanobactérias seu principal e mais sensível componente.

Havendo um prejuízo na proliferação ou na ação das metanobactérias, acumula-se o hidrogênio e, como decorrência, passam a acumular os ácidos voláteis. Estes ao atingirem níveis da ordem de 2000 a 3000ppm, passam a inibir, de forma crescente, todo o sistema até uma drástica redução do processo biológico, para valores da ordem de 10000 a 12000ppm.

A partida de um biodigestor significa uma operação em regime transiente, onde estamos alterando condições de cultivo e, portanto incorremos no risco de uma inibição das metanobactérias. Um "start-up" executado de forma inconveniente, pode nos levar à errônea conclusão de que o material proposto não é biodegradável.

O presente trabalho procura mostrar e discutir resultados obtidos quando da partida de biodigestores, operando com a fração orgânica do lixo urbano da cidade de São Paulo. Ao final incluímos também alguns dados parciais, quando da partida de um biodigestor indiano, operando com esterco bovino.

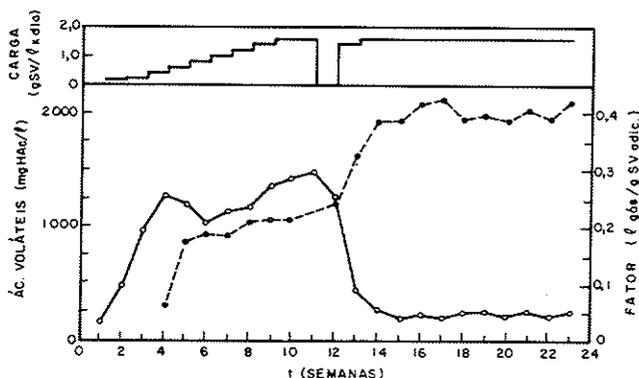
Deve ficar claro que estamos apenas preocupados com a operação de partida de um reator, motivo pelo qual o comportamento do sistema, em estado estacionário, será observado rapidamente.

Material e Métodos

Lixo urbano - Coletamos uma única porção de lixo urbano, suficiente para todos os ensaios. Esta porção foi submetida a uma seleção, rejeitando-se pedras, vidros e metais. A seguir, o lixo foi picado, secado a 80°C em estufa com circulação forçada de ar (até umidade inferior a 5%), moído em moinho de facas (Willey Mill nº 1) e armazenado, em sacos plásticos, em geladeira. Após a moagem o diâmetro das partículas era inferior a 2mm.

Lodo de esgoto digerido - O lodo digerido, utilizado em um único ensaio, foi obtido a partir de um digestor em operação na Estação de Tratamento de Esgotos (ETE) de Pinheiros (SABESP). Trata-se de material contendo cultura rica em bactérias responsáveis pelo processo e, em princípio, já em condição de equilíbrio.

Figura 1 - Fator de produção de gás (.), concentração de ácidos voláteis (o) e carga orgânica em função do tempo, quando se ampliou a carga de 0,16 a 1,6gSV/l.d com incrementos semanais de 0,2gSV/l.d



dos, por iniciativa daquela Companhia, uma série de biodigestores rurais. Em média, o esterco apresentava 0,13g SV/g esterco.

Sistemas de reação - Para os ensaios com lixo urbano utilizaram-se reatores de 2 litros de capacidade, os quais permaneciam no inferior de uma estufa a 30°C. A operação foi realizada em regime semicontínuo, segundo a qual os reatores eram alimentados 3 vezes por semana, sendo a carga orgânica então adicionada suficiente para considerarmos a alimentação nos dias em que os digestores não eram manipulados. Os balões de 2 litros, contendo o material em digestão, eram agitados manualmente 2 vezes por dia, e estavam acoplados a outros balões contendo solução saturada em Na_2SO_4 e acidulada com H_2SO_4 na concentração de 3%. À medida em que havia produção de gás no reator, este deslocava a solução de Na_2SO_4 para um frasco coletor. A medida diária do líquido deslocado nos dava o volume de gás produzido, sendo o valor obtido corrigido para as condições normais de temperatura e pressão, bem como para base seca (para o caso de esterco esta correção não foi efetuada).

Os reatores foram operados, mantendo-se fixo o volume de suspensão em seu interior e também fixo o tempo de residência em 20 dias. Isto significa que os reatores eram alimentados com 100ml suspensão/dia ou 200ml a cada 2 dias. A alimentação era realizada com mistura de lixo urbano, lodo de esgoto e água para completar o volume, sendo que mantivemos fixa a relação de lixo para lodo em 80:20, relação esta em termos de sólidos totais.

No caso do trabalho com esterco, apresentaremos dois resultados de partida de um digestor indiano tradicional com 4500% de capacidade, alimentado diariamente. Este reator dispunha de cúpula flutuante e medidor totalizador de gás (Liceu de Artes e Ofícios Modelo MG-2).

Os controles analíticos eram realizados com a suspensão efluente de cada reator.

Controle do pH - Tínhamos como critério efetuar correções de pH do digestor quando se obtivesse valores inferiores a 6,8. Assim, o pH era medido no efluente dos digestores e adicionávamos solução de NaOH 2N, juntamente com a alimentação em quantidade suficiente para a elevação do pH para o valor 7,0.

Determinação da concentração de ácidos voláteis - Esta determinação foi feita pelo método colorimétrico (5), sendo as concentrações expressas em termos de ácido acético.

Lodo de esgoto adensado - O lodo adensado era também obtido na ETE Pinheiros e continha aproximadamente 6% de sólidos totais, dos quais 77% eram voláteis. Efetuávamos coleta de lodo a cada sete dias, sendo durante este período estocado em geladeira. Como se verá adiante, partimos os reatores com mistura de lixo e lodo de esgoto, sendo que o lodo é entendido como material que fornece nutrientes e constitui-se também em inóculo para o sistema.

Esterco bovino - Este material era procedente de gado semi-estabulado da Fazenda Corumbataí (Rio Claro, SP), pertencente à Companhia Energética de São Paulo S/A (CESP), onde foram instala-

Figura 2 - Fator de produção de gás (.), concentração de ácidos voláteis (o) e carga orgânica em função do tempo, quando se iniciou a operação na carga final e utilizou-se lodo digerido para a estabilização

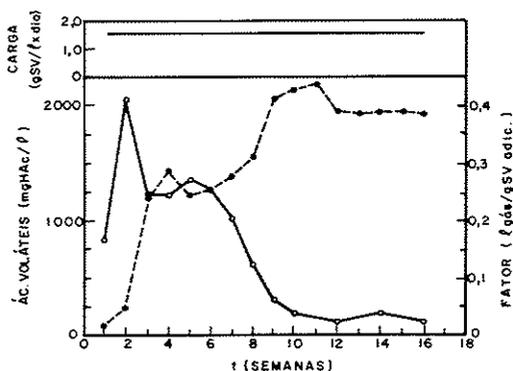
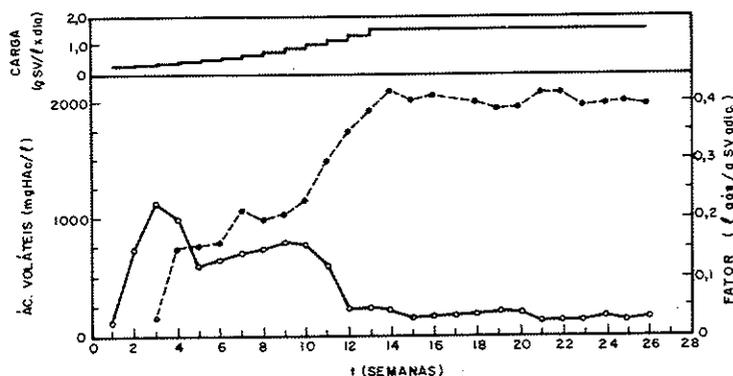


Figura 3 - Fator de produção de gás (.), concentração de ácidos voláteis (o) e carga orgânica em função do tempo, quando se iniciou a operação com 0,32gSV/l e ampliou-se semanalmente a carga orgânica em 15% sem aclimatação prévia



Determinação da concentração de sólidos totais (ST) e voláteis (SV) - Estes controles analíticos foram realizados no líquido a ser introduzido no reator, bem como na suspensão efluente. Utilizamos a metodologia (6), segundo a qual a amostra é secada em banho-maria e posteriormente em estufa a 105°C até peso constante, obtendo-se a concentração de sólidos totais. A seguir, estes eram submetidos a 550°C em uma mufla, obtendo-se a fração volátil a ser considerada.

Resultados e Discussão

A produção de gás será expressa em volume de gás produzido por unidade de massa de sólidos voláteis adicionados ao reator, ambos os valores considerados entre uma alimentação e a seguinte (litros de gás por grama de sólidos voláteis adicionados ao reator). Nos gráficos indicaremos os valores médios semanais. Analogamente as concentrações de ácidos voláteis serão indicadas como médias semanais.

Na maioria dos ensaios procurou-se trabalhar com cargas orgânicas (expressas em gramas de sólidos voláteis adicionados por litro de reator e por dia) progressivas, sendo a alteração de carga efetuada uma vez por semana. Como estamos tipicamente em regime transiente, assumimos 1500ppm como a concentração de ácidos voláteis acima da qual tomaríamos alguma atitude, a fim de evitar a falha do reator. Isto não significa que se não tomássemos alguma medida o reator entraria efetivamente em falha, mas estaríamos contribuindo para uma situação de instabilidade.

No trabalho com o lixo urbano, tínhamos como meta atingir carga orgânica de 1,6gSV/1. dia, valor este fixado com base em alguns resultados já descritos na literatura (2, 3). Convém ainda mencionar que, no estado estacionário, atingia-se, para todo o conjunto de ensaios, um fator de produção de gás em torno de 0,4 g-gás/gSVad., gás contendo 60% CH₄. A concentração de ácidos voláteis era da ordem de

Figura 4 - Fator de produção de gás (.), concentração de ácidos voláteis (o) e carga orgânica em função do tempo, quando se iniciou a operação com 0,32gSV/l e ampliou-se semanalmente a carga orgânica em 20% sem aclimação prévia

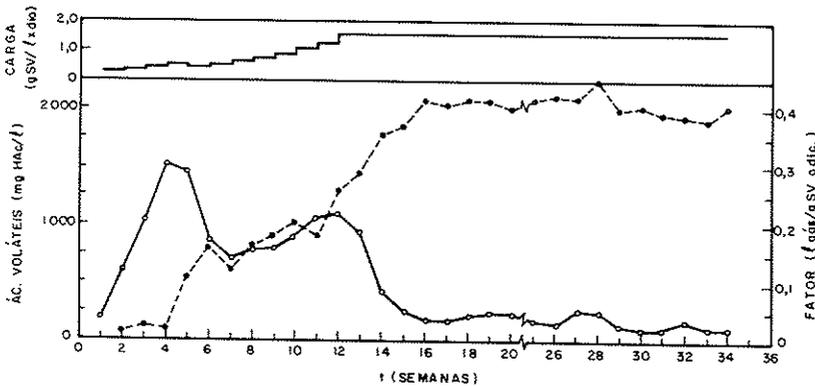
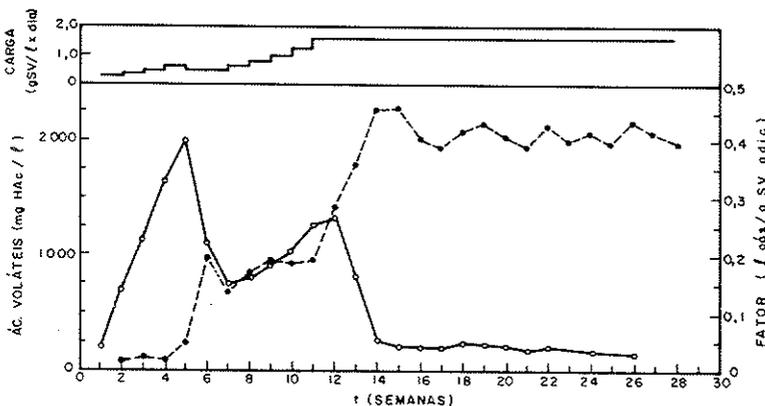


Figura 5 - Fator de produção de gás (.), concentração de ácidos voláteis (o) e carga orgânica em função do tempo, quando se iniciou a operação com 0,32gSV/l e ampliou-se semanalmente a carga orgânica em 25% sem aclimação prévia



200ppm e obtinha-se uma redução de sólidos voláteis entre 50 e 55%. A alcalinidade atingia valores como 2000mg CaCO_3/l .

Também, no estado estacionário, era desnecessária a adição de NaOH para o controle do pH, pois este permanecia próximo a 6,8 ou 6,9.

Resultados Preliminares

Na Figura 1 observamos os resultados obtidos quando carregamos um reator com a mistura de lixo e lodo na concentração de 0,16gSV/l e imediatamente passamos à

Figura 6 - Fator de produção de gás (.), concentração de ácidos voláteis (o) e carga orgânica em função do tempo, quando se iniciou a operação com 0,32gSV/l e ampliou-se semanalmente a carga orgânica em 30% sem aclimação prévia

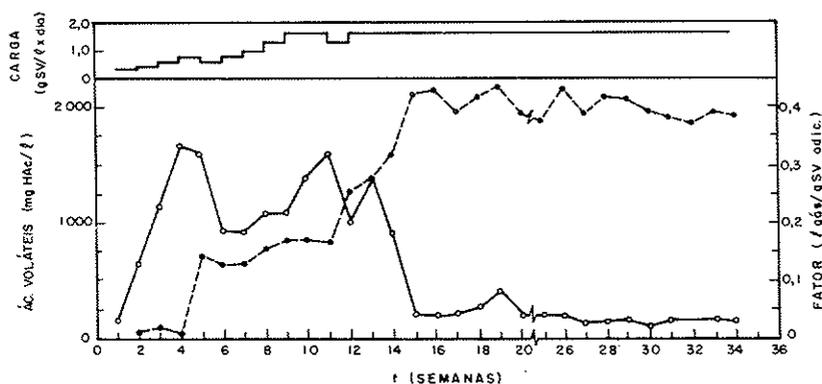
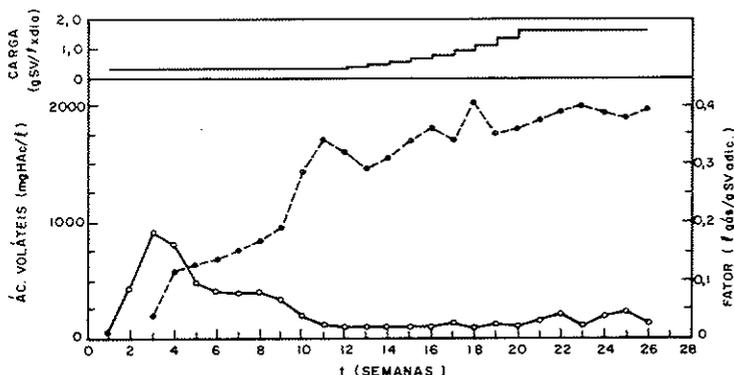


Figura 7 - Fator de produção de gás (.), concentração de ácidos voláteis (o) e carga orgânica em função do tempo, quando se iniciou a operação com 0,32gSV/l e ampliou-se semanalmente a carga orgânica com 20% com período prévio de aclimação



operação contínua, mantendo a carga de 0,16gSV/l.dia durante a primeira semana. O esquema imaginado foi a ampliação de carga para 0,2, 0,4, 0,6 e assim por diante até atingir o valor 1,6gSV/l.dia.

Ocorre que durante a 11ª semana o valor limite para concentração de ácidos voláteis foi ultrapassado, instante em que interrompemos a alimentação durante uma semana. Observe-se que a concentração baixou consideravelmente e obtivemos estabilidade no reator, mesmo quando retornamos a alimentá-lo na carga 1,4gSV/l. dia.

Apesar do relativo sucesso desta partida, esta ampliação de carga é intensa no início e proporcionalmente menor para os instantes finais. Parece-nos, no entanto, ser uma alternativa viável que leva a um reator estável em cerca de 14 semanas.

A Figura 2 nos indica os valores obtidos quando partimos o reator na carga final pretendida. Como se pode observar, já na 2ª semana a concentração de ácidos atingiu valores da ordem de 2000ppm, o que nos levou inicialmente a substituir os 20% de lodo adensado por lodo digerido e, posteriormente, substituir ainda 50% da carga orgânica de lixo por lodo digerido.

Observe-se que a concentração de ácidos diminuiu drasticamente durante a 3ª semana, o que nos fez, ao final da 3ª e início da 4ª semana, retornar à alimentação original, obtendo-se estabilização do reator no transcurso da 10ª semana.

Estes dados (Figura 2), são interessantes, porém pressupõem a disponibilidade de quantidades apreciáveis de lodo digerido. Claro está que se dispusermos de reatores operando de forma estável, esta partida para um reator adicional seria viável, desde que fizéssemos um acompanhamento rigoroso durante as primeiras semanas.

Aumento progressivo de carga orgânica sem aclimatação prévia - As Figuras 3, 4, 5 e 6 indicam os resultados obtidos quando carregamos os reatores com suspensão de lixo e lodo na concentração de 0,32gSV/l, estabelecemos o processo contínuo nesta mesma carga durante a 1ª semana e, a seguir, ampliamos a carga semanalmente na proporção de 15, 20, 25 e 30% respectivamente.

Conforme se verifica, neste conjunto de figuras, apenas a progressão de 15% permitiu avançar a carga orgânica sem provocar acúmulo exagerado de ácidos voláteis, atingindo-se a 12ª semana com reator estabilizado, apesar de ainda estarmos em pleno programa de aumento de carga, que foi concluído na 14ª semana.

Já a progressão de 20% (Figura 4), nos forçou a retroceder a carga na 6ª semana, por termos obtido, ao final da 5ª semana, valor diário de concentração de ácidos superior a 1500ppm. Esta medida de precaução, permitiu progredirmos a carga conforme estabelecido até o final, tendo se estabilizado o reator quando atingimos a 16ª semana.

As progressões de 25 e 30% obrigaram a tomar medidas mais frequentes, a fim de se evitar a falha dos reatores, não sendo, portanto, partidas aconselháveis, salvo haja informação analítica adequada, do processo biológico em andamento. Nestes casos as concentrações de ácidos se mantiveram sempre muito elevadas, obtendo-se estabilidade quando se atingiu a 14ª ou 15ª semana de operação.

Como se vê, a progressão menos acentuada de carga, apesar do modesto avanço semanal, nos levou mais rapidamente a uma condição de estabilidade, sendo que as demais, em virtude da necessidade de retrocessos, não apresentam vantagens em termos de tempo para se atingir condição estável e operam-se os reatores em constante situação de desequilíbrio.

Aumento progressivo da carga orgânica com aclimatação prévia - Nesta nova série de ensaios, os reatores foram igualmente carregados com uma mistura de lixo e lodo na proporção de 80:20 e na concentração de 0,32gSV/l. Imediatamente começaram a ser alimentados na carga 0,32gSV/l.dia, permanecendo nesta condição até que a concentração de ácidos voláteis atingisse níveis suficientemente baixos (da ordem de 200ppm).

Após este período iniciou-se a progressão semanal de carga em 20, 25, 30 e 35% (Figuras 7, 8, 9 e 10).

Todos os reatores atingiram a carga orgânica de 1,6gSV/l.dia sem que houvesse indícios de falha durante a progressão. Apenas o reator submetido a incrementos de 35% apresentou na última semana, quando já operava na carga máxima pretendida, ligeiro indício de aumento de ácidos, tendo sido necessário encerrar prematuramente

este ensaio. No entanto, não nos parece que teríamos a ocorrência de problemas mais sérios, tendo em vista que já operávamos com carga constante.

Desta forma, esta nova técnica de partida nos parece extremamente segura e para a progressão de 35%, atingiu-se carga final na 17ª semana. Este intervalo de tempo, quando comparado aos valores obtidos para atingir a estabilidade nos ensaios anteriores, sem aclimação, não é exageradamente superior.

Resultados obtidos com esterco bovino - Tendo em vista o crescente interesse na instalação de biodigestores rurais, operando com esterco bovino, decidimos incluir na presente sequência alguns resultados em um biodigestor indiano. A Figura 11

Figura 8 - Fator de produção de gás (.), concentração de ácidos voláteis (o) e carga orgânica em função do tempo, quando se iniciou a operação com 0,32gSV/l e ampliou-se semanalmente a carga orgânica em 25% com período prévio de aclimação

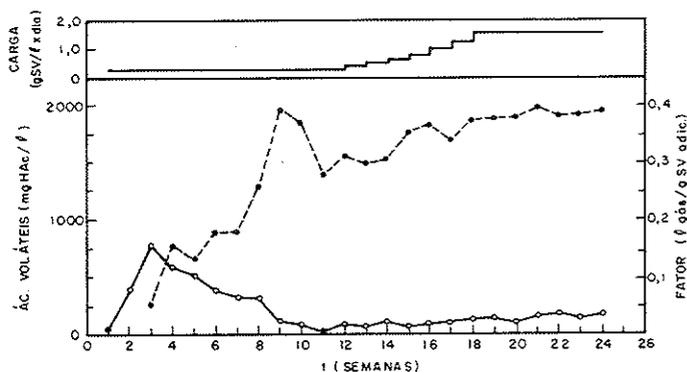
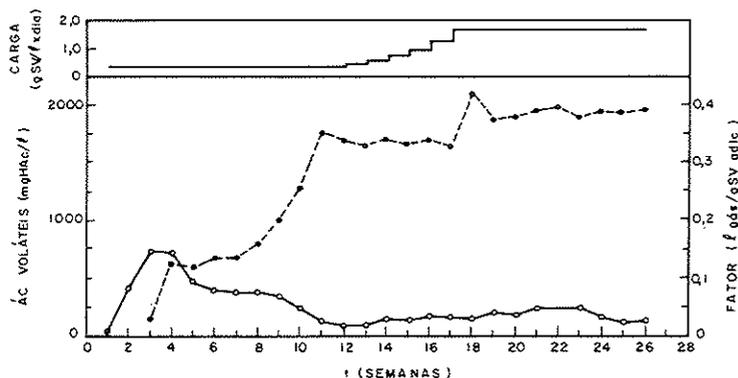


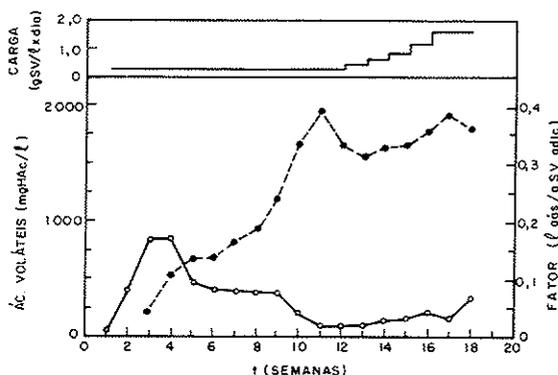
Figura 9 - Fator de produção de gás (.), concentração de ácidos voláteis (o) e carga orgânica em função do tempo, quando se iniciou a operação com 0,32gSV/l e ampliou-se semanalmente a carga orgânica em 30% com período prévio de aclimação



indica o resultado da partida do biodigestor de 4,5m³, segundo a técnica usual, ou seja, introduzindo no volume de reação esterco diluído com água, utilizando uma parte de esterco para uma de água, em termos de massa.

Como se observa, a concentração de ácidos voláteis na segunda semana era próxima de 6000ppm, motivo pelo qual não precedemos ao início da alimentação, para o estabelecimento do processo contínuo (alimentação uma vez ao dia). Tendo havido uma razoável redução de ácidos no transcurso da 4ª semana, iniciou-se a alimentação do reator, usando 7,5Kg de esterco diluído em 7,5ℓ de água (10% de carga final desejada). Em se tratando de esterco bovino, material frequentemente empregado como inóculo para sistemas de biodigestão, propusemos uma ampliação de carga de 20% por dia até atingirmos a carga final de 2,2gSV/l.dia, após 14 dias, quando então introduzíamos no reator 75Kg de esterco diluído com 75ℓ de água, obtendo um tempo de residência da ordem de 30 dias. Lamentavelmente não dispomos da medida do volume de gás, mas é evidente que durante as primeiras semanas deve ter sido extremamente baixa.

Figura 10 - Fator de produção de gás (.), concentração de ácidos voláteis (o) e carga orgânica em função do tempo, quando se iniciou a operação com 0,32gSV/l e ampliou-se semanalmente a carga orgânica em 35% com período prévio de aclimação



Note-se que ao estabelecermos o processo contínuo, a concentração de ácidos estabilizou em valor próximo a 2000ppm, mantendo-se assim por 6 semanas, passando então a cair. Esta condição, que já atribui certa instabilidade ao reator, é característica do acúmulo do ácido propiônico em virtude da exagerada elevação de ácidos voláteis no início.

Conclui-se, portanto, que a partida tradicionalmente empregada, mostrou-se inadequada e, caso não acompanhássemos a concentração de ácidos e iniciássemos a alimentação logo após o preenchimento do reator, provavelmente teríamos conduzido o processo a falha. Acrescente-se que ao iniciarmos a alimentação encontramos dificuldades pela formação de uma crosta na superfície do líquido, o que forçou inclusive a interrupção da operação.

Na Figura 12 indicamos, agora de forma mais completa, uma alternativa a este procedimento. Aqui partimos com o volume de reação contendo apenas água e iniciamos a alimentação do reator na carga final de 2,2gSV/l.dia, o que significava, conforme já indicado, alimentá-lo com 75Kg de esterco diluído com 75ℓ de água, no tempo de residência de 30 dias.

Como se nota, a concentração de ácidos voláteis atingiu o valor de 1500ppm na 5ª semana, baixando em seguida a valores perfeitamente aceitáveis a partir da 12ª semana. Como decorrência observamos constância no valor do pH, muito próximo de 7,0 e sem a adição de nenhum álcali, o que confirma a estabilidade do sistema em reação.

Assim, também o fator máximo de produção de gás foi atingido na 8ª semana. Para que melhor se avalie a eficiência da conversão obtida, basta dizer que este biodigestor indiano produziu, no estado estacionário, algo em torno de 28ℓ gás/Kg de esterco, enquanto que um reator de laboratório agitado mecanicamente e com temperatura controlada em 35°C, operando em paralelo, produziu 32ℓ gás/Kg esterco.

Trata-se, portanto, de um início de operação bem mais seguro do que o anterior e perfeitamente recomendado para operação na zona rural, onde logicamente não se pode imaginar um acompanhamento analítico mais evoluído. Inclusive deve-se salientar que não foi observada a formação da crosta mencionada anteriormente, o que permitiu uma melhora na operação.

Claro está que esta proposta mereceria uma otimização, como seria o caso de um início de operação com esterco mais diluído do que a proporção 1:1 e um esquema semelhante aos anteriores em termos de ampliação de carga. Entendemos, no entanto, que a sistemática empregada já é de valia imediata.

Esta técnica nos parece particularmente recomendada quando do uso de esterco de porcos ou galinhas, onde existe o problema adicional do acúmulo de amônia. Neste caso, a partida com menores teores de material orgânico permitiria uma melhor aclimação do sistema bacteriano.

Figura 11 - Concentração de ácidos voláteis em função do tempo durante a partida de biodigestor indiano com esterco bovino diluído com água na proporção 1:1

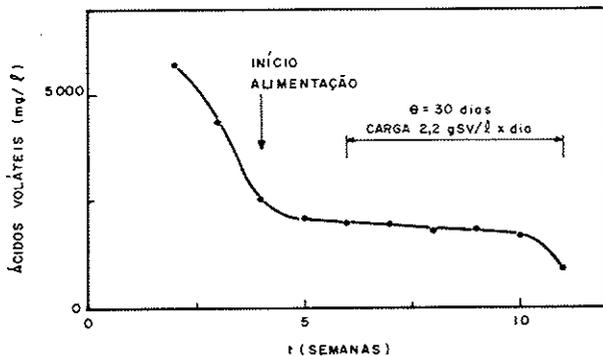
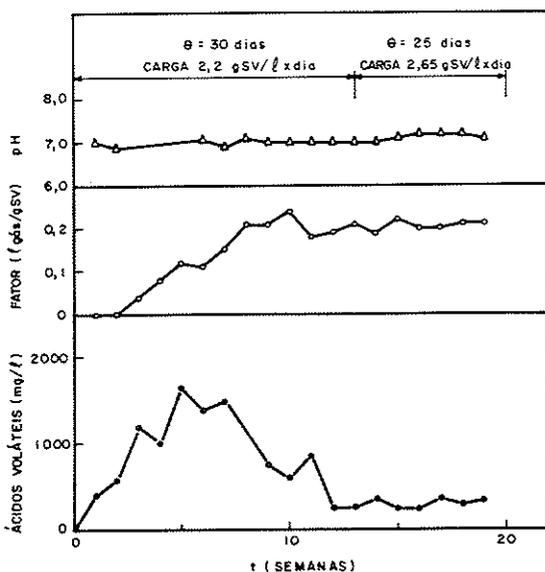


Figura 12 - Resultados obtidos quando se iniciou a operação de biodigestor indiano contando apenas água, sendo alimentado com esterco bovino diluído (1:1) na carga orgânica final de 2,2 gSV/1.d



Referências Bibliográficas

1. Bull, M.A.; Sterritt, R.M. & Lester, J.N. - An evaluation of four start-up regimes for anaerobic fluidized bed reactors. *Biotech. Letters*, 5:333-338, 1983.
2. Ghosh, S.; Conrad, J.R. & Klass, D.L. - Materials and energy reclamation from municipal wastes. *Inst. of Gas Technol. Chicago (Illinois)*, 1974.
3. Klass, D.L. & Ghosh, S. - Fuel gas from organic wastes. *Chemtech. nov.*, p.689-698, 1973.
4. Mac Inerney, M.J.; Bryant, M.P. & Stafford, D.A. - Metabolic stages and energetics of microbial anaerobic digestion. In: - Stafford, D.A.; Wheatley, B.I. & Hughes, D.E., eds. - *Anaerobic digestion*. London, App. Sci. Publishers, p.91-98, 1980.
5. Montgomery, H.A.C.; Dymock, J.F. & Thom, N.S. - The rapid colorimetric determination of organic acids and their salts in sewage sludge liquor. *The analyst*, 87:949-955, 1962.
6. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 14.ed. Washington, Am. Publ. Health Association, p.95, 1976.
7. Zeew, W. & Lettinga, G. - Acclimation of digested sewage sludge during start-up of an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Proc. of the 35th Ind. Waste Conf., Purdue Univ.*, p.39-47, 1980.

INFORMAÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA SBM

Atividades da SBM em virologia

Em 1976, durante o Congresso Brasileiro de Microbiologia, a SBM promoveu reunião de virologistas brasileiros com a finalidade de analisar a situação na área e propor medidas que permitissem a solução dos problemas existentes.

Sem contar com apoio financeiro de qualquer agência governamental, foi constituída a comissão incumbida de levar adiante o desejo manifestado pelos pouquíssimos profissionais da área.

Diversas reuniões foram realizadas, com suporte administrativo e financeiro da Sociedade. Adicionalmente, foi elaborado levantamento dos virologistas brasileiros, identificados por instituição de origem e por linhas de trabalho.

A nível interno, os esforços resultaram, em 1977, na elaboração da proposta para expansão da virologia, sob o título Programa Integrado de Virologia.

Finalmente, em 1982, o texto foi aperfeiçoado, com a coordenação da SBM e patrocínio da FINEP. Passou a ser adotado como Programa Setorial de Virologia CNPq-FINEP e foi aberta linha de crédito para financiamento de projetos.

Para atuar como suporte das resoluções da FINEP e CNPq, a SBM tomou as seguintes iniciativas: i. fortalecimento do grupo de especialistas que, nos últimos 10 anos, vêm lutando para consolidar programa para expansão da virologia; ii. organização de Encontros Nacionais de Virologia; e iii. difusão da filosofia do PSV CNPq/FINEP e da atuação efetiva dos núcleos dedicados à P&D, formação e treinamento de recursos humanos e prestação de serviços técnicos.

Das iniciativas, resultaram os seguintes fatos concretos, desencadeados sob a coordenação da SBM:

a. Encontros Nacionais de Virologia (ENV) - A realização de encontros de profissionais, a nível nacional, foi concebida com a finalidade de fomentar o desenvolvimento da virologia, através de: i. discussão de temas relevantes à virologia, como disciplina do conhecimento científico e campo de aplicação tecnológica; ii. conhecimento recíproco de atividades e projetos correntes; iii. diagnóstico e proposição de medidas para o progresso da área; iv. discussão sobre o andamento do PSV CNPq-FINEP; e v. o papel da SBM no desenvolvimento da virologia. O Iº ENV realizou-se nos dias 28 de novembro a 1 de dezembro de 1983 e o IIº ENV, nos dias 9 a 13 de novembro de 1984, ambos em São Lourenço. O IIIº ENV deverá ocorrer em 1986.

b. Pesquisa e desenvolvimento em rotavírus de humanos - As diretrizes básicas formuladas para articulação de profissionais em projeto nacional de P&D foram absorvidas pelo PSV e adotadas para convocação, diretamente pela FINEP e CNPq, de grupos com potencial para elaboração de projetos. Vários grupos foram financiados.

c. Pesquisa e desenvolvimento em biologia de vírus de plantas - Após extensa atividade, conduzida pela SBM, foi consolidada proposta para ação integrada na área, envolvendo 5 instituições. O projeto foi submetido ao PSV CNPq-FINEP, em novembro de 1983, recebeu recursos e encontra-se em fase de implantação.

d. Atividade antiviral em plantas brasileiras - Projeto elaborado por especialistas de 3 instituições, foi submetido, pela SBM, ao CNPq-FINEP. Constitui modelo inovador, em integração.

e. Cooperação bilateral Brasil-Argentina - especialistas brasileiros estão mantendo contatos com virologistas argentinos para estabelecimento de programas bilaterais de cooperação, sobre os seguintes temas: i. rotavírus de bovinos; ii. vírus respiratórios; iii. hepatite; e iv. interferon. FINEP, CNPq e Itamaraty foram cientificados do assunto.

f. Prêmio Paulo de Góes - Convênio assinado com para criação de prêmio destinado a estimular maior criatividade na geração de projetos de pesquisa e desenvolvimento em virologia. Deverá ser conduzido por virologistas do IM-UFRJ.

Bononi, V.L.R. & Rodrigues, B.M. - Cogumelos comestíveis. São Paulo, Instituto de Botânica, 16p. ilustr., folheto nº 16, 1983.

Este folheto que leva o nº 16 é mais uma publicação do Instituto de Botânica. Pouco a pouco, vai se introduzindo no Brasil, a micofagia, isto é, o hábito de se ingerir cogumelos. Assim sendo, seus autores, através de informações compactadas e ilustradas com desenhos caricatos, propõem-se a divulgar a possibilidade do cultivo de cogumelos. Ressalvam, porém, que a obtenção em escala econômica requer cuidados especiais não incluídos na publicação e descritos na reduzida bibliografia (3 obras) indicada. Após tecerem comentários de ordem geral, descrevem, sucintamente, o cultivo de *Pleurotus ostreatus* e de *Agaricus campestris*, duas espécies comestíveis utilizadas no Brasil (a primeira de ocorrência natural e a segunda importada para o nosso meio).

Acreditamos que, com a experiência dos autores, este folheto poderia ter sido enfocado de maneira mais objetiva, no que diz respeito às suas finalidades.

Apesar da ressalva apresentada ao cultivo em escala econômica, não foi fornecida a opção esperada, isto é, a possibilidade da obtenção de cogumelos em escala "doméstica", estimulada por algumas receitas culinárias descritas ao final. É incluído um glossário constituído de 6 termos onde se nota alguma confusão: 1) Autoclavar - desinfetar..., 2) Pasteurização - processo de esterilização...

Athemar Purchio
Deptº de Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas
USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374/2º
05508 São Paulo SP

Cummins, G.B. & Hiratsuka, Y. - Illustrated genera of rust fungi. Minnesota, St. Paul, American Phytopathological Society, revised edition, 152p., 1983.

Esta obra é uma edição revisada e ampliada de um manual do mesmo título originalmente publicado pelo primeiro autor de 1959 e editado pela Burgess Publishing Company.

Destina-se primariamente a identificação de fungos causadores das doenças comumente conhecidas por ferrugens (Basidiomicetos-Uredinales). Como a edição anterior o manual reúne informações valiosas para estudantes, professores e técnicos que militam na área da micologia e fitopatologia incluindo noções fundamentais sobre os diversos estados esporíferos, suas variações, ciclos vitais e aspectos morfológicos desse importante e complexo grupo de fungos fitopatogênicos. Reune chaves para separação em seções e classificação de gêneros e contém farta ilustração com desenhos de 105 gêneros reconhecidos de ferrugens. São omitidos porém os gêneros de ferrugens imperfeitas. Como novidades traz ilustrações sobre a distribuição de poros germinativos dos uredinísporos, morfologia e ornamentação externa dos diferentes tipos de esporos. Esses conhecimentos são elucidativos e bastante úteis a todos aqueles que queiram iniciar estudos em uredinologia.

A contribuição maior dessa reedição foi a ênfase dada ao valor das estruturas espermogoniais, antes relegadas a um plano secundário, na taxonomia supra-genérica de Uredinales. As informações introduzidas nessa nova edição são o produto de um árduo e amplo trabalho desenvolvido pelos autores sobre as variações morfológicas dos espermogônios e a sua importância na taxonomia das ferrugens, cujos resultados foram publicados nas revistas *Mycologia* em 1965 e por Yratsuka & Yratsuka em *Reports of the Tottori Mycological Institute* em 1980. Nesses estudos foram reconhecidos 6 grupos e 12 tipos diferentes de espermogônios de acordo com certos critérios como: posição dos mesmos em relação aos tecidos do hospedeiro, aspectos morfológicos gerais, forma da camada himenial, presença ou ausência de estruturas limitantes dos espermogônios, etc.

Trata-se de uma excelente obra científica e de grande interesse prático para uso no laboratório, que permite, frequentemente, identificações de gêneros por comparação simples de uma lâmina examinada a nível de microscopia ótica, com as ilustrações fartamente contidas no manual.

É uma obra que deve ser recomendada e que não pode faltar no acervo de qualquer biblioteca ou laboratório especializado em micologia ou patologia vegetal, dada a incontestável importância das ferrugens como patógenos de plantas.

Mario Barreto Figueiredo
 Instituto Biológico
 Av. Conselheiro Rodrigues Alves,
 1252
 Caixa Postal 7119
 04014 São Paulo SP

13ª Conferência Bienal da Associação Internacional de Pesquisa das Águas, Rio de Janeiro, Brasil, 17 a 22 de agosto de 1986.

Durante a Conferência será efetuada a Reunião do Grupo Técnico: Virologia da água e outros aspectos de saúde pública da microbiologia da água.

Nesta reunião participarão especialistas de renome internacional que apresentarão trabalhos de alto nível e interesse para os que trabalham em microbiologia ambiental.

Este tópico interessará a todos os especialistas em bacteriologia, parasitologia, micologia, limnologia e epidemiologia relacionados com os aspectos de saúde pública da água. Trabalhos nestes tópicos podem ser apresentados oralmente ou na forma de "poster".

Maiores detalhes sobre as atividades deste grupo e proposta para a conferência do Rio, incluindo informações para a seleção de trabalhos, podem ser obtidos de: Dr. W.O.K. Grabow, National Institute for Water Research, CSIR, P.O. Box 395, Pretoria, 0001, África do Sul.

Taxa de inscrição	Até 15.06.86	Após 15.06.86
Membros da ABES ou IAWPRC	US\$200	US\$225
Não-membro	US\$250	US\$275

Não deixe de participar. Se você tiver algum trabalho a apresentar, embora o tempo já tenha sido esgotado, escreva urgentemente para o Dr. Grabow pois o mesmo está preocupado, uma vez que poucos microbiologistas da América Latina estarão apresentando trabalhos.

Maiores informações:
 Petra S. Sanchez
 CLAMA
 Av. Prof. Frederico Hermann Jr., 345
 05459 São Paulo SP

Encontro de Editores de Revistas Científicas, São Paulo, 27 e 28 de novembro de 1985.

A Sociedade Brasileira de Microbiologia teve a satisfação de organizar o I Encontro de Editores, realizado sob o patrocínio da FINEP/CNPq, em São Lourenço, de 18 a 20 de março de 1984.

Em 1985, colaborou substancialmente com a FINEP, na organização do II Encontro de Editores, realizado em São Paulo, no Instituto de Ciências Biomédicas USP, em 27 e 28 de novembro.

Os dois encontros tiveram como objetivos básicos implementar a política de publicações científicas e o intercâmbio de informações entre as revistas científicas, apoiadas pela FINEP e CNPq.

Participaram do II Encontro as lideranças das diversas revistas científicas e demais interessados, num total de 60 pessoas.

Durante o II Encontro foi criada a ABEC - Associação Brasileira dos Editores Científicos, sob a presidência do Dr. José A. Duarte.

Como resultado das discussões durante o Encontro, foi produzido documento final, com recomendações para a adequação das diversas revistas científicas publicadas com o apoio da FINEP/CNPq, conforme segue:

Documento Final

A. Premissas

1. A política de divulgação científica e tecnológica é parte integrante da política global de ciência e tecnologia do país e, por consequência, o financiamento desta atividade deverá constar dos orçamentos e dos programas de Pesquisa e Desenvolvimento das agências financiadoras e de outras instituições.

Para adequar os recursos às reais necessidades do setor, seriam necessários, no mínimo, 2% dos recursos efetivamente alocados à Pesquisa e Desenvolvimento pelas agências financiadoras e pelas instituições de pesquisa.

2. O pesquisador brasileiro deve ser conscientizado de sua responsabilidade na publicação ampla dos resultados de seu trabalho em revistas científicas nacionais.

3. Os progressos da pesquisa científica e tecnológica do país, estão a exigir um salto qualitativo e quantitativo na informação científica e tecnológica.

4. Deve ser reconhecida a importância das revistas científicas como espelho da produção científica nacional.

B. Recomendações às agências financiadoras e órgãos públicos

1. Que as agências financiadoras estudem mecanismos de pagamento de salários às equipes de editoração científica, visando criar estruturas profissionais;

2. que o MEC destine recursos às bibliotecas universitárias para assinatura de revistas científicas nacionais de boa qualidade;

3. que as agências coordenadoras do Programa Setorial de Publicações em Ciência e Tecnologia concedam - por tempo determinado - um adicional de 15% sobre o total de recursos fornecidos a cada revista, para que a entidade responsável pela publicação envie 200 exemplares a bibliotecas, entidades e grupos de sua área de especialização localizadas no Brasil e 100 exemplares para bibliotecas congêneres no exterior. Tais recursos adicionais destinam-se a cobrir os custos com manipulação, embalagem e postagem dos exemplares. Os editores proporão as entidades a serem contempladas, para referendo pela agência financiadora;

4. que haja pontualidade na liberação dos recursos pelos órgãos financiadores. A notificação da aprovação e valor do financiamento deve ser imediata, para fins de planejamento;

5. que a avaliação de revistas científicas da mesma área por parte das agências financiadoras seja feita em conjunto para melhor julgamento;

6. que as agências criem mecanismos de estímulo à publicação, em revistas científicas nacionais, dos resultados dos projetos de pesquisa por elas financiados. Tal estímulo deve ser estendido à publicação de resumos e/ou artigos baseados em teses de pós-graduação;

7. que a FINEP estimule as pequenas e médias empresas nacionais, por ela financiadas, a veicular anúncios de seus produtos nas revistas científicas nacionais;

8. que haja uma maior articulação entre as agências financiadoras.

C. Recomendações aos editores

1. Que as revistas científicas procurem ter uma abrangência nacional;

2. que sejam obedecidos certos padrões editoriais mínimos e normas técnicas, tais como: títulos, legendas, resumos, palavras-chave em português e inglês, bibliografias com dados completos; etc.

3. que a ABEC difunda as revistas científicas nacionais em eventos como feiras de livros, congressos e reuniões;

4. que haja intercâmbio de anúncios padronizados entre as revistas nacionais, bem como com as congêneres do exterior. A ABEC deve estudar a criação de um "pool" de publicidade;

5. que os "referees" recebam os pareceres de outros "referees" quando da apreciação de um mesmo trabalho;
6. que haja maior promoção das revistas nacionais nos países do terceiro mundo, particularmente nos países de língua portuguesa e espanhola;
7. que se organize a administração das revistas e racionalize o trabalho de edição, com a progressiva profissionalização das equipes;
8. que as revistas publiquem o documento final do II Encontro de Editores de Revistas Científicas.

D. Recomendações às agências e aos editores

1. Estimular a existência de pelo menos uma revista científica de bom nível em cada área do conhecimento;
2. maior agressividade e profissionalização na difusão das revistas;
3. no processo de avaliação de pesquisadores, técnicos e professores devem ser consideradas em pé de igualdade suas contribuições em revistas nacionais de bom nível e em revistas internacionais;
4. a regularidade das publicações é uma meta a ser atingida pelas revistas, para aumentar sua credibilidade e possibilitar sua indexação nos órgãos nacionais e estrangeiros;
5. para melhor adequação do percentual financiado pelas agências, os orçamentos devem passar a incluir todos os custos, entre os quais a remuneração dos editores e equipes;
6. os alunos de graduação e pós-graduação devem ser considerados como um público a ser também atingido pela comunicação científica e tecnológica;
7. o II Encontro recomenda que seja constituída no prazo de 60 dias da data deste Encontro uma comissão composta de representantes das agências financiadoras e da Associação Brasileira de Editores Científicos, para elaborar um documento sobre política de publicação técnico-científica no Brasil, a ser amplamente divulgado;
8. os participantes do II Encontro apoiam o projeto de mensalização da Revista "Ciência Hoje".

Grandi, A.C. & Milanez, A.I. - *Allomyces arbuscula* um fungo interessante para aulas práticas. São Paulo, Instituto de Botânica, 22p., ilustr., 1983.

Trata-se de uma publicação do Instituto de Botânica de São Paulo (1983) destinada a professores e alunos do segundo grau, ou mesmo, de universidades e que focaliza de maneira prática e objetiva o ciclo de vida da espécie *Allomyces arbuscula*. Aliada à clareza e boa divisão da matéria exposta, encontra-se incluída uma amostra do fungo, com um ano de validade, e que se destina à demonstração prática de seus diferentes aspectos morfológicos e fisiológicos.

São descritas ainda técnicas de isolamento e de cultura deste microrganismo comumente isolado de amostras de solo, bem como é apresentado pequeno glossário relativo aos termos empregados. Para dinamizar e ampliar as possibilidades didáticas da publicação, seus autores fazem sugestões de novos experimentos, considerando os diferentes fatores abióticos do ecossistema em que vive o fungo.

Pela leitura minuciosa do texto, nota-se que o público alvo é o inerente ao curso secundário, através da forma e conteúdo da matéria exposta. Mas, esta mesma forma e conteúdo são igualmente estimulantes ao público universitário quer seja como exemplo de sistematização de montagem de aulas e demonstrações práticas ou por tratar-se de recurso didático de valia para integrar elenco de medidas pertinentes ao estabelecimento de programa sistematizado para melhoria do ensino da micologia, no território brasileiro.

Adhemar Purchio
 Deptº de Microbiologia
 Instituto de Ciências Biomédicas
 USP
 Av. Prof. Lineu Prestes, 1374/2º
 05508 São Paulo SP

Köhler, H.; Urbain, J. & Cazenave, P.A., eds. - *Idiotipy in biology and medicine*. New York, Academic Press, 445p., 1984.

Este livro constitui-se um excelente apanhado do conhecimento atual sobre idiotipia e suas repercussões em imunologia e biologia de uma maneira geral.

Desde a descrição dos idiotipos, independentemente por Oudin e Kunkel, no início da década de 60, houve grande impulso no interesse desta matéria com os primeiros experimentos de manipulação idiotípica que possibilitaram a elaboração da teoria da rede idiotípica por Jerne na década de 70. O livro é editado pelos alunos destes mestres que levaram o complexo estudo da idiotipia ao estágio atual e condensa com grande propriedade o conhecimento nesta área no ano em que lhe foi atribuído o prêmio Nobel de Medicina, na pessoa de Jerne.

O livro tem três seções: na primeira seção são abordados os conceitos originais de manipulação idiotípica. São aí revistos os dados importantes para o conceito de rede idiotípica. A presença de idiotipos em imunoglobulinas, Células T e outros componentes celulares é analisada. A rede idiotípica é demonstrada por experimentos de imunização sequencial, as interações e as restrições idiotípicas e o controle da resposta imune pelos idiotipos reguladores. O original conceito de idiotipia e imagem interna é aprofundado pelo grupo de Urbain. A seção termina com uma interessante visão teórica das repercussões destas descobertas em que o primeiro autor é o professor Nelson Vaz.

A segunda seção é centrada na função dos idiotipos e antidiotipos na regulação da resposta imune. Os sistemas mais clássicos e melhor estudados aí estão representados como o sistema ARS de Nisonoff e o sistema PC de Köhler que possibilita o estudo das interações de idiotipos em células T e imunoglobulinas.

São em seguida discutidos os efeitos do idiotipo antidiotipo e antígeno na maturação do repertório da célula B e na expressão idiotípica.

Ainda nesta seção, são apresentados dois exemplos de manipulação da expressão idiotípica no adulto. Em um deles, o grupo de Sachs aborda o interesse crescente de idiotipos em transplante de órgãos, resposta contra antígenos do Complexo Maior de Histocompatibilidade e Transplantes.

No outro, Winkler e Urbain apresentam dados em que, após manipulação da resposta, eles conseguem a expressão de um idiotipo desejado e mostram assim que o repertório idiotípico potencial é mais ou menos o mesmo dentro da mesma espécie.

Na 3ª seção o tema idiotipo-antidiotipo é retirada do contexto imunológico e discutido como um princípio mais amplo na manipulação de sistemas biológicos. De especial interesse nesta área está a demonstração que antidiotipos reagem com receptores celulares inclusive mimetizando a ação dos idiotipos.

Já se tornaram clássicos nesta área os experimentos com hormônios, anti-hormônios (idiotipos) e antidiotipos, reagindo com o receptor específico do hormônio. O mesmo se passa com neurotransmissoras, mas também em sistemas vírus/receptor celular. Decorrentes destas observações, três assuntos recebem um grande impulso e são discutidos no livro: a abordagem imunoterápica de deficiências hormonais, com a utilização de anticorpos antidiotípicos; a possibilidade de imunização, usando-se anticorpos antidiotípicos; a explicação de algumas doenças autoimunes, como no caso da miastenia gravis, em que se encontram anticorpos antidiotípicos que podem estar regulando a severidade da doença.

Kunkel termina o livro dando sua visão sobre os anticorpos antidiotípicos humanos e seu papel na fisiologia normal e patológica.

Resumindo, o livro é uma obra importante para imunologistas e outros pesquisadores da área biomédica que queiram conhecer a rede idiotípica e suas relações. O livro aborda aspectos fundamentais, modelos experimentais e suas aplicações.

Jorge Kalil
Laboratório de Imunogenética Humana
Faculdade de Medicina USP
Av. Dr. Amalardo, 455/3º
01246 São Paulo SP

Interciência, 6(1):1-64, 1981.

Interciência, é uma revista sobre política de ciência e tecnologia e artigos de revisão científica.

A publicação conta com seções de notícias como reuniões científicas, convênios, cursos, excursões técnicas e notas sobre cientistas em destaque e parte da revista trata de crítica de livros técnicos sobre ciência e tecnologia.

Finalmente, algumas piadas, relacionadas com a tecnologia procuram deixar a publicação mais leve e as instruções aos autores são dadas na última página.

Os interessados em publicar nessa revista, devem escrever artigos dirigidos a audiência não especializada da América, em especial América Latina. Principais assuntos: alimentos e nutrição, energia, problemas demográficos e de saúde, terras áridas e bosques tropicais, ecologia e problemas do meio ambiente, política científica, transferência de tecnologia, recursos renováveis e não renováveis, educação científica, hidrologia e ciência do mar.

O autor deve ainda, mandar o curriculum resumido (até 6 linhas) e sugerir nomes ao qual seu trabalho será submetido para apreciação.

O Brasil (SBPC), o Canadá (SCITEX), a Colômbia (ACAC), a Jamaica (The Jamaican Society of Scientists and Technologists), o México (Conacyt), os Estados Unidos (AAAS), a Venezuela (ASO VAC) e a Costa Rica (CONICIT), participam do corpo editorial da revista.

No número examinado, os artigos são escritos em português e espanhol, com resumo em inglês. O texto em português e espanhol é dispensável, uma vez da semelhança das línguas.

É possível assinar a revista pagando em cruzados a/c Deise Bergen, Caixa Postal 14564, 22510 Rio de Janeiro RJ.

É lamentável que a revista enviada para análise seja antiga (1981, vol. 6, nº 1).

Vera Lúcia R. Bononi
Instituto de Botânica
Caixa Postal 4005
01000 São Paulo SP

Losick, R. & Shapiro, L. - Microbial development. New York, Cold Spring Harbor Laboratories, 303p., 1984. US\$33.60.

Esta monografia é uma coletânea de textos escritos por diferentes autores, baseada na Conferência sobre Desenvolvimento Microbiano, realizada no Cold Spring Harbor Laboratory, na primavera de 1983. O principal objetivo do livro é dar uma visão integrada dos fenômenos relacionados com a diferenciação celular, com a comunicação célula-célula e com a morfogênese, empregando diferentes modelos experimentais em microrganismos. O livro aborda os seguintes tópicos: regulação da diferenciação celular em *Caulobacter crescentus*; morfogênese e *Escherichia coli*; formação de endosporos em *Bacillus*; diferenciação morfológica e fisiológica em *Streptomyces*; mecanismos de adaptação sensorial no crescimento superficial; feromonas sexuais e a transferência de plasmídeos em *Streptococcus faecalis*; vias do desenvolvimento em leveduras; regulação do desenvolvimento multicelular em *Myxobacteria*; desenvolvimento do *Dictyostelium discoideum*; quimiotaxia, adesão célula-célula e expressão gênica; padrão de formação em *Dictyostelium*; genética do desenvolvimento da simbiose *Rhizobium/leguminosa*.

O livro prove uma excelente revisão das pesquisas realizadas no campo do desenvolvimento microbiano, reunindo em um único texto, os dados que de outra maneira estariam esparsos na literatura especializada. O livro é importante para aqueles que trabalham em fisiologia e genética de microrganismos, não só porque aborda o

conhecimento já adquirido na expressão gênica dos processos de desenvolvimento, como aponta os aspectos ainda não esclarecidos dos eventos moleculares envolvidos na diferenciação e comunicação celulares.

Glaci T. Zancan
 Deptº de Bioquímica UFPR
 Caixa Postal 939
 80000 Curitiba PR

PID-Microbiologia Região Sul

O Programa Institucional de Desenvolvimento da Microbiologia (PID-Microbiologia) foi criado pela SBM com a finalidade de promover a articulação regional de microbiologistas e indicar grupos de profissionais e instituições de pesquisa e desenvolvimento, a serem preferencialmente apoiados por agências de financiamento.

Em 1983, a FINEP aprovou a abertura de linha de crédito para implantação de projetos específicos.

O PID-Sul foi o primeiro projeto a ser implantado, abrangendo os Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

O projeto foi idealizado com base em dois aspectos fundamentais: delineamento da oferta, real e potencial, de C&T existente na região estudada; e identificação da demanda de C&T por instituições governamentais e pelo setor privado.

Foi elaborado questionário para delineamento da oferta que, uma vez respondido pelos especialistas consultados, possibilitaria obter informações sobre as atividades de pesquisa e desenvolvimento em andamento e as atividades que, na opinião pessoal dos microbiologistas consultados, deveriam ser financiadas e institucionalmente apoiadas pelas agências.

O questionário foi enviado para 500 microbiologistas e instituições, sediados na Região Sul do País.

No total foram respondidos 73 questionários. Este número, no entanto, não pode ser considerado representativo para delineamento do perfil regional de profissionais atuantes em microbiologia.

Mesmo assim, os resultados foram tratados e somados à demanda, identificada por trabalho interno efetuado pela SBM.

Documento foi enviado à FINEP contendo todas as informações a respeito da implantação do PID-Sul e manifestação da SBM. Houve desinteresse de profissionais e instituições para manifestarem-se, deixando assim de fornecer subsídios que pudessem servir na orientação e indicação das linhas de trabalho, a serem apoiadas e financiadas pela FINEP.

Tendo em vista os resultados insatisfatórios do PID-Sul, a FINEP decidiu encerrar o PID-Microbiologia, por sugestão da própria SBM.

A SBM agradece a participação dos profissionais que contribuíram para a implantação do PID-Sul e lamenta que a experiência não tivesse resultado em uma ação de efetiva intervenção da comunidade em sua maior representatividade.

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

IV Encontro Nacional de Micotoxinas. São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, 12 a 14 de maio de 1986.

Os Encontros Nacionais de Micotoxinas, fazem parte do Programa Nacional de Monitoração e Controle de Micotoxinas - PMC-Micotoxinas, programa da Sociedade Brasileira de Microbiologia, que tem como objetivos principais: proteger a saúde humana e animal, conscientizando as autoridades competentes; garantir que os

produtos oferecidos à exportação não sejam rejeitados pelos países importadores; promover um sistema de esclarecimento, educação e treinamento a diversos níveis de: agricultor, processador, revendedor e consumidor.

O programa do IV Encontro Nacional de Micotoxinas, versou sobre os seguintes tópicos: Métodos analíticos de micotoxinas; métodos de análise de micotoxinas; condições técnicas e científicas para um laboratório credenciado; legislação de micotoxinas e política de atuação governamental e diretrizes do Programa Nacional de Micotoxinas.

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

Silhavy, T.J.; Berman, M.L. & Enquist, L.W. - Experiments with gene fusions. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 303p., 1984. US\$ 48.00.

Trata-se de um manual de laboratório, descrevendo experimentos sobre fusão de genes, elementos de transposição e métodos de DNA recombinante em *Escherichia coli*. O manual que tem sua origem no Curso Avançado de Genética Bacteriana ministrado pelo Cold Spring Harbor Laboratory, no período de 1981 a 1983, é constituído de uma parte introdutória, uma experimental e uma de procedimentos, além dos apêndices.

Na seção experimental são descritos 14 experimentos sobre fusão de genes, sendo as etapas de execução, relacionadas a cada dia. Cada experimento é precedido por uma revisão atualizada do assunto, abordando pontos importantes para a compreensão do experimento. As informações são claras, mas exigem do leitor o conhecimento básico do assunto.

Na seção de procedimentos são apresentados 54 técnicas onde são descritos os métodos básicos de genética de bactérias e de fagos, de preparação e transferência de DNA e de bioquímica de DNA e proteínas.

No final da maioria dos procedimentos são colocadas observações que orientam o leitor para aspectos importantes do procedimento. Nestas observações, incluem-se cuidados com certos produtos. É o caso do Procedimento 21, que trata de utilização da nitrosoguanidina como agente indutor de mutações. Os autores lembram que a nitrosoguanidina é um potente agente mutagênico, recomendando muito cuidado no seu manuseio. Chamam ainda atenção, para que se faça a neutralização da nitrosoguanidina em condições ácidas e não em condições alcalinas, como tem sido comumente feito. Explicam que a inativação da nitrosoguanidina em condição ácida produz ácido nitroso, um agente mutagênico fraco e não volátil, ao passo que a inativação em condição alcalina leva a formação do diazometano, que é um potente agente mutagênico volátil.

A seção de apêndices é extensa, abordando 16 tópicos como composição dos meios de cultura e soluções padrões, crescimento e conservação de *Escherichia coli* e fago lâmbda, veículos de clonagem, regulons, etc.

A citação bibliográfica é extensa, pertinente e atualizada, incluindo vários trabalhos de 1984, ano de publicação do manual.

O manual possui ainda uma relação das estirpes bacterianas e bacteriófagos com a caracterização genotípica e um index é de grande utilidade para a localização dos assuntos.

Embora o manual seja apresentado em encadernação com garras, ele é resistente ao manuseio constante, em razão da qualidade apropriada do papel. A apresentação gráfica é muito boa.

A leitura atenta do manual revela a existência de alguns erros de menor importância que poderiam ter sido evitados por uma revisão gráfica mais rigorosa. Como exemplo citam-se: Página xiii... "*Serratia marcescens*" ao invés de "*Serratia marcescens*"; página 14... Day 2... (see procedure 13, p.79) ao invés de (see procedure 13, p.113); página 23... (see appendix J, p.263) ao invés de (see appendix J, p.253);

página 139...Notes ...§2º ... "increase the incubation at 50°C in step 4 of Day 2 to 60 min.", sendo que na "step 4 of day 2" consta a mesma informação "Heat at 50°C for 60 min.". Estes pequenos erros não prejudicam a qualidade do manual e poderiam ser corrigidos pela publicação de uma errata.

O alto padrão de qualidade das publicações do Cold Spring Harbor Laboratory é refletido novamente neste manual. Ele se adiciona à bem sucedida série de manuais, iniciada em 1972 com o de J.H. Miller (Experiments in molecular genetics).

Em resumo, o manual está muito bem escrito, apresentando os diferentes tópicos de forma clara. Pode servir como referência em laboratórios interessados no desenvolvimento de trabalhos com DNA recombinante.

Walter Vieira Guimarães
Deptº de Biologia Geral
Universidade Federal de Viçosa
36570 Viçosa MG

Visita do Professor James M. Trappe, através do LAPP - Latin American Professorship Program

O Instituto de Botânica receberá, nos meses de julho e agosto de 1986, o Dr. James M. Trappe, da U.S. Department of Agriculture Forest Service, Corvallis, Oregon, USA, que ministrará curso sobre Ecto e Endo-micorrizas e oferecerá assessoria científica aos projetos da área.

São previstas quinze vagas para o curso, que receberá interessados de todo o Brasil, desde que: tenham bom conhecimentos da língua inglesa e estejam desenvolvendo projetos específicos da área. Maiores informações poderão ser obtidas com Dra. Vera Lúcia Ramos Bononi, no Instituto de Botânica, fone: 275-3322, Ramais 13, 17 ou 71.

A vinda do Prof. Trappe foi patrocinada pelo LAPP - Latin American Professorship Program, da American Society for Microbiology. O programa, no Brasil, é representado pela Sociedade Brasileira de Microbiologia, que fornece informações e formulários aos interessados. Diversas propostas estão sendo encaminhadas ao Dr. Jorge Guerrero, membro do Comitê do LAPP, que cuida dos projetos da ASM para o Brasil.

Rosely Ana Piccolo Grandi
Instituto de Botânica
Caixa Postal 4005
01000 São Paulo SP

PRODUÇÃO DE BIOGÁS A PARTIR DE RESÍDUOS ORGÂNICOS

De 6 a 17 de dezembro de 1982, a SBM - Sociedade Brasileira de Microbiologia e o CLAMA - Comitê Latino Americano de Microbiologia Ambiental realizaram o I Simpósio 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 iniciou a divulgação de informações fornecidas pelos autores, através da Revista de Microbiologia.

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

CONSTRUÇÃO DE BIODIGESTORES E ADAPTAÇÃO DE EQUIPAMENTOS PARA USO COM BIOGÁS

Paulo Penido Filho

Empresa Brasileira de Biodigestores Ltda. EMBRABI
Rua São Paulo, 401 sala 105
30000 Belo Horizonte MG, Brasil

Antes de entrar na parte de construção dos biodigestores, gostaria de tecer alguns comentários sobre a utilização dos resíduos como combustíveis. O sistema de produção de gás e de fertilizante através dos biodigestores é conhecido desde o início do século, porém o seu uso, foi muito restrito, devido ao desconhecimento técnico sobre o assunto.

A partir da década de 1930 os estudos se ampliaram, iniciando-se a formação e produção a céu aberto de adubos biodigeridos, sem o aproveitamento dos gases produzidos.

A transformação dos materiais orgânicos em adubo, através de decomposição aeróbica era feita em cubas abertas de alvenaria chamada Becari.

Após o final da década de 1930 a Índia começou os trabalhos no sentido de fomentar esta nova fonte energética, inspirada nos trabalhos iniciados na Alemanha.

No Brasil, os estudos para implantação dos biodigestores foram iniciados de maneira decisiva em 1976, com a criação do Programa Nacional de Biogás.

Em termos gerais o sistema de biodigestores pode ser considerado como a alternativa energética de maior valor econômico existente, principalmente para os países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, uma vez que a matéria prima utilizada é aquela considerada descartável e sem valor.

A produção de biogás através dos biodigestores, sem dúvida alguma tem grande aplicação no campo prático e, se fomentada, trará vantagens para o Brasil, tanto no campo técnico como no sócio-econômico.

As principais vantagens dos biodigestores no setor sócio-econômico são: a. auxiliar no saneamento básico pela eliminação da maioria dos germes patogênicos transmissores de doenças animais e humanas; b. melhorar a produtividade das culturas pela utilização do biofertilizante; c. reduzir o risco de doenças nas culturas pelos mesmos fatores de eliminação de germes e vírus patogênicos; d. reduzir a proliferação de ervas daninhas pela eliminação das sementes destas plantas; e. evitar o desmatamento pela diminuição da necessidade de produção de energia pela queima de lenha; f. criar novos empregos sejam na área de construção como na de manutenção de equipamentos; g. fomentar o crescimento da renda interna uma vez liquidado o investimento básico (menos de 1 ano) com a obtenção de energia e fertilizante a baixíssimo custo; h. aumentar o conforto do produtor rural pela utilização de equipamentos

domésticos modernos movidos diretamente a biogás ou através da sua transformação em energia elétrica; i. economia de divisas pela substituição de importação de petróleo e derivados; j. diminuir parasitoses humanas pela eliminação de ovos e larvas no biodigestor.

No campo técnico as vantagens dos biodigestores são: a. matéria prima do biogás é comum no meio rural, quase sempre não utilizada; b. a produção de biofertilizante considerado como o tipo ideal para nossa produção agrícola; c. viável a qualquer tamanho considerando a necessidade da propriedade rural; d. matéria prima abundante e inesgotável; e. simplicidade do sistema não necessitando de técnica especial; f. alta segurança - produção de gás a baixa pressão; g. manutenção - desnecessária; h. alta durabilidade - vida útil mínima de 50 anos; i. facilidade de utilização - usando materiais simples e baratos; j. funcionamento contínuo - sem necessidade de tecnologia especial.

É importante salientar que o potencial energético brasileiro relativo aos biodigestores é de considerável dimensão.

Se considerarmos que todos os resíduos agrícolas e pecuários aproveitáveis e o lixo urbano fossem utilizados como matéria prima nos biodigestores, teríamos a seguinte produção de gás:

Tipo de resíduo ou dejetos	Equivalência em ton. petróleo
Pecuária	19 x 10 ⁶
Agricultura	21 x 10 ⁶
Lixo urbano	8 x 10 ⁶
Total	48 x 10 ⁶

Esta produção é quase 5 (cinco) vezes a atual produção brasileira de petróleo.

Além desta produção de gás combustível os biodigestores produziram 2,2 bilhões de toneladas de biofertilizante, o que representa o seguinte:

Nitrogênio	40 milhões de toneladas
Fósforo	44 milhões de toneladas
Potássio	27 milhões de toneladas
Total	111 milhões de toneladas

Estes valores, atualmente perdidos, representam 36,3 vezes o consumo brasileiro de fertilizantes, sendo que o Brasil atualmente produz somente 50% do consumo, importando o restante.

A título ilustrativo, em 1978, o Brasil dispendeu cerca de 600 milhões de dólares com a importância de fertilizante, o que vale afirmar que, além de reduzir a importação de petróleo, a construção de biodigestores deverá reduzir a importação de fertilizantes.

É claro que o aproveitamento total dos resíduos tanto no campo agrícola como pecuário seria uma utopia, porém, o potencial efetivamente explorável é bastante representativo e não pode deixar de ser considerado.

Outro fator importante que deve ser salientado, é que hoje existe no Brasil mais de 5 milhões de propriedades rurais, sendo que somente 5% possuem eletrificação, o que coloca a opção "biodigestor" usado como energia alternativa, um meio fácil para que os proprietários rurais possam desfrutar do mesmo conforto que o homem da cidade.

É importante salientar que diversos países possuem experiência no campo desta nova fonte de energia e os resultados dos programas estão superando as previsões mais otimistas.

Entre os países que estão fomentando a implantação de biodigestores pode-se citar a Índia, que em 1974 já possuía 9.000 biodigestores instalados, e até 1985 deverão ser instalados cerca de 180.000 biodigestores e, a China, que em 1973 já possuía 30.000 biodigestores instalados passando a cerca de 200.000 unidades em 1974 e 5.800.000 em 1978, com metas prioritárias do governo daquele país de instalar, até 1985, cerca de 70.000.000 de biodigestores.

No Brasil, além do baixo risco de ampliação de um programa para instalação de biodigestores, devido à experiência em outros países, é importante dizer que nosso país é um dos poucos do mundo que reúne simultaneamente os principais pré-requisitos para a implantação de biodigestores em grande escala.

Entre estes pré-requisitos podemos citar: grande extensão rural; grande potencial agrícola; grande potencial pecuário; clima quente; sol abundante; temperatura

elevada no inverno; poucas variações de temperatura durante o dia.

Como foi mencionado anteriormente, através dos biodigestores podemos obter o biogás, e os biofertilizantes.

O biogás, graças ao seu alto poder calorífico 6.500Kcal/m³ possui cerca de 60% de metano (CH₄) 40% de gás carbono (CO₂) e traços de hidrogênio, nitrogênio e gás sulfídrico e substitui perfeitamente outros combustíveis, sendo usado para: cozinhar - utilizado em fogões; secar grãos - utilizado em queimadores; aquecer água para banho (utilizado em aquecedor de gás); alimentar incubadeiras; acionar geladeiras movidas a gás; aquecer ferro de passar roupa (a gás); alimentar moto-bombas e moto-geradores; alimentar motores estacionários (utilizado em capineiras, moinhos etc); alimentar motores dos auto-veículos.

Quanto a utilização do biogás em motores estacionários, gostaria de salientar o pioneirismo da EMBRABI (Empresa Brasileira de Biodigestores), que projetou e fabricou o maior moto-gerador já existente, alimentado 100% a biogás.

Atualmente já existe várias unidades em funcionamento, entre elas posso citar as fornecidas a EMBRAPA, para os centros de Sete Lagoas e de Belém do Pará.

Tais unidades têm uma potência de 30.000 watts sendo o seu consumo específico de 0,5m³/h para cada KW fornecido.

Quanto ao fator segurança, o biogás proveniente dos biodigestores, apresentam um menor risco do que o gás convencional, pois é utilizado sob baixa pressão (variando de 15 a 30cm "c.a") e as recomendações normais de uso são simples e igualmente seguros.

Para se ter uma idéia de potencialidade do biogás, podemos dizer que 1m³ deste gás é equivalente a: 0,62 litros de gasolina; 0,58 litros de querosene; 0,56 litros de óleo diesel; 1,1 litros de álcool etílico; 1,4 litros de álcool metílico; 0,42kg de GLP; 0,48kg de óleo combustível; 2,54kg de lenha (10% unidade); 3,4kg xisto; 6,9 KWH transformação direta; 1,7KWH através de grupo gerador; 1,5kg de carvão vegetal.

Podemos dizer que o consumo médio de biogás quando em equipamentos funcionando 100% a biogás é relativamente pequeno, o que faz com que a opção biodigestor, principalmente para o proprietário rural carente de energia elétrica seja bem vantajosa.

Podemos citar aparelhos alimentados a biogás, onde se pode comprovar este baixo consumo: para iluminação é gasto 0,07m³ por lâmpião/hora; para cozinhar é gasto 0,23m³ por pessoa/dia; para incubadeira é gasto 0,60m³ incubadeira/hora; para geladeira é gasto 2,5m³ dia; para chuveiro a gás é gasto 0,80m³ pessoa/banho; para aquecimento d'água 100°C é gasto 0,80m³/litro.

Em outras palavras, podemos dizer que um biodigestor de 10m³ é suficiente para satisfazer as necessidades de uma família de 6 pessoas para cozinhar, ter geladeira, iluminação, banho quente, etc, e para alimentá-lo somente o esterco produzido por 7 bovinos (semi-estabulado) ou 20 suínos.

Além do gás combustível este biodigestor produzirá diariamente 200kg de biofertilizante.

Quanto as características do biofertilizante, podemos dizer que ele tem vantagens de considerável dimensão entre elas podemos citar: não tem cheiro (não atrai moscas); isento de sementes e ervas daninhas; isento de agentes causadores de doenças; rico em nutrientes; ótimo fertilizante orgânico; conserva 99% do nitrogênio presente no material original; corresponde a 70% da matéria orgânica introduzida nos biodigestores.

Possui o seguinte NPK: N = 1,4 a 1,8; P = 1,1 a 2,0; K = 0,8 a 1,2.

Entre as principais vantagens dos biofertilizantes podemos citar: a. funciona como corretor de acidez do solo, através da eliminação do alumínio tóxico e liberação do fósforo dos sais insolúveis; b. possui partículas coloidais carregadas negativamente; c. possui alto poder de fixação de sais; d. melhora a estrutura e textura do solo; e. torna o solo mais fácil de ser trabalhado; f. facilita a penetração das raízes no solo; g. protege o solo contra a erosão hídrica; h. promove absorção da água mais rapidamente; i. conserva a umidade por mais tempo; j. estabiliza os agregados; k. permite maior aeração do solo; l. favorece a multiplicação de bactérias fixadoras do nitrogênio com melhor aproveitamento de sais minerais; m. fácil aplicação, seja em forma líquida ou em pó; n. se encontra completamente curado; o. não tem cheiro; p. não produz ácido oxálico (não mais fermenta); q. não oferece

condições de multiplicação de insetos; r. pode ser aplicado em qualquer quantidade, s. serve para alimentação de peixes.

A primeira vista parece que é necessário uma grande quantidade de resíduos orgânicos para se produzir 1 metro cúbico de biogás, mas na realidade isso não acontece (Tabela 1).

Produção de gás de resíduos

Pode-se considerar como média a produção abaixo:

Tipo de resíduo	Biogás - Litro/Kg
a. Resíduos vegetais com folhas e frutas in natura	35
b. Resíduos vegetais com folhas e frutas secas	350
c. Palha de arroz	110
d. Resíduos de frigoríficos (úmidos)	70
e. Lodo primário	28
f. Lixo (parte orgânica)	75
g. Lixo + lodo primário	155

A tecnologia de um biodigestor parece simples mas na realidade não é. Para que um biodigestor tenha um alto rendimento é necessário que sejam analisados acuradamente os seguintes fatos:

a. Condições ambientais - Algumas das quais podem ou não favorecer o rendimento dos biodigestores.

As bactérias devem estar na temperatura onde sua multiplicação seja a maior, com isso o biodigestor terá um maior rendimento.

A temperatura ideal dos microrganismos variam em função do seu tipo que podem ser: para as termofílica - maior que 45°C; para as mesofílica - entre 20 a 45°C; para as psicofílica - menor que 20°C;

b. Operação do sistema - A operação do biodigestor apesar de simples de ser realizada é muito importante, porque o desconhecimento ou desleixo poderá levar a paralisação do biodigestor.

c. Natureza da matéria-prima - A matéria-prima, conforme foi ilustrado anteriormente, dependendo da sua procedência possibilitará uma maior ou menor produção de biogás.

d. Projeto do biodigestor - Dos quatro fatores que incidem sobre o rendimento de um biodigestor, o projeto é o mais significativo. Um biodigestor mal projetado terá além de um baixo rendimento, uma série de outros inconvenientes entre eles a própria paralisação de produção do gás.

Do ponto de vista do projeto físico, um biodigestor do tipo indiano, deve possuir no mínimo as seguintes características para que tenha um bom funcionamento:

a. Possuir um misturador de biomassa - O misturador de biomassa, é um equipamento, sem o qual ocorrerá a estratificação da matéria orgânica, podendo provocar a paralisação do funcionamento do biodigestor.

O uso constante do equipamento, promove uma temperatura uniforme na biomassa, aumentando a produtividade do biodigestor.

Tabela 1 - Produção de biogás de dejetos animais.

Fonte	Disponibilidade kg/cabeça/dia	Biogás litro/kg	Biogás litro/kg
Bovino *	10	37	370
Bovino **	25	37	555
Bovino ***	40	37	1480
Suíno	2,3	60	140
Galinha	0,15	80	12
Ganso-Peru	0,23	80	18
Fezes humanas	0,40	71	28
Caprinos	1,0	50	50
Equinos	12	35	420

Além destas características retro-mencionadas, a agitação da biomassa se faz necessária devido ainda aos seguintes fatores: evita que ocorra a formação de bolhas isolantes em torno das bactérias; faz com que o substrato fique em contato direto com as bactérias; distribui uniformemente os produtos intermediários e finais da biodigestão; reduz a camada de lodo na parte superior do digestor.

b. Possuir um quebra crosta - O quebra crosta é outro equipamento que sem o qual haverá formação de uma crosta na superfície da biomassa que provocará a paralisação do funcionamento do biodigestor.

c. Selo de água - Equipamento a ser exigido no sentido de evitar a proliferação de moscas e outros insetos no interstício do gasômetro e a parede do biodigestor e também para separar a matéria em fermentação bacteriana do meio ambiente.

Outra grande particularidade do selo d'água é de evitar que a câmpanula sofra agarramento o que fará com que a pressão no seu interior varie.

A constância da pressão é muito importante no caso da utilização do biogás para alimentar os moto-geradores, porque pequenas variações na pressão do biogás provocará formações no funcionamento do motor, por conseguinte, a ciclagem do gerador não será constante.

d. Sonda lateral de gás - No sentido de evitar a existência de tubo flexível ligado à câmpanula, por ser susceptível de rupturas constantes. É importante também que seja adicionado purgador especial com a finalidade de retirar a umidade do gás produzido. Para finalizar, gostaria de deixar patente nossa confiança no Programa Nacional de Biogás, e uma demonstração dessa confiança é o esforço que a EMBRABI - Empresa Brasileira de Biodigestores vem fazendo no campo dessa energia alternativa, procurando aperfeiçoar cada vez mais os projetos dos seus biodigestores e dos seus equipamentos alimentados a biogás. Estamos plenamente convencidos que a implantação de biodigestores em larga escala trará benefícios de consideráveis dimensões para o Brasil.



Fotoitos e Impressão

 **GRÁFICA
EDITORA
HAMBURG**

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

