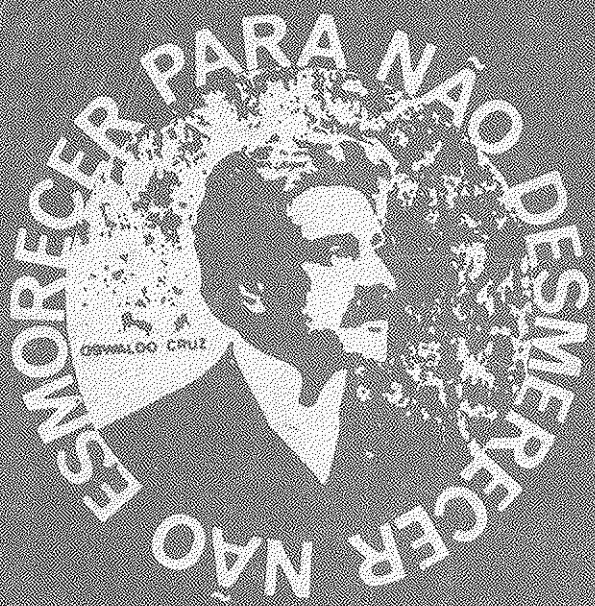


Revista de Microbiologia



SBM

São Paulo — Brasil

Sociedade
Brasileira de
Microbiologia

Volume 18 Número 1 Jan.-Mar. 1987

Instruções aos autores

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

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

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

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

NOMENCLATURA DE MICRORGANISMOS — A combinação binomial, nome do gênero seguido do da espécie, é adotada e a nomenclatura apresentada no "Berger'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 triplio, 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.

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

Exemplo:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo — Brasil

Conselho Diretor Luiz Rachid Trabulsi, Italo Suassuna, Wilson Chagas de Araujo e João Salvador Furtado

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

Aquisição por não-membros Assinatura anual para quatro números 5 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 Milton de Uzeda Instituto de Microbiologia UFRJ Centro de Ciências da Saúde Bloco I — Ilha do Fundão 21941 Rio de Janeiro RJ	Vice-Presidente Flávio Alterthum Instituto de Ciências Biomédicas USP Deptº de Microbiologia Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 05508 São Paulo SP
	Secretário Geral Leonardo Perego Jr. Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP Cidade Universitária 05508 São Paulo SP	Tesoureiro Walderez Gambaie Instituto de Ciências Biomédicas USP Deptº de Microbiologia Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 05508 São Paulo SP

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

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

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

Atlas Indústrias Químicas S.A.
Coca-Cola Indústrias Ltda.

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

Henkel S.A. Indústrias Químicas

Indústrias Químicas e Farmacêuticas Schering S.A.

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

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

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA
VOLUME 18 JANEIRO-MARÇO 1987 NÚMERO 1
REV. MICROBIOL. (S. PAULO), 18(1)

CONTÉUDO

Hofer, E.	1	Vibrio cholerae não 01 associado à infecção entérica humana no Estado da Bahia, Brasil	CONTENTS Non-01 <i>Vibrio cholerae</i> associated with human infection in the State of Bahia, Brazil
Yoshida, C.F.T.; Nogueira, R.M.R.; Mercadante, L.A.C.; Pinkão, A.T.; & Schatzmayr, H.G.	5	Seroepidemiologia das hepatites A e B, citomegalovírus e herpes simplex tipo 2 em doadores de sangue primários do Rio de Janeiro, Brasil	Seroepidemiological survey of hepatitis A and B cytomegalovirus and herpes simplex type 2 in prime blood donors from Rio de Janeiro, Brazil
Montassier, H.J.; Richtzenhain, L.J.; Samara, S.I.; & Pinto, A.A.	12	Aplicação de uma técnica de ELISA ("Enzyme-Linked Immunosorbent Assay") no diagnóstico direto do vírus da febre aftosa	Application of a solid Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the direct diagnosis of foot and mouth disease virus
Mendes, E.N.; Queiroz, D.M. de M.; Cisalpino, E.O.; Peres, J.N.; Penna, F.J.; & Figueiredo F., P.P.	25	Ocorrência de <i>Campylobacter jejuni</i> em crianças com e sem diarréia, em Belo Horizonte	<i>Campylobacter jejuni</i> isolated from children with acute diarrhoea
Serpantino, A.H.; Santos, M.A.A. dos; Mós, E. do N.; & Ferreira, C.S.	31	Método quantitativo para avaliação da placa dental	Dental plaque evaluation by quantitative method
Assis, J.P. de; Guimarães, W.V.; Borges, A.C.; Araújo, E.F. de; & Silva, D.O.	34	Transferência de plasmídios e de marcas cromossômicas em <i>Zymomonas mobilis</i>	Plasmids and chromosome transfer in <i>Zymomonas mobilis</i>
Nascimento, G.G.F. do; & Tavares, F.C.A.	41	Transformação com genes Nif em <i>Azotobacter paspali</i>	Transformation with nif genes in <i>Azotobacter paspali</i>
Araújo, E.H. de; & Schmidell Netto, W.	46	Energia de desativação de amiloglicosidase em solução de amido	Deactivation energy for glucoamylase on soluble starch
Alterthum, F.; & Cruz, M.R. de M.	52	Aumento do rendimento da fermentação alcoólica pela adição de óleo de soja	Yield increase in alcoholic fermentation by the addition of soybean oil

Braga, V.M.M.; & Nicoli , J.R.	58	Influência da inoculação de esporos ou micélio de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> em fermentação em meio sólido de resíduo de capim Napier (<i>Pennisetum purpureum</i> Shumaker)	<i>Influence of spore and mycelium inoculation of Phanerochaete chrysosporium on solid-state fermentation of Napier grass (<i>Pennisetum purpureum</i> Shumaker) residue</i>
Tauk, S.M.; & Ruegger, M.S.	67	Alguns aspectos da microbiota do solo sob vegetação de cerrado, tratado com vinhaça, no Município de Corumbataí, SP	<i>Aspects of microflora in soil under "cerrado" vegetation, treated with vinasse in Corumbataí, São Paulo, Brazil</i>
Nahas, E.; & Arai, N.N.S.	77	Crescimento e esporulação de <i>Beauveria bassiana</i> em vários meios e condições de cultivo	<i>Growth and sporulation of Beauveria bassiana in different media and culture conditions</i>
Fonseca Netto, G.S.O. da & Rosato, Y.B.	83	Influência de fatores de nitrogênio no desenvolvimento de duas linhagens de <i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Influence of nitrogen source on development of two strains of Aspergillus nidulans</i>
Minhoni, A.T. de A.; & Cerri, C.C.	87	Aplicação da radiação gama na determinação da biomassa microbiana de um solo incorporado com vinhaça	<i>Gamma radiation application for microbial biomass determination in a soil incorporated with distillery wastewater</i>
Landgraf, M; & Falcão, D.P.	93	Isolamento de <i>Yersinia</i> sp. em alimentos diversos	<i>Isolation of Yersinia spp. from foods</i>
Franco, B.D.G. de M.; Landgraf, M.; Shimokomaki, M.; & Azevedo, C.H.M. de	98	Condições higiênico-sanitárias do charque comercializado em São Paulo, Brasil	<i>Hygienic quality of charqui</i>
Panno, L.C.; Ojeda A., S.; & Pinto, V.O.	103	Aislamiento e identificación de enterobacterias en lechugas (<i>Lactuca sativa</i>) cultivadas en la ciudad de Valdivia, Chile	<i>Isolation and identification of enteric bacteria from lettuce (<i>Lactuca sativa</i>) cultivated in the town of Valdivia, Chile</i>

VIBRIO CHOLERAE NÃO 01 ASSOCIADO À INFECÇÃO ENTÉRICA HUMANA NO ESTADO DA BAHIA, BRASIL

Ernesto Hofer

Deptº de Bacteriologia
Instituto Oswaldo Cruz Fiocruz
Caixa Postal 926
21041 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Resumo

Em 76 espécimes fecais provenientes de pessoas envolvidas em um surto de gastroenterite, ocorrido em 1974, que atingiu várias localidades do sul da Bahia, foram reconhecidos cinco portadores de *V. cholerae* não 01 (sorotipo 10). A bactéria só foi isolada de pacientes da cidade de Teixeira de Freitas, sendo também detectada em água de consumo, indicando, provavelmente, sua transmissão por veiculação hídrica. Uma das amostras, oriunda de criança de dois anos, revelou-se enterotoxigênica, caracterizada através da técnica de ligadura de alça intestinal de coelho e no ensaio com as células Y1.

Summary

Non-01 Vibrio cholerae associated with human enteric infection in the State of Bahia, Brazil

Among 76 fecal samples from people involved in an outbreak of gastroenteritis occurred in 1974 reaching several localities in the south of Bahia State, five holders of non-01 *Vibrio cholerae* (serovar 10) were recognized. The bacteria was isolated only from stools collected in Teixeira de Freitas City, being also detected from contaminated drinking water showing, therefore, the possibility of a waterborne infection. A strain isolated from a two years child was characterized as enterotoxigenic by the rabbit ligated gut loops test and by the Y1 adrenal cells assay.

Introdução

Em várias partes do mundo, foram documentadas condições patológicas na espécie humana, atribuídas a *Vibrio cholerae* não 01 (1, 10). Geralmente, o quadro clínico mais referido denota a atuação da bactéria no trato entérico, exteriorizando-se pela síndrome diarréica, embora outras localizações tenham sido mencionadas (1).

Tais microrganismos, também denominados, genericamente, como "vibrios não coléricos" (VNC) ou "não aglutináveis" (NAG), atualmente pertencem a espécie *V. cholerae* (8), representando 74 sorotipos (serovars), diferenciados por抗ígenos somáticos (12, 13).

Na América do Sul, em particular no Peru, foi relatado o isolamento desta bactéria de cinco crianças acometidas de diarréia (9). Quanto ao problema no Brasil, sua descrição se concentrou exclusivamente em águas de esgoto (6) e em águas e moluscos marinhos (11). Baseado nessa circunstância, relata-se a ocorrência de *V. cholerae* não 01 em algumas pessoas envolvidas em um surto de gastroenterite, que grassou no sul do Estado da Bahia, em 1974.

Material e Métodos

Considerações gerais - Em meados de junho de 1974, foi notificado um surto de diarréia na população da cidade de Caravelas, e que, posteriormente, se propagou para outras localidades: Alcobaça, Eunápolis, Itamaraju, Itapebi, Juerena, Porto Seguro, Prado e Teixeira de Freitas. Os casos ocorreram, indistintamente, nas várias faixas etárias, observando-se que as características clínicas, mais específicas da doença, foram um tanto negligenciadas, com raras anotações sobre a natureza da diarréia (aquosa ou muco-sanguinolenta).

Amostras analisadas - Obteve-se 76 espécimes fecais de indivíduos portadores de diarréia e em fase de recuperação, que foram conservados e transportados em meio de Cary & Blair. Além disso, recolheram-se 12 amostras de água de consumo (cisterna, fonte, pого e cacimba); 2 de águas de valas e 8 de crustáceos (siri e camarão), provenientes de Caravelas, Barra de Caravelas e Teixeira de Freitas. O material líquido foi encaminhado em volumes de 200 a 300ml, acondicionado em frascos esterilizados e os crustáceos, em sacos plásticos individuais, todos mantidos sob refrigeração, durante o transporte até o laboratório, que não ultrapassou 20 horas.

Isolamento e identificação - Na pesquisa de enterobactérias patogênicas, nos diferentes espécimes, foram adotados os esquemas referidos por Costa & Hofer (3) e Edwards & Ewing (5). Para a detecção de víbrios, utilizou-se as semeaduras direta e, após enriquecimento de 12h, a 37°C, em água peptonada alcalina, pH -8,5, em ágar TCBS (Difco). A caracterização bioquímica foi realizada segundo Hofer (7), selecionando-se apenas as estirpes pertencentes ao grupo I de Heiberg (manose +; sacarose +; arabinose -) e capazes de crescer em água triptonada contendo de 0 até 3g% de NaCl, para os testes de aglutinação rápida frente aos antissoros 01 e R de *Vibrio cholerae*.

A tipificação antigênica de *V. cholerae* não 01, assim como a pesquisa de enterotoxinas (2, 4) foram realizadas no WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Vibrios, Calcutta, India.

Resultados e Discussão

Em princípio, enfatiza-se que a cólera foi admitida como uma das causas do acontecimento, considerando que nesta época a sétima pandemia alcançou um extraordinário nível de propagação nas áreas endêmicas, inclusive projetando-se para regiões até então incólumes. Outros fatores foram relacionados a tal premissa, como o aprimoramento do surto em cidade litorânea (Caravelas); as condições de saneamento básico muito precárias; o comprometimento dos diferentes grupos etários da população alvo e o caráter explosivo da ocorrência, insinuando a participação do mecanismo de veiculação hídrica do(s) agente(s).

Dante dos resultados obtidos através dos coprocultivos, ficou patente a complexidade do problema, tendo em vista a gama de bactérias potencialmente patogênicas isoladas, nas várias localidades. Todavia a predominância de *Shigella flexneri* 2a, reconhecida em cinco das oito áreas atingidas, possibilita responsabilizá-la como o principal agente do surto (Tabela 1).

Por outro lado, na localidade de Teixeira de Freitas, de onde não se obteve o isolamento de *Shigella*, foram detectadas cinco amostras de *Vibrio cholerae*, caracterizadas como sorotipo 10 (Tabela 1).

Consigna-se que os portadores estavam representados por três crianças com dois anos e dois adultos (29 e 60 anos), sendo que os infantes ainda albergavam outros microrganismos (*S. reading*, *S. thompson* e *Aeromonas hydrophila*).

Apenas uma das culturas de *Vibrio cholerae* 010, isolada de criança, se revelou produtora de enterotoxina, evidenciada pelo teste de ligadura das alças intestinais de coelho e no ensaio com células V1.

Alguns dos aspectos expostos, apresentam certa similaridade com aqueles referidos por Kay & col. (9) em Lima, Peru, tais como, a maior incidência em crianças, as associações com outros enteropatógenos e a predominância de amostras desprovistas de enterotoxinas.

Tabela 1 - Distribuição de enterobactérias patogênicas isoladas de fezes de habitantes dos diferentes locais do sul do estado da Bahia.

Símbolos:*() = Nº de isolamentos

Localidades	Nº de amostras analisadas	Nº de portadores	Enterobactérias isoladas
Caravelas/ Barra de Caravelas	24	8	<i>Shigella flexneri</i> 2a(4)* - <i>E. coli</i> 0111(3) <i>Salmonella typhimurium</i> (2) - <i>S. newport</i> (1)
Itamaraju	16	4	<i>S. flexneri</i> 2a(2) - <i>E. coli</i> 0124(1) <i>S. typhimurium</i> (1)
Alcobaça	7	2	<i>S. flexneri</i> 2a(1) - <i>S. arizona</i> 18:z4,z23(1)
Eunápolis	7	2	<i>S. flexneri</i> 2a - <i>E. coli</i> 0111
Porto Seguro	7	2	<i>S. flexneri</i> 2a
Teixeira de Freitas	7	6	<i>Vibrio cholerae</i> 010(5) - <i>S. reading</i> (1) - <i>S. thompson</i> (1) - <i>Aeromonas hydrophila</i> (1)
Prado	5	1	<i>E. coli</i> 086
Juerana	3	-	-

Como detalhe complementar, assinala-se que todas as culturas de *V. cholerae* 010, resultaram do plantio primário em ágar TCBS, insinuando que um número significativo de células viáveis, estava sendo eliminado pelas fezes, no momento da colheita. Esta circunstância provavelmente, reflete a efetiva colonização do microrganismo no trato entérico dos hospedeiros.

Ressalta-se ainda, o isolamento de uma estirpe do mesmo sorotipo de *V. cholerae*, da água de consumo (cacimba) da região de Teixeira de Freitas. Analisando este acontecimento sob o prisma epidemiológico, é possível aludir que o mecanismo de transmissão da bactéria, ocorreu através de veiculação hídrica.

Em conclusão, admite-se que a pesquisa de vibrios, deveria ser adotada rotineiramente nas coproculturas, até que se esclareça com dados mais concretos a participação e a repercussão desse agente nos processos diarréicos, em nosso meio. Tal observação se concentraria precipuamente, sobre as populações do meio rural ou de áreas urbanas, não servidas por sistemas públicos de abastecimento de água tratada, considerando que nas águas superficiais ou subsuperficiais (poços rasos), os vibrios não halofílicos, por vezes, são constituintes normais da microflora.

Agradecimentos

Ao Prof. Dhiman Barua, Division of Communicable Diseases, W.H.O., Genebra, pelo interesse no encaminhamento das amostras ao W.H.O. Collaborating Centre for Reference and Research on Vibrios, Calcutta, India e as colaborações técnicas dos Srs. José Caetano Alves e Junair Ribeiro.

Referências Bibliográficas

1. Blake, P.A.; Weaver, R.E. & Hollis, D.C. - Diseases of humans (other than cholera) caused by vibrios. Ann. Rev. Microbiol., 34:341-367, 1980.
2. Burrows, W. & Mustekis, G.M. - Cholera infection and toxin in the rabbit ileal loop. J. Inf. Dis., 116:183-190, 1966.
3. Costa, G.A. & Hofer, E. - Isolamento e identificação de enterobactérias. Monografia Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro) , 1972.
4. Donta, S.T.; Moon, W.H. & Whipp, S.C. - Detection of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin with use of adrenal cells in tissue culture. Science, 183:334-336, 1974.

5. Edwards, P.R. & Ewing, W.H. - Identification of Enterobacteriaceae. 3.ed. Minnesota, Burgess Publishing, 1972.
6. Fernandez, D.; Pereira, L.A.; Bezerra Filho, B.C. & Hofer, E. - Classificação bioquímica segundo Heiberg de amostras de *Vibrio* isoladas de esgoto. In: - Resumos trabalhos VI Cong. Bras. Microbiologia, Salvador, Bahia, p.91, 1975.
7. Hofer, E. - Métodos utilizados para o isolamento e identificação de *Vibrio cholerae*. Informe de Patología Clínica, 1:5-18, 1975.
8. International Committee on Systematic Bacteriology, Subcommittee on Taxonomy of *Vibrio*: report. Int. J. Syst. Bacteriol., 22:189, 1972.
9. Kay, B.A.; Sack, R.B.; Spira, W.M.; Guerra, H.E.; Guerrero, C.E.; Chaparro, E.; Yi, A.E.; Salazar-Lindo, E.; Chea, E.; Wachsmuth, I.K. & Davis, B.R. - *Vibrio cholerae* non-O1 isolated from five people with diarrhoea in Lima. Lancet I, 8370:218, 1984.
10. Morris Jr., J.G. & Black, R.E. - Cholerae and other vibrioses in the United States. N. Engl. J. Med., 312:343-350, 1985.
11. Rodrigues, D.P. - Ocorrência de bactérias potencialmente patogênicas no ecossistema água-ostra da Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro, R.J. U.F.F., 1983. (Tese de Mestrado).
12. Sakazaki, R.; Tamura, K.; Gomez, C.Z. & Sen, R. - Serological studies on the cholerae group of vibrios. Japan J. Med. Sci. Biol., 23:13-20, 1970.
13. Shimada, T. & Sakazaki, R. - Additional serovars and inter-O antigenic relationships of *Vibrio cholerae*. Japan J. Med. Sci. Biol., 30:275-277, 1977.

SEROEPIDEMIOLOGICAL SURVEY OF HEPATITIS A AND B CYTOMEGALOVIRUS AND HERPES SIMPLEX TYPE 2 IN PRIME BLOOD DONORS FROM RIO DE JANEIRO, BRAZIL

Clara F. Tachibana Yoshida

Rita M. Ribeiro Nogueira

Luiz A.C. Mercadante

Angela T. Pinhão

& Hermann G. Schatzmayr

Deptº de Virologia

Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

Caixa Postal 926

21040 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Summary

A seroepidemiological survey was carried out in selected prime blood donors from Rio de Janeiro, Brazil, in order to verify the prevalence of hepatitis A and B viruses, cytomegalovirus and herpes simplex type 2 in 323 samples tested from white and non white individuals. In the total group, we found a HBsAg prevalence of 1.5%, 7.7% of anti-HBs and 29.9% of anti-HBc, being that 31.3% were found positive for the presence of infection caused by HBV. The prevalence of these markers was different in white and non-white individuals. The presence of 97% anti-HAV antibodies, 97% of antibodies to CMV and 93% to herpes simplex type 2 was verified in 100 samples, showing great dissemination of these viruses in our community.

Resumo

Seroepidemiologia das hepatites A e B, citomegalovírus e herpes simplex tipo 2 em doadores de sangue primários do Rio de Janeiro, Brasil

Um estudo soroepidemiológico foi realizado em uma população de doadores de sangue da cidade do Rio de Janeiro, com a finalidade de verificar a prevalência dos marcadores dos vírus das hepatites A e B, citomegalovírus e herpes simplex tipo 2. A principal característica da amostragem é a seleção de soros somente de indivíduos de primeira doação. Foram analisadas 323 amostras para o estudo de marcadores da hepatite B, divididos em soros de indivíduos de raça branca e não branca. Verificou-se no global uma prevalência de 1,5% de HBsAg, 7,7% de anti-HBs e 29,9% de anti-HBc, apresentando um total de 31,3% de positividade para a presença de qualquer um dos marcadores de infecção pelo vírus da hepatite B. A prevalência destes marcadores foi diferente nos indivíduos brancos e não brancos. Em uma análise randômica de 100 amostras foi verificada a presença de 97% de anticorpos para hepatite A, 97% para citomegalovírus e 93% para herpes vírus tipo 2, demonstrando a grande circulação destes três vírus na nossa comunidade.

Introduction

The epidemiology of hepatitis A and B, cytomegalovirus (CMV) and herpes simplex

type 2 varies in the different parts of the world, considering several factors as diversity of ethnic and social groups that influence the dissemination of these viruses.

From several epidemiological studies carried out on hepatitis B virus, Szmuness (15) showed a prevalence of HBs antigen in approximately 0.1 to 0.2% in North America and Europe and a prevalence of 7.0 to 8.0% in some regions of Africa, Asia and Oceania (15).

In the tropical areas of Brazil, Bensabath & Boshell (1) demonstrated a high prevalence of HBsAg reaching 5.1% in populations from inner Amazon (1). In the North East (Alagoas), we related a prevalence of HBsAg of 2.8%.

In the subtropical areas from the South of Brazil, the prevalence of this antigen varied from 1.0% in Curitiba (14) to 2.1% in Rio de Janeiro (10). In the country side of Paraná, Yoshida & col. (20) verified a prevalence of 4.14% of HBsAg in the population of asiatic origin, which was twice higher than in white population of the same region, demonstrating the ethnicity as a factor of influence in the propagation of hepatitis B virus (20).

For cytomegalovirus, serological surveys carried out by different authors in São Paulo (3, 4, 17) even though working with samples from different populations, demonstrated that the infection occurs early with an increasing rate in positivity of antibodies in the older age groups. It reaches 80% of positivity in the group above fifty years old.

Studies realized by our group in a population of North-East of Brazil, demonstrated 82% of antibodies for cytomegalovirus by the indirect hemmaglutination test.

In Bahia (Salvador) a study carried out among women between 15 and 30 years old, from low socioeconomic level, showed 92.6% of positivity for antibodies against cytomegalovirus by complement fixation technique.

In relation to herpesvirus Salles-Gomes & col. (13) demonstrated in São Paulo by the indirect immunofluorescence method the presence of antibodies in 38% of children under 4 years old. This percentage increased to more than 90% by the age fourteen.

This report presents the results of a seroepidemiological survey of hepatitis A and B viruses, cytomegalovirus and herpes simplex type 2, in prime blood donors from Rio de Janeiro, Brazil.

Materials and Methods

During a period of 9 months (1979-1980) 323 serum samples of prime blood donors were collected.

Serological hepatitis B markers were determined in 153 samples from white and 170 from non-white individuals.

For serological analysis of hepatitis A, cytomegalovirus and herpes type 2 antibodies, 100 samples were randomly chosen.

Determination of HBsAg - HBsAg was determined by reverse passive hemmaglutination (R-PHA) using sheep erythrocytes treated with glutaraldehyde and sensitized with anti-HBs gammaglobulin as described by Imai & col. (7). Serological technique was performed following the technique described by Kimura & col. (8).

Determination of anti-HBs - Anti-HBs antibody was determined by passive hemmaglutination (PHA) using a technique similar to R-PHA, however sensitizing the erythrocytes with HBsAg previously purified by affinity chromatography using Sepharose 4B linked to anti-HBs (21).

Determination of anti-HBc - This antibody was determined using the commercial test CORAB (Abbott Lab., North Chicago, Illinois, USA).

Determination of anti-HAV - Antibodies to hepatitis A were detected by the

competitive technique of radioimmunoassay (HAVAB, Abbott Lab. USA).

Determination of anti-CMV - The reaction used was indirect hemagglutination, using fresh sheep erythrocytes sensitized with the AD-169 cytomegalovirus strain, kindly provided by Dr. John A. Stewart, CDC, Atlanta. The process and the methodology of the test were realized according to the technique described by Waner & col. (18).

Determination of antibodies for herpes simplex type 2 - The same technique described for cytomegalovirus was utilized, using erythrocytes sensitized with MS herpes simplex type 2 strain provided by Dr. J. Stewart.

Results

The HBV markers observed in the group of 323 individuals belonging to a population of white and non-white are shown in the Table 1.

From 153 sera analysed in the white population, none HBsAg was found. The percentage of anti-HBs was 10.4% and antibodies for HBcAg were found in 22.2% of individuals.

From 170 sera from non-white individuals, the percentage was 2.9% of HBsAg, 5.2% of anti-HBs and 36.4% of anti-HBc, showing that this group presented a frequency more elevated when compared to the white population ($\alpha = 0.05$, chi-square test).

The HBV markers can appear isolate or associated, showing the serological aspects presented on Table 2. The frequency of infection by hepatitis B virus, that means, the percentage of individuals which have already had contact with HBV, was determined by the presence of any HBV marker.

Table 3 illustrates the prevalence of antibodies for hepatitis B, cytomegalovirus and herpes simplex type 2.

For cytomegalovirus this group of donors presented antibody titers ranging from 1:16 to 1:8192, as shown in Figure 1, with a geometric mean of 1:350.5. For herpes simplex type 2 antibody titers ranged from 1:16 to 1:2048, as shown in Figure 2, with a geometric mean of 1:172.4. In both tests titers below 1:16 were not considered.

Discussion

The frequency of appearance of HBV markers depends on a number of interrelations

Table 1 - HBsAg, anti-HBs and anti-HBc in populations of white and non-white individuals in Rio de Janeiro

	White (%)	Non-white (%)	Total (%)
HBsAg	0/153 (0)	5/170 (2.9)	5/323 (1.5)
Anti-HBs	16/153 (10.4)	9/170 (5.2)	25/323 (7.7)
Anti-HBc	34/153 (22.2)	62/170 (36.4)	96/323 (29.9)

Table 2 - Patterns of serological response of infection by hepatitis B virus in populations of white and non-white prime blood donors, Rio de Janeiro

	HBsAg + anti-HBc	anti-HBs only	anti-HBc + anti-HBs	anti-HBc only	any HBV marker (%)
White T=153	0	4	12	22	38 (24.8)
Non-white T=170	5	1	8	49	63 (37.0)
Total = 323	5	5	20	71	101 (31.3)

as sex, age, race and education level with reflection on the socio-economic behavior of the population.

Thus, analysing the markers for hepatitis B infection, we could approach to a more precise data about the circulation of this virus in a population of adult prime blood donors, predominantly males.

The frequency of asymptomatic carriers of HBsAg in these individuals was 1.5% with 7.7% of anti-HBs and 29.9% of anti-HBc. However, there was a significant difference between white and non-white individuals. It seems to have a greater dissemination of HBV in non-white than in white individuals.

Szmuness (15), studying white and non-white populations of prime blood donors from New York City, demonstrated a similar variation within the different ethnic groups. In Brazil, Focaccia (5) showed the same result concerning white and non-white groups.

The patterns of immunologic response caused by HBV infection in these two populations demonstrated that in white population, from 16 individuals who developed anti-HBs, 4 responded only with anti-HBs, without the presence of anti-HBc, and 12 were positive for both antibodies indicating that viral replication occurred. In non-white population only one from nine individuals showed response to anti-HBs as unique marker and 8 showed anti-HBs and anti-HBc. In this group, all HBsAg carriers had anti-HBc antibodies (Table 2).

The high prevalence of anti-HBc alone in both groups can be explained not only by the sensitivity of the technique employed but also by the high concentration of this antibody usually found in serum.

It is important to assign that the presence of isolated anti-HBc can be explained by the fact that this is the unique marker present between the period of clearance of HBsAg and appearance of anti-HBs and also a residual response after the disappearance of anti-HBs (6).

Finally, the infection caused by hepatitis B virus showed a frequency 1.5 times higher in non-white than in white individuals when analysed for the presence of any marker of hepatitis B infection: 37% in non white population against 24.8% in white population.

Regarding hepatitis A virus, CMV and herpes simplex type 2, which have an epidemiology quite different of HBV, it was demonstrated a high prevalence of these antibodies, reflecting a very high degree of circulation.

Szmuness & col. (16) clearly showed that the prevalence of specific antibodies for hepatitis A is associated with factors as age, race, socio-economic level and residence in endemic areas. In the same way, Krugman & col. (9) demonstrated a marked difference between populations from a same area in relation to several environmental factors.

The frequency of antibodies for hepatitis A increases with age. In the United States, approximately 10% of children and 45% of adults show antibodies for this virus.

Through enzyme immunoassay technique, we could observe that 97% showed antibodies for hepatitis A over 18 years old, so infection probably occurred early, during childhood. Data obtained in our laboratory, revealed that over 2 to 3 years old, the levels of antibodies resemble adults levels, when verified in children from low socio-economic level.

By the other hand, a high prevalence of antibodies was also observed in relation to CMV and herpes simplex type 2. It is interesting to observe the variation of hemagglutination titers in these prime blood donors, which reached 1:8192 for CMV and 1:2048 for herpes type 2.

Indirect hemagglutination technique using fresh erythrocytes was employed because it permits an easy determination of the best concentration of tannic acid and of

Table 3 - Antibodies against hepatitis A virus, cytomegalovirus and herpes virus type 2 in prime blood donors, Rio de Janeiro

	Nr of sample	% of positivity
Hepatitis A	100	97
Cytomegalovirus	100	97
Herpes virus type 2	100	93

the antigen to be used. Another advantage of the method is that it can be used for several samples permitting to perform the test in one day and allowing to work with sera which can eventually show anti-complementary activity. The only difficulty consists in the constant preparation of new batches of RBC sensitized with antigen, so that the reaction can only be applicable to the study of a great number of sera on each time, and not in isolated cases, for which the reactions of complement fixation and immunofluorescence are very effective.

Bernstein & Stewart (1971) demonstrated that there is a correlation between results obtained by indirect hemmaglutination test and complement fixation in a normal population, although exceptions can appear, particularly in sera from individuals with clinical disease explained by the predominance of IgM

antibody cases in which the reaction of complement fixation can be negative (2).

The titers obtained by indirect hemmaglutination observed by the same authors, were 5 to 10 times higher than the ones observed by complement fixation.

The implication of the employ of sera with anti-CMV for transfusion was studied among others by Monif & col. (11). These authors demonstrated that the exclusion of donors with serological tests positive for CMV can significantly reduce the probability of infection, particularly in susceptible receptors as patients submitted to transplantation and who receive immunosupressing therapy and also in pregnant women. In the conditions, it is indicated the utilization of blood units with absence of antibody for CMV. This statement may be difficult to fulfill in our conditions, due to the high incidence of CMV antibodies in the population.

Yeager & col. (19) also demonstrated the extreme importance of utilization of blood units negative for CMV in new-borns from susceptible mothers, with the aim of avoiding prime infection which can lead to an unfavorable evolution of the clinical disease.

Considering that the population of Rio de Janeiro presents a high prevalence of antibodies for CMV, we should expect that complications due to transfusions would not be frequent, since the number of seropositive receptors must be equally high.

Actually, the exact influence of these plasmas, positive for CMV in high titers and the plasmas which contain anti-HBc as the only marker for hepatitis B infection, in receptors who are submitted to blood transfusion in our environment, seems yet undetermined.

There are few data about herpesvirus infection in Brazil, particularly about herpes simplex type 2 (13), which led us to study the virus dissemination by serological tests in different populations. A serological survey in children under 1 year old and low socio-economic level living in Rio de Janeiro showed a prevalence of 4.5 to 6.0% (12). This result can be partially explained by cross-reaction with the type 1 or probably a prime infection in this community. In blood bank donors in Maceió, an antibody prevalence of 50% was found which is not so high but is significant (data not published). The high percentage that we found

Figure 1 - Distribution of anti-CMV antibodies by indirect hemmaglutination in prime blood donors, Rio de Janeiro

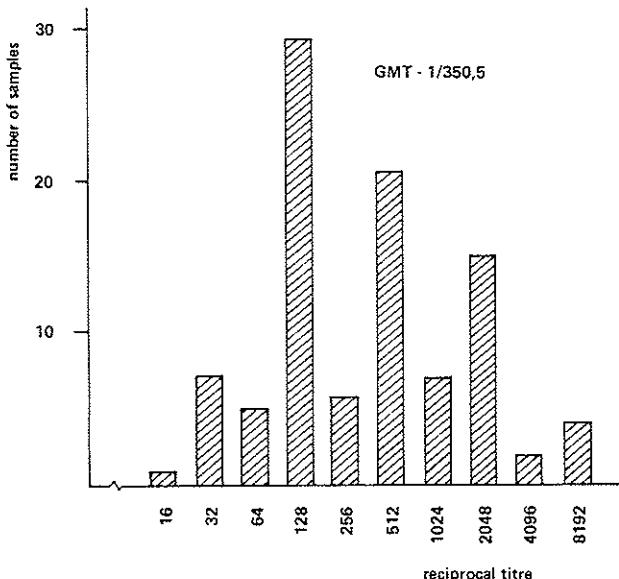
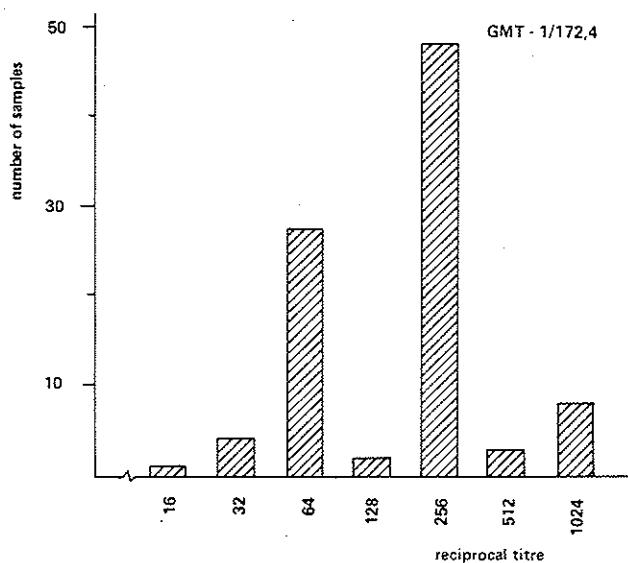


Figure 2 - Distribution of anti-herpes type 2 antibodies by indirect hemmaglutination in prime blood donors, Rio de Janeiro



in this work can be explained by differences in behavior of different populations, considering that most of the infections by herpes simplex type 2 occurs after the puberty.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Aldo Cerqueira, from Banco de Sangue de Botafogo, the technologists Iná Ferraz de Camargo and Oscar Jorge Berro, for providing diagnostic kits for hepatitis B (Bio-Manguinhos) and Dr. J. Stewart (CDC/Atlanta/USA) for the assistance given to serological tests.

References

1. Bensabath, G. & Boshell, J. - Presença de antígeno "Australia" (Au) em populações do interior do Estado do Amazonas, Brasil. Rev. Inst. Med. Trop. (São Paulo), 15:284-288, 1973.
2. Bernstein, M.T. & Stewart, J.A. - Indirect hemmaglutination test for detection of antibodies to cytomegalovirus. Appl. Microbiol., 21:84-89, 1971.
3. Candeias, J.A.N.; Stewien, K.E. & Barbosa, V. - Estudo sorológico de infecções ocasionadas por citomegalovírus. Rev. Saúde Públ. (S. Paulo), 8:263-275, 1974.
4. Carvalho, R.D.S.; Panutti, C.S.; Amato-Neto, V.; Oselka, G.W. & Angelo, M.J.O. - Estudo soroepidemiológico da infecção pelo citomegalovírus em São Paulo, Brasil. Rev. Inst. Med. Trop. (São Paulo), 18:1-5, 1976.
5. Focaccia, R. - Etió-epidemiologia das hepatites virais tipo A e B: contribuição ao estudo da prevalência e risco de contágio em funcionários hospitalares. São Paulo, Faculdade de Medicina USP, 1983. (Tese).
6. Hoofnagle, J.H.; Seeff, L.B.; Bales, Z.B.; Gerety, R.J. & Tabor, E. - Serological responses in hepatitis B. In: - Viral hepatitis. Philadelphia, The Franklin Inst. Press, chap.22, p.219-242, 1978.

7. Imai, M.; Yamashita, Y.; Miyaskawa, Y. & Mayumi, M. - Haemagglutination inhibition assay of the common determinants and subspecificities of Australia antigen. *Immunology*, 27:871-878, 1974.
8. Kimura, R.T.; Tachibana, C.F.; Cury, V.L. & Takeda, A.K. - Reações imunológicas para a detecção do antígeno de superfície de hepatite B (HBsAg). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 38:83-86, 1978.
9. Krugman, S.; Friedman, H. & Saltimer, C. - Hepatitis A and B: serologic survey of various populations groups. *Am. J. Med. Sci.*, 275:249-255, 1978.
10. Mazzur, S.; Nath, N.; Fang, C.; Bartiaans, M.J.; Molinares, J.L.; Balcaser, M.; Beker, G.S.; Bruning, E.A.; Cameron, A.R.E.; Farrel, V.; Fay, O.H.; Labrador-González, G.; González, L.G.; Gutierrez, D.A.; Jaramilo, T.C.; Katz, R.; Leme Lopez, M.B.; Levy-Koenig, E.; Morales Ayala, F.; Rodrigues-Ayama, J.; Rodrigues-Moyado, H.; de Torres, R.A. & Velasio, M. - Distribuicion de marcadores de virus de hepatitis B (VHB) en la sangre de doadores de 13 paises del hemisferio occidental. *Actas del taller latinoamericano de la Cruz Roja sobre hepatitis B. Boletin de la Oficina Sanitaria Panamericana*, 89:329-347, 1980.
11. Monif, G.R.G.; Daicoff, G.I. & Flory, L.L. - Blood as a potential vehicle for cytomegalovirus. *Am. J. Obstetr. Gynecol.*, 126:445-448, 1976.
12. Nogueira, R.M.R.; Schatzmayr, M.G.; Rocha, C.E.A. & Pinhão, A.T. - Infecções pelo citomegalovírus e herpes simplex tipo 2: amostragem em crianças de baixa idade do Município do Rio de Janeiro. *Clin. Pediatr.*, 10:22-28, 1986.
13. Salles-Gomes, L.F.; Sakuma, M.E. & Curti, S.P. - Herpes-vírus hominis: estado atual da frequência dos anticorpos em habitantes da cidade de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41:107-114, 1981.
14. Szpeiter, N. - Prevalência do antígeno da superfície da hepatite B e do anticorpo contra o antígeno de superfície da hepatite B no "staff" do setor de Ciências de Saúde e do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná e numa população não hospitalar da cidade de Curitiba. *Universidade Federal do Paraná*, 1976. (Tese).
15. Szmuness, W. - Recent advances in the study of the epidemiology of hepatitis B. *Am. J. Pathol.*, 81:829-650, 1975.
16. Szmuness, W.; Dienstag, J.L.; Purcell, R.H.; Harley, E.J.; Stevens, C.E. & Wong, D. - Distribution of antibody to hepatitis A antigen in urban adult populations. *N. Engl. J. Med.*, 295:755-795, 1976.
17. Veronesi, R. - Citomegalia: revelação da presença do vírus das glândulas salivares em crianças de São Paulo através de inquérito sorológico. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo*, 14:249-255, 1959.
18. Waner, J.L.; Weller, T.H. & Stewart, J.A. - In: - *Cytomegalovirus: manual of clinical immunology*. 2.ed. Washington, D.C., Noel R. Rose, chap.83, p.622-627, 1980.
19. Yeager, A.S.; Grumet, F.C.; Hafleigh, E.B.; Arvin, A.M.; Bradley, J.S. & Prober, G.C. - Prevention of transfusion-acquired CMV infection in newborn infants. *Pediatr.*, 92:281-287, 1981.
20. Yoshida, C.F.T.; Gaspar, A.M.C.; Marzochi, K.B.F. & Schatzmayr, H.G. - HBsAg, subtypes and HBsAb in white and asiatic populations from urban and rural communities in the south of Brazil. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 10:106-110, 1979.
21. Yoshida, C.F.T.; Mercadante, L.A.C.; Gaspar, A.M.C.; Maia, M.M.S.; Berro, O.J.; Almeida, E.C.C. & Schatzmayr, H.G. - Anticorpos anti-HBs obtidos em coelhos e sua utilização como reagentes para testes sorológicos no diagnóstico da hepatite B. *Mem. do Inst. Oswaldo Cruz*, 79:329-336, 1984.

APLICAÇÃO DE UMA TÉCNICA DE ELISA ("ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY") NO DIAGNÓSTICO DIRETO DO VÍRUS DA FEBRE AFTOSA

Hélio José Montassier

Deptº de Microbiologia

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Campus de Jaboticabal

14870 Jaboticabal SP, Brasil

Leonardo José Richtzenhain

Samir Issa Samara

Deptº de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

& Aramis Augusto Pinto

Deptº de Microbiologia

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Resumo

O método do "Sandwich indireto" do ELISA ("Enzyme-Linked Immuno-sorbent Assay"), foi nesse trabalho empregado com vantagens para detecção e tipificação direta dos sorotipos O₁, A₂₄, Avenceslau e C₃ do vírus da febre aftosa presentes em suspensões antigenicas brutas provenientes de cultura celular, do epitélio de coxim plantar de cobaias, de carcaça de camundongos e de epitélio lingual bovino, infectados com essas estirpes virais. Os títulos obtidos no ELISA foram sempre superiores aos da reação de fixação de complemento, apresentando uma sensibilidade 3,8 a 80 vezes maior do que esta última reação. Quanto à especificidade do ensaio imunoenzimático foi observado o desenvolvimento de reações heterotípicas cruzadas principalmente da estirpe O₁ com o antisoro anti-C₃, da estirpe A₂₄ com o anti-O₁, e anti-C₃, da estirpe Avenceslau com anti-O₁ e da estirpe C₃ com o anti-O₁, o que não ocorreu na reação de fixação de complemento. No entanto, isto não impediu que as 4 estirpes virais estudadas (O₁, A₂₄, Avenceslau e C₃) fossem classificadas pelo ELISA em seus respectivos sorotipos.

Summary

Application of a solid Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the direct diagnosis of foot and mouth disease virus

We report the development of an indirect sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) technique for the detection and typification of foot and mouth disease virus in crude antigenic suspensions obtained from four different sources: infected baby hamster kidney cell culture (BHK - 21); footpad from infected guinea pig; extracts of mouse infected tissue and tongue epithelial tissues from infected cattle. ELISA titers probes to be 3,80 - 80 times more sensitive than quantitative complement fixation tests. A major problem was the occurrence of heterotypic

cross-reactions among strains O₁Campos with antiserum to C₃, A₂₄-Cruzeiro with antisera to O₁ and C₃, Ayenceslau with antiserum to O₁ and C₃Indaiá with antiserum to O₁ viruses observed in this ELISA technique but not in complement fixation tests. However, the four viruses strains (O₁Campos, A₂₄Cruzeiro, Ayenceslau and C₃Indaiá) were classified by ELISA technique within its own serotype.

Introdução

O vírus da febre aftosa (VFA) apresenta 7 tipos sorologicamente distintos, cerca de 60 subtipos e numerosas estíples (5), tornando evidente a importância de se investigar continuamente a composição e a variação antigenica desses vírus isolados de surtos a campo da doença. O conhecimento desses dados deveria preceder, sempre, o preparo de vacinas eficientes para serem usadas em campanhas imunoprotetoras mais efetivas (15).

Assim sendo, os órgãos oficiais de controle da febre aftosa são obrigados a manterem laboratórios e técnicos especializados para a detecção e identificação sorológica das estíples do VFA. Para esse fim, a prova sorológica mais frequentemente utilizada é a reação de fixação de complemento (RFC), que tem algumas vantagens sobre outras técnicas, no entanto, essa reação apresenta, também, algumas desvantagens, destacadamente a baixa sensibilidade que, para fornecer os resultados, exigem materiais recém-colhidos, ricos em vírus ou bem conservados (10).

Crowther & Abu Elzein (7) e Abu Elzein & Crowther (1), buscando obter técnicas de soro diagnóstico mais eficientes e superiores a RFC, desenvolveram a técnica imunoenzimática conhecida pelo nome de ELISA ("Enzyme-Linked Immunosorbent Assay"), a qual demonstrou-se, a princípio, 50 a 100 vezes mais sensível do que a RFC na detecção do VFA, bem como foi capaz de detectar especificamente as partículas 146S íntegras desse vírus, na presença das demais subunidades antigenicas virais e de material de cultura celular.

Crowther & Abu Elzein (8) utilizaram com sucesso o método de "sandwich indireto" do ELISA para sorotipificar estíples do VFA presentes em amostras de epitélio lingual bovino. Uma técnica similar foi aplicada com o mesmo objetivo por Hamblin & col. (10) que analisaram um maior número de amostras de epitélio bovino, num total de 171, todas contendo estíples do VFA. Os autores concluíram, nesse trabalho, que não houve uma vantagem significativa do ELISA sobre a RFC, diferindo, no caso, do que foi obtido por Crowther & Abu Elzein (8), que haviam trabalhado com apenas 23 amostras.

Já, Have & col. (11) usando também o método do "sandwich indireto" do ELISA conseguiram, em comparação com a RFC, para titulação de amostras de epitélio lingual bovino, contendo um dos 3 sorotipos do VFA (O, A ou C), obter uma sensibilidade aproximadamente 500 vezes maior para o ELISA. Contudo, quando foram confrontadas as performances dessas técnicas para o diagnóstico direto de 21 amostras de epitélio bovino infectadas com VFA, não foi observada uma diferença considerável entre elas.

No Brasil, até o momento, o diagnóstico laboratorial do VFA continua sendo rotineiramente feito através da RFC, e, não há dados, na literatura, sobre trabalhos realizados em nosso país, que fizessem uso de reações imunoenzimáticas para identificação do VFA.

Parece, portanto, importante e promissor, apesar das condições mais modestas de pesquisas vigentes em nosso país, buscar-se a adaptação do ELISA, isto é, preparo do imunorreagente e execução do teste, para ser aplicado na detecção e tipificação direta de estíples do VFA presentes em suspensões antigenicas brutas, provenientes de cultura celular ou de tecidos animais infectados; tornando como parâmetro de comparação de sensibilidade e especificidade, os resultados da RFC usada com o mesmo fim.

Material e Métodos

1. Antígenos - As estirpes dos subtipos O₁Campos, A₂₄Cruzeiro, Avenceslau e C₃Indaiá, foram cultivadas em células BHK-21 clone 13, ou multiplicadas, conforme o caso, por inoculação intra-peritoneal em camundongos lactentes, ou intradérmica em cobaias, sendo que o subtipo Avenceslau foi também obtido de uma amostra de epitélio lingual bovino. As suspensões antigenicas brutas dos materiais acima referidos constituiram-se em antígenos para serem usados na RFC e no ELISA.

A suspensão antigenica da estirpe O₁Campos, proveniente de cultura de células BHK-21 foi também utilizada para purificação de partículas 146S por precipitação com polietilenoglicol (PEG) a 8% (p/v), seguida de ultracentrifugação em gradiente de sacarose, segundo o método de Brown & Cartwright (4).

2. Anticorpos - **2.1. Anticorpos** - **2.1.1. - Anti-146S do VFA O₁** - Três coelhos foram imunizados com duas doses de 50 μ g de antígeno 146S do VFA O₁ emulsionado em adjuvante completo de Freund. As inoculações foram realizadas com intervalo de 30 dias e, as sangrias dos animais, efetuadas 15 dias após a segunda imunização. A fração gama globulina dos soros foi separada por precipitação com sulfato de amônio a 40% de saturação.

2.1.2. Anticorpos anti-VFA O, A e C - Três coelhos foram imunizados com suspensão antigenica bruta contendo os subtipos O₁, A₂₄, Avenceslau e C₃ do VFA, emulsionada em adjuvante incompleto de Freund. Foram administradas doses semanais nos primeiros 45 dias, e quinzenais nos 45 dias restantes. Ao final de 3 meses os coelhos foram sangrados, por punção cardíaca. Do soro foi precipitada a fração gama globulina com sulfato de amônio a 40% de saturação.

2.1.3. Anticorpos anti-VFA de búfalo - Foi obtido a partir de uma amostra de soro colhida 12 horas após o nascimento de um bezerro búfalo, filho de uma búfala reagente positiva ao antígeno VIA ("Virus-Infection-Associated") do VFA e contendo alto título soroneutralizante contra o subtipo Avenceslau e, em proporções menores, contra os subtipos O₁, A₂₄ e C₃. Conforme informações prestadas pelo proprietário desses animais, essa búfala havia recebido somente duas doses de vacina contra febre aftosa, contendo os subtipos O₁, A₂₄, Avenceslau e C₃, há mais de 2 anos. O soro do bezerro búfalo apresentou os seguintes títulos soroneutralizantes: anti-O₁ = $10^{-2,81}$; anti-A₂₄ = $10^{-2,51}$; anti-Avenceslau = $10^{-3,01}$ e anti-C₃ = $10^{-2,36}$. A fração gama globulina desse soro foi preparada por precipitação com sulfato de amônio a 40% de saturação.

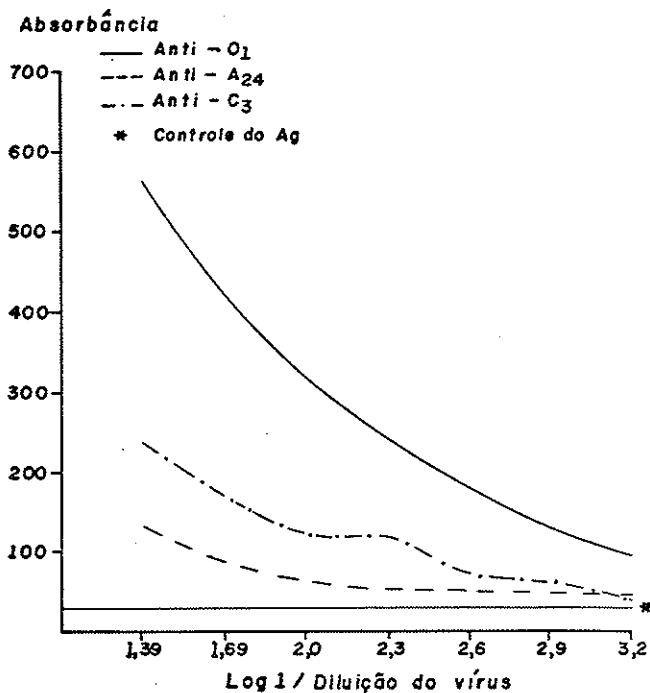
Os anticorpos de captura de coelho anti-146S do VFA O₁ e anti-VFA O, A e C foram absorvidos com polímeros da fração gama globulina de cobraia e de células BHK-21, preparados com glutaraldeído, segundo a técnica descrita por Avrameas & Ternynck (3), para remoção de reações inespecíficas no teste imunoenzimático.

2.2. Anticorpos reveladores - Quatro grupos de cobaias foram hiperimunizadas separadamente com os subtipos do VFA O₁, A₂₄, Avenceslau e C₃, de acordo com o método de Rivenson (17). Após a sangria, por punção cardíaca e o preparo dos soros, segundo as técnicas usuais, esses antissoros foram devidamente controlados quanto à especificidade e aos títulos frente aos vírus homólogos e heterólogos, para serem utilizados como anticorpos reveladores no ELISA e como anticorpos fixadores de complemento na RFC.

2.3. Anticorpos anti-IgG de cobraia - A classe IgG de cobraia obtida por cromatografia em DEAE-Celulose a partir da fração gama globulina do soro dessa espécie animal, conforme a técnica de Oliveira & col. (13), foi usada para hiperimunização de 3 coelhos, tendo sido administradas doses semanais de 1mg de IgG misturada em adjuvante completo de Freund, por 3 meses. Os soros obtidos foram testados quanto à especificidade pela imunoelétroforese e, quanto ao título, por imunodifusão em gel de ágar.

3. Conjugado - A enzima fosfatase alcalina, foi conjugada à fração IgG do antissoro

Figura 1 - Titulação da estirpe O₁ do vírus da febre aftosa, cultivada em células BHK-21, frente aos anticorpos reveladores homólogo (anti-O₁) e heterólogos (anti-A₂₄ e anti-C₃), através do método indireto do ELISA-Teste com anticorpo de captura (gama globulina de coelho anti- O, A e C)



homólogo-Anti-A₂₄ = .049) e 767 para a estirpe C₃ (a maior absorbância dos controles foi do anticorpo revelador homólogo anti-C₃ = .045). Essas Figuras revelam também a ocorrência de reatividade cruzada heterotípica entre os anticorpos reveladores heterólogos para a estirpe que estava sendo titulada, permitindo constatar que, enquanto, na titulação do subtipo O₁, as reações cruzadas são menos evidentes e mais fáceis de serem distinguidas, através da observação dos perfis das 3 curvas de titulação, o mesmo não ocorre para estirpe A₂₄ e C₃.

2. Titulação de estirpe O₁ do VFA presente em suspensões antigênicas brutas pelo método do "Sandwich Indireto" do ELISA com anticorpo de captura de coelho anti-146S do VFA O₁ - Os resultados da titulação da estirpe O₁, cultivada em células de linhagem BHK-21, são apresentados na Figura 4, onde é possível se determinar o título de 1380 para essa preparação antigênica (o maior valor de absorbância foi do controle do antígeno-suspensão de células BHK-21 sem vírus, que foi igual a .035). A reação homotípica com o anticorpo revelador homólogo, foi um pouco maior, contudo as reações heterotípicas cruzadas continuaram quase nos mesmos níveis da reação feita com o anticorpo de captura anti-VFA O, A e C, sendo particularmente forte com o anticorpo revelador anti-C₃, como havia ocorrido anteriormente.

Nas Figuras 5 e 6 estão colocados os resultados das titulações das suspensões antigênicas brutas da estirpe O₁ provenientes do epitélio do coxim plantar de cobaia e de carcaça de camundongo, ambos infectados com o subtipo O₁ do VFA. O título registrado para a amostra viral presente no epitélio do coxim plantar de cobaia, foi de no mínimo 1600, que é o valor da recíproca da última diluição feita

de coelho anti-IgG de cobaia, segundo o método de Avrameas (2), com algumas modificações introduzidas por Engvall & Perlmann (9) e Wardley & col. (20). A diluição do uso do conjugado foi determinada de acordo com o método preconizado por Voller & col. (19).

4. Método de "Sandwich Indireto" do ELISA - A reação foi feita em microplacas de fundo em U de polivinilcloro (marca Petecil, Brasil), tendo sido baseada, em linhas gerais, no método descrito por Crowther & Abu Elzein (8), o qual compreendeu as seguintes etapas:

1a. Adição do anticorpo de captura - As frações gama globulina dos antissoros de coelho ou de búfalo anti-VFA foram diluídas em tampão carbonato-bicarbonato (0,05M, pH 9,6), na concentração de 10 μ g/ml de proteína. A seguir, foram acrescentados à microplaca, volumes de 200 μ l/cavidade dessa solução. A reação foi incubada por 2 horas a 37°C em câmara úmida.

2a. Adição dos抗igenos virais - As suspensões antigenicas brutas dos subtipos O₁, A₂₄, A_{Venceslau} e C₃ do VFA, diluídas seriadamente na razão 2 no tampão PBS-Tween 20 com 7% de clara de ovo cloroformada (V/V), foram colocadas nas cavidades da microplaca no mesmo volume/cavidade usado na etapa anterior. A reação foi incubada em câmara úmida por 18 horas a 4°C.

3a. Adição do anticorpo revelador - Os soros hiperimunes de cobais anti-VFA O₁, A₂₄, A_{Venceslau} ou anti-C₃, foram diluídos a 1:1000 no mesmo tampão onde foram diluídos os抗igenos e, em seguida foram adicionados à microplaca no mesmo volume/cavidade das fases anteriores. A reação foi incubada, em câmara úmida, por 1 hora a 37°C.

4a. Adição do conjugado imunoenzimático - O conjugado, na sua diluição ideal, previamente determinada, foi colocada na microplaca no mesmo volume dos reagentes das fases anteriores. A reação foi incubada em câmara úmida, por 2 horas a 37°C.

5a. Adição do substrato enzimático - O para-nitro-fenil-fosfato diluído em tampão dietanolamina (10%, pH 9,8) na concentração de 1mg/ml, foi acrescentado à microplaca, no mesmo volume das etapas anteriores. Deixou-se a reação prosseguir por 45 minutos à temperatura ambiente, bloqueando-se a mesma com NaOH 3M (50 μ l/cavidade).

As reações de titulação das suspensões antigenicas foram feitas em duplicata e as microplacas foram lavadas entre cada uma das etapas com PBS-Tween 20, por 4 vezes, sendo 5 minutos por vez.

As leituras do teste foram feitas em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 405nm, após ter-se diluído o volume de cada cavidade a 1:4 com água destilada. Posteriormente, foram construídos gráficos (Densidade Óptica-D.O. x Log Dil⁻¹ da suspensão antigenica), determinando-se o título por interpolação gráfica, o qual foi correspondente à recíproca da última diluição do抗igeno testado, capaz de apresentar atividade imunoenzimática específica, isto é, pelo menos o dobro do valor, em termos de densidade óptica, dos controles da reação (controles de anticorpo de captura, dos anticorpos reveladores, do conjugado e do抗igeno).

5. Reação de Fixação de Complemento - Foi usada a técnica 50% de hemólise de Camargo & col. (6) para titulação das suspensões antigenicas virais.

Resultados

1. Titulação das estirpes O₁, A₂₄ e C₃ do VFA presentes em suspensões antigenicas brutas de células BHK-21 pelo método do "Sandwich Indireto" do ELISA com anticorpo de captura de coelho anti-VFA O, A e C - Os resultados encontram-se nas Figuras 1, 2 e 3, sendo obtidos os seguintes títulos: 944 para a estirpe O₁ (a maior absorbância dos controles foi do anticorpo revelador homólogo-anti-O₁ = .059) 282 para a estirpe A₂₄ (a maior absorbância dos controles foi do anticorpo revelador

Figura 2 - Titulação da estirpe A₂₄ do vírus da febre aftosa, cultivada em células BHK-21, frente aos anticorpos reveladores homólogos (anti-A₂₄) e heterólogos (anti-O₁ e C₃), através do método indireto do ELISA-Teste com anticorpo de captura (gama globulina de coelho anti-O, A e C)

Absorbância

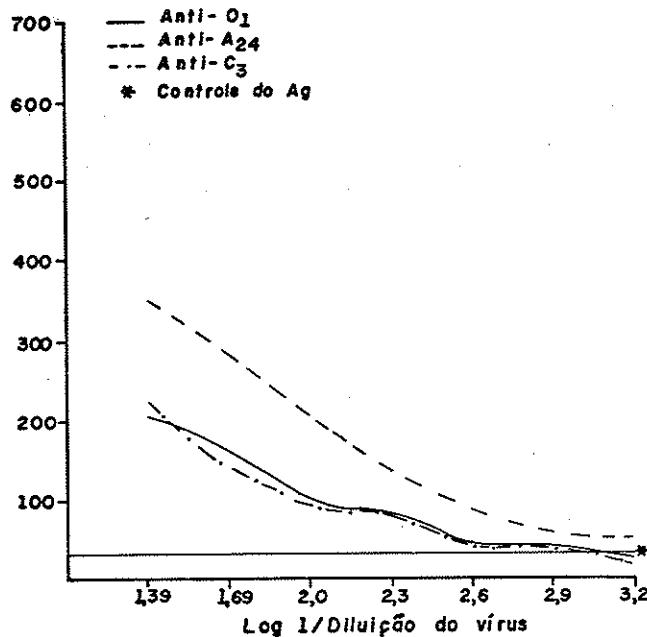


Figura 3 - Titulação da estirpe C₃ do vírus da febre aftosa, cultivada em células BHK-21, frente a anticorpos reveladores homólogos (anti-C₃) e heterólogos (anti-O₁ e anti-A₂₄), através do método indireto do ELISA-Teste com anticorpo de captura (gama globulina de coelho anti-O, A e C)

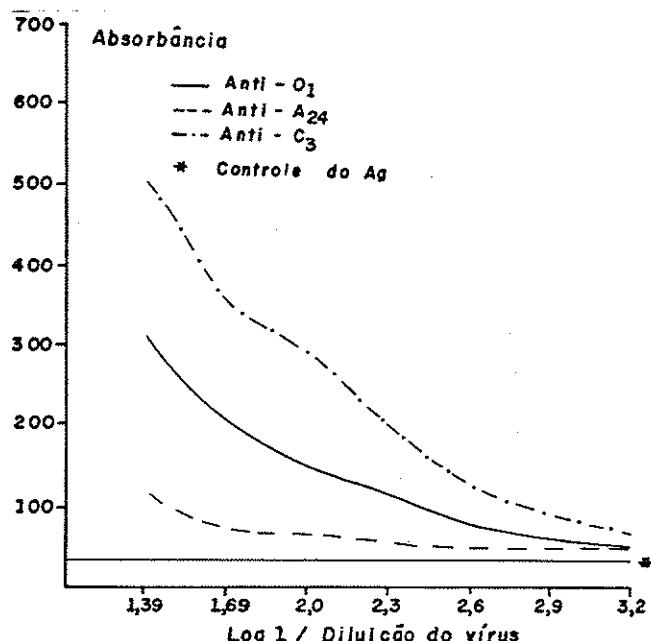
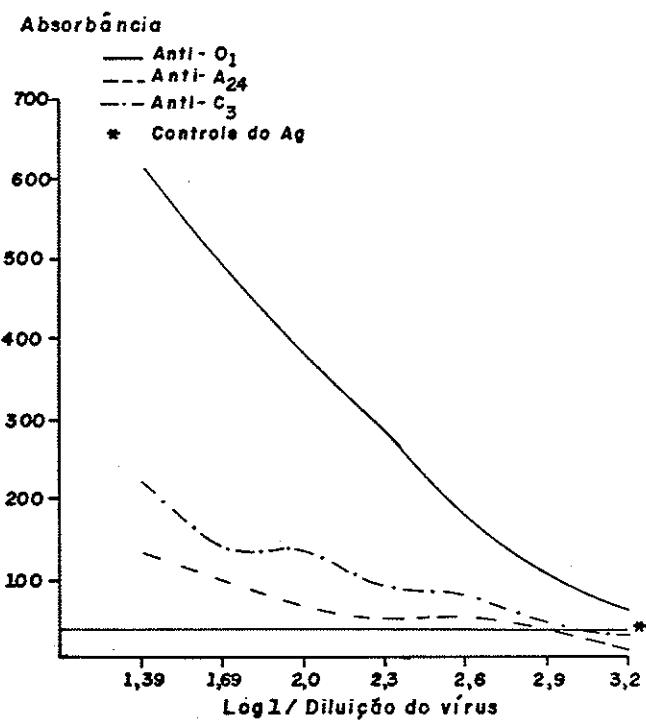


Figura 4 - Titulação da estirpe O₁ do vírus da febre aftosa cultivada em células BHK-21, frente a seus respectivos anticorpos reveladores homólogos e heterólogos (anti-O₁, A₂₄ e C₃) através do método indireto do ELISA-Teste com anticorpo de captura (gama globulina de coelho anti-140S-O₁)

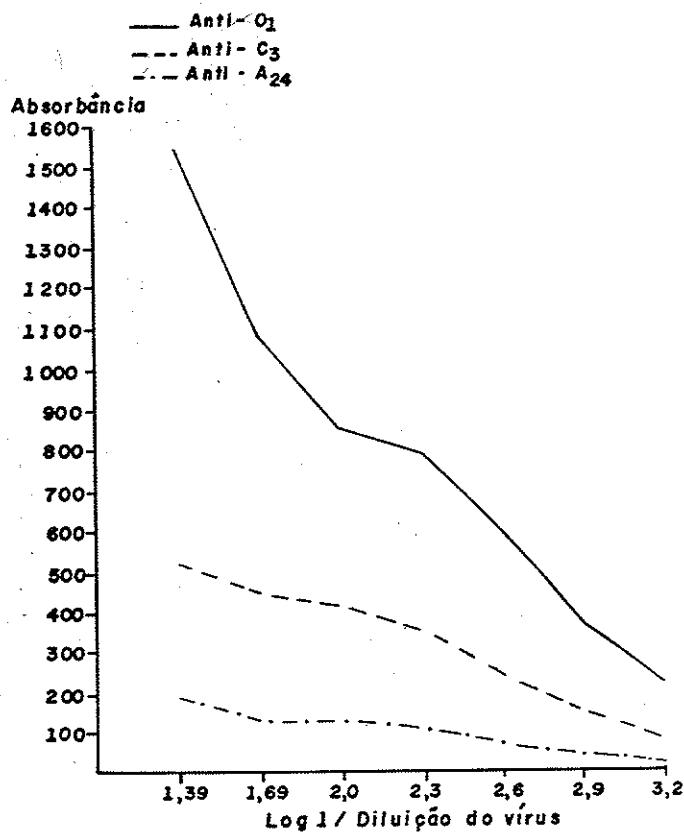


dessa suspensão antigenica, e cuja absorbância correspondente, foi bem maior do que aquelas dos controles da reação (controles dos anticorpos reveladores na ausência de vírus - absorbância = .005). Nessa mesma diluição, ainda foi possível a tipificação dessa amostra viral, pois a absorbância registrada foi, dentro de um limite confiável, maior do que as absorbâncias das reações com os anticorpos reveladores heterólogos. O título para detecção da estirpe O₁ presente em carcaça de camundongo foi, também, de no mínimo 1600, pelas mesmas razões anteriormente expostas, não obstante a maior dificuldade de se tipificar essa amostra viral em face da maior ocorrência de reações heterotípicas cruzadas, principalmente com o anticorpo revelador anti-C₃.

3. Titulação de estirpe Avenceslau do VFA presentes em suspensões antigenicas brutais pelo método do "Sandwich Indireto" do ELISA com anticorpo de captura de búfalo anti-VFA - Os resultados da titulação de 2 amostras das estirpes Avenceslau, cultivadas em células da linhagem BHK-21 encontram-se na Figura 7. A amostra 1 apresentou título igual a 335, enquanto para a amostra 2 o título foi igual a 412 (a maior absorbância dos controles foi de .072, para o anticorpo revelador heterólogo anti-O₁). As reações heterotípicas cruzadas foram mais proeminentes para a amostra 1, especialmente com o anticorpo revelador anti-O₁.

Na Figura 8 são apresentados os resultados da titulação da suspensão antigenica

Figura 5 - Titulação da estirpe O₁ do vírus da febre aftosa proveniente de epitélio do coxim plantar de cobaias, frente aos anticorpos reveladores homólogo (anti-O₁) e heterólogos (anti-A₂₄ e anti-C₃), através do método indireto do ELISA-Teste com anticorpo de captura (gama globulina de coelho anti-140S-O₁)



bruta da estirpe Avenceslau, presente em uma amostra de epitélio lingual bovino, obtendo-se no caso, um título igual a 23. Novamente, ocorreram reações heterotípicas cruzadas mais fortes com o anticorpo revelador anti-O₁ que, entretanto, não impediram a tipificação dessa amostra viral.

4. Comparação entre ELISA e RFC para titulação de estirpe do VFA - Na Tabela 1 é feito uma comparação da sensibilidade do ELISA em relação a RFC, onde é possível constatar que a reação imunoenzimática foi sempre superior a RFC, sendo que a relação título no ELISA/título na RFC foi de 3,8 a 80 vezes maior para o ELISA. Conforme se observa nas Figuras 1 a 8 a especificidade não foi ideal no ELISA, pois houve o desenvolvimento de reações heterotípicas cruzadas, notadamente das estirpes O₁ com anticorpo revelador anti-C₃, da estirpe A₂₄ com o anti-O₁ e anti-C₃, da estirpe C₃ com o anti-O₁ e das estirpes Avenceslau com o anti-O₁, o mesmo não ocorrendo na RFC.

Discussão

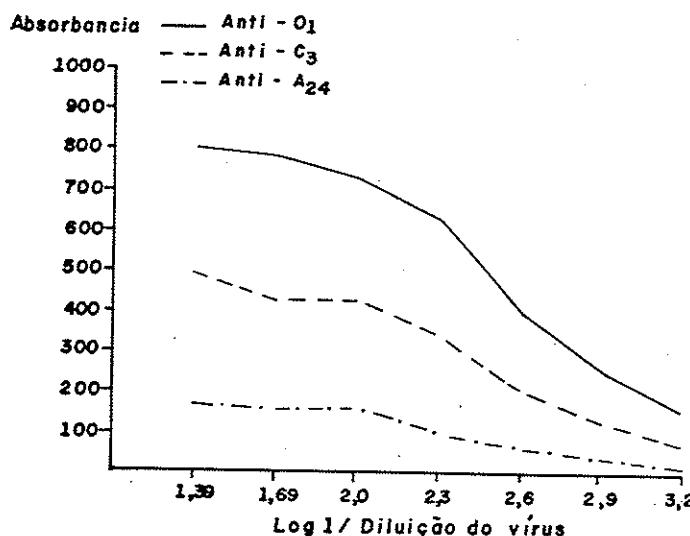
Os resultados do método do "Sandwich Indireto" do ELISA nesse trabalho indicam que essa técnica pode ser usada com vantagens, especialmente em face da maior sensibilidade, na detecção e tipificação direta de estirpes do VFA presentes em suspensões antigênicas brutas.

Esse método permitiu, com a utilização de um único conjugado (anti-imunoglobulina da espécie onde foram produzidos os anticorpos reveladores), identificar os 4 subtipos do VFA mais importantes, sob o ponto de vista epidemiológico no Brasil: O₁, A₂₄, Avenceslau e C₃; tendo inclusive a vantagem de sobrepujar os métodos direto e do "Sandwich" que exigem um conjugado para cada subtipo do VFA (7).

Quando se passa a analisar os resultados das titulações das estirpes O₁, A₂₄ e C₃ do ELISA com anticorpo de captura de coelho anti-VFA O, A e C, verifica-se que a sensibilidade e a especificidade dessa reação não foram iguais para as 3 estirpes, sendo as reações homotípicas decrescentemente maiores para os subtipos O₁, C₃ e A₂₄. Quanto à especificidade, nota-se que as reações heterotípicas cruzadas foram maiores para a estirpe C₃ com anticorpo revelador anti-O₁, relativamente elevadas para a estirpe A₂₄, com anti-O₁ e anti-C₃, e menores para a estirpe O₁ com o anti-C₃. As razões prováveis desses fatos são diferenças na especificidade e sensibilidade dos imunorreagentes usados no teste (anticorpo de captura e reveladores), como também na composição de partículas e subunidades antigênicas virais das suspensões antigênicas brutas (146S, 12S e VIA), sendo que quanto maior a proporção de 12S para 146S, nessas suspensões, maior a ocorrência de reatividade cruzada heterotípica (11, 12).

Além disso, quando se usam misturas antigênicas de subtipos do VFA para imunizar um animal, como é o caso do anticorpo de captura de coelho anti-O, A e C a imunogenicidade de um ou dois dos抗igenos, pode ser mais proeminente, em detrimento dos demais抗igenos. As repetidas imunizações e o tempo mais prolongado de imunização, por sua vez, segundo Rweyemamu & col. (18), levam a uma diminuição

Figura 6 - Titulação da estirpe O₁ do vírus da febre proveniente de carcaças de comundongo, frente aos anticorpos reveladores homólogos (anti-O₁) e heterólogos (anti-A₂₄ e anti-C₃), através do método indireto do ELISA-Teste com anticorpo de captura (gama globulina de coelho anti-140S-O₁)



da especificidade do antissoro produzido.

Embora a performance do anticorpo de captura anti-O, A e C não tenha sido ideal, em virtude principalmente da ocorrência de reações heterotípicas cruzadas, a nossa tentativa foi de simplificar ainda mais o teste, usando no caso, um só anticorpo de captura para detectar os 4 subtipos do VFA (O₁, A₂₄, Avenceslau e C₃).

Quando passamos a analisar os resultados da aplicação do ELISA com anticorpo de captura anti 146S do VFA O₁ para a titulação de estirpe O₁ presente em suspensões de células BHK-21, verificamos que houve uma evolução na performance do teste para a detecção e tipificação desse vírus, pois ocorreu uma elevação da reatividade homotípica que não foi acompanhado por um aumento correspondente nas reatividades heterotípicas, as quais se mantiveram quase nos mesmos valores da reação feita com o anticorpo de captura anti-VFA O, A e C. Uma vez que foram usadas os mesmos anticorpos reveladores, nesses 2 ensaios imunoenzimáticos, com anticorpo de captura anti-VFA O, A e C e anti-146S do VFA O₁, pode-se atribuir a persistência dessa reatividade cruzada heterotípica a uma menor especificidade dos anticorpos reveladores, que provêm dos soros hiperimunes de cobaias anti-VFA sorotipo-específicos e, sobretudo, ao esquema de imunização adotado no preparo desses reagentes. Nesse aspecto, Ouldridge & col. (14) demonstraram a maior especificidade de soros de cobaias primo-imunizadas com partículas 146S do VFA.

Na titulação das 2 amostras da estirpe O₁, presentes em epitélio do coxim plantar de cobaia e em carcaça de camundongo, foram obtidos títulos mais elevados, sugerindo que esses materiais eram mais ricos em componentes抗igênicos do VFA. A reatividade cruzada heterotípica cruzada foi também um pouco mais elevada, especialmente para o material proveniente de camundongo. Isto pode ser decorrente de maior quantidade, nesse material, de抗igenos virais com reatividade cruzada heterotípica (12S e VIA) (12, 18), pois em materiais colhidos de lesões, como epitélio de cobaia e carcaça de camundongo se espera encontrar uma proporção maior de tais抗igenos, com o agravante de que a carcaça de camundongo estava armazenada há mais de 3 anos a -20°C, o que contribuiu ainda mais para a degradação das partículas virais 146S em subunidades 12S.

Na titulação das 2 amostras da estirpe Avenceslau provenientes de cultura de células BHK-21, observou-se um ligeiro declínio da sensibilidade com relação ao teste feito com o anticorpo de captura anti-146S do VFA O₁, mas o principal problema nessa reação, foi também a ocorrência de reações cruzadas heterotípicas mais fortes, notadamente para a amostra 1, onde as reações com anticorpo revelador anti-O₁ foram muito exacerbadas. Os motivos prováveis devem estar vinculados principalmente, como já foi referido, com os tipos de anticorpos reveladores usados e, em menor extensão, ao anticorpo de captura aqui empregado, um sorote que representa um estado imunitário híbrido de provável convalescência à infecção pelo subtipo Avenceslau do VFA e de imunidade tardia pós-vacinal, sendo que, no tocante a isso, Rweyemamu & col. (18) enfatizam a menor especificidade de soros anti-VFA de animais convalescentes.

A performance da reação imunoenzimática para a titulação da estirpe Avenceslau presente no epitélio lingual bovino é quase uma repetição da situação acima explanada, com o agravante da drástica redução da sensibilidade aqui verificada (título = 23). Para avaliarmos as causas desse problema, além das características do anticorpo de captura de búfalo já ressaltadas, merecem atenção mais detalhada o tipo de material抗igênico aqui usado e a ocorrência de maior reatividade nos controles dos anticorpos reveladores. A amostra viral estava armazenada em líquido de Vallée a -20°C há mais de 3 anos e, já é conhecido o efeito negativo sobre a integridade das partículas virais, do armazenamento prolongado do VFA em temperaturas inadequadas. A ocorrência de maior reatividade nos controles dos anticorpos reveladores vem indicar que, de alguma forma, as imunoglobulinas ali presentes, estão ficando retidas, provavelmente pelos anticorpos de captura que não foram absorvidos como os polímeros de células BHK-21 e de gama globulina de cobaia, como foram os anteriores (anti-O, A e C e anti-146S do VFA O₁), que apresentavam reações inespecíficas para imunoglobulinas de cobaia antes de serem absorvidos.

No tocante ao estudo comparativo da sensibilidade do ELISA em relação a RFC, para a identificação sorológica do VFA depara-se com dificuldades na análise final dos dados em vista da ocorrência de uma ampla variação dos títulos das diversas

suspensões antigenicas obtidos nos diferentes ensaios imunoenzimáticos.

Quando comparamos nossos resultados de sensibilidade do ELISA com aqueles obtidos

Figura 7 - Titulação de partidas da estirpe Ayvenceslau do vírus da febre aftosa, cultivadas em células BHK-21, frente ao anticorpo revelador homólogo, anti-Ayvenceslau (— Partida 1 e --- Partida 2) e aos anticorpos reveladores heterólogos, anti-O₁ (— Partida 1 e —x— Partida 2) e anti-C₃ (—...— Partida 1 e --- Partida 2) através do método indireto do ELISA-Teste com anticorpo de captura (gama globulina de búfalo anti-O, A e C)

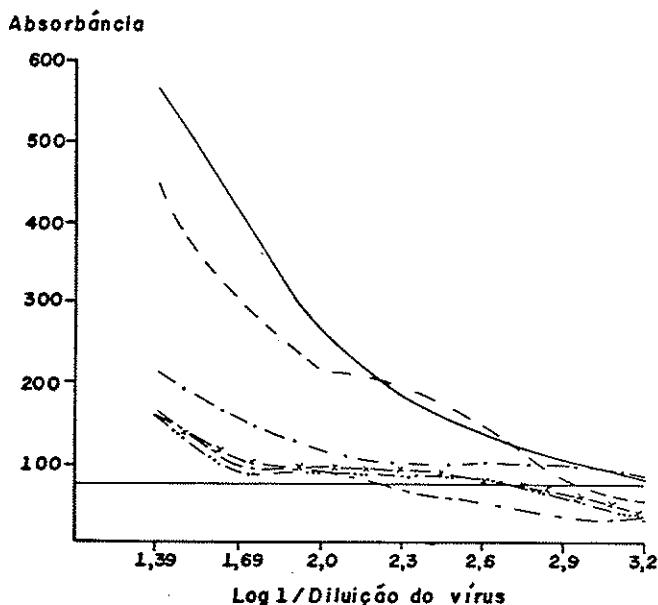
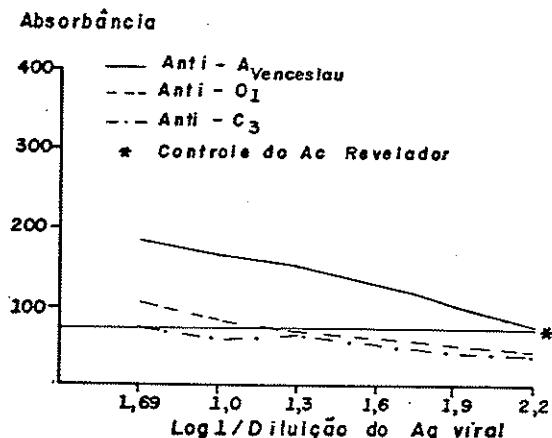


Figura 8 - Titulação da estirpe Ayvenceslau proveniente de epitélio bovino, frente ao anticorpo revelador homólogo (anti-Ayvenceslau) e heterólogos (anti-O₁ e anti-C₃), através do método indireto do ELISA-Teste com anticorpo de captura (gama globulina de búfalo anti-O, A, C)



nos trabalhos (6, 8, 12, 16) surgem dificuldades adicionais para ponderar melhor todos os dados em virtude da diversidade dos reagentes utilizados e, até mesmo, da metodologia adotada em cada um desses trabalhos.

Quanto à especificidade do método do "Sandwich Indireto" do ELISA, para a detecção e tipificação de estirpe do VFA presentes em suspensões antigênicas brutas, verifica-se que os trabalhos de pesquisa realizados anteriormente trazem informações antagônicas. Crowther & Abu Elzein (8), Ouldridge & col. (14) E Hamblin & col. (10) afirmam que não houve interferência de reações cruzadas heterotípicas nesse teste, nem reatividade imunoenzimática considerável com a subunidade 12S, enquanto que Have & col. (11) relatam que não só ocorreu esse tipo de reatividade, como também a reação imunoenzimática com a subunidade 12S do VFA foi mais forte do que com as partículas 146S.

O confronto desses resultados e os do trabalho em apreço torna-se uma tarefa difícil, já que as preparações de anticorpos de captura e reveladores são parcial ou totalmente diferentes em cada um desses trabalhos, e, certamente, o espectro de reatividade de tais imunorreagentes é o principal responsável pelas divergências observadas.

O objetivo fundamental da presente investigação que foi o de identificar os sorotipos do VFA presentes em suspensões antigênicas brutas através do ELISA, embora tenha sido alcançado com resultados promissores, estes trazem, também, indicações que nossa metodologia de trabalho, principalmente no que se refere ao preparo de imunoreagentes com maior especificidade contra o VFA, deverá ser aprimorada.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP e a CPE-UNESP pelo auxílio financeiro concedido.

Referências Bibliográficas

1. Abu Elzein, E.M.E. & Crowther, J.R. - The specific detection of foot and mouth disease virus whole particle antigen (140S) by enzyme labelled-imunosorbent assay. *J. Hyg. Camb.*, 83:127-133, 1979.
2. Avrameas, S. - Coupling the enzymes to protein with glutaraldehyde: use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry*, 6:43-52, 1969.
3. Avrameas, S. & Ternynck, T. - The cross linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoabsorbents. *Immunochemistry*, 6:53-66, 1969.
4. Brown, F. & Cartwright, B. - Purification of radioactive foot and mouth disease virus. *Nature*, 199:1168-1170, 1963.
5. Brown, F. - Molecular basis of antigenic variation in picornaviruses. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 354:202-218, 1980.
6. Camargo, N.F.; Eichorn, E.A.; Levine, J.M.; Tellez-Giron, A.A. - A complement fixation technique for foot and mouth disease and vesicular stomatitis. In: Annual Meeting of the American Veterinary Medical Association, 87º, México, p.207-211, 1950: proceedings.
7. Crowther, J.R. & Abu Elzein, E.M.E. - Detection and quantification of foot and mouth disease virus by enzyme labelled immunosorbent assay techniques. *J. Gen. Virol.*, 42:597-602, 1979.
8. Crowther, J.R. & Abu Elzein, E.M.E. - Application of the enzyme-linked immunosorbent assay to the detection and identification of foot and mouth disease viruses. *J. Hyg. Camb.*, 82:513-519, 1979.
9. Engvall, E. & Perlmann, P. - Enzyme-linked-immunosorbent-assay-quantitative assay of immunoglobulin. *Immunochemistry*, 8:871-874, 1971.
10. Hamblin, C.; Armstrong, R.M. & Hedger, R.S. - A rapid enzyme-linked-immunosorbent-assay for the detection of foot and mouth disease virus in epithelial tissues. *Veterinary Microbiology*, 9:435-443, 1984.

11. Have, P.; Lei, J.C. & Schjerning-Thiesen, K. - An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the primary diagnosis of foot and mouth disease-characterization and comparison with complement fixation. *Acta Veterinaria Scandinavia*, 25:280-296, 1984.
12. Meloen, R.H. & Briaire, J. - A study of the cross-reacting antigens on the intact foot-and-mouth disease virus and its 12S subunits with antisera against the structural proteins. *J. Gen. Virol.*, 51:107-116, 1980.
13. Oliveira, B.; Osler, A.G.; Siraganian, R.P. & Sandberg, A.L. - The biologic activities of guinea pig antibodies. *J. Immunol.*, 104:320-328, 1970.
14. Ouldridge, E.J.; Barnett, P.V. & Rweyemamu, M.M. - The relative efficiency of two ELISA-techniques for the titration of FMD antigen. *Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci.*, 22:142-151, 1982.
15. Pereira, H.G. - Subtyping of foot and mouth disease virus. *Develop. Biol. Standard.*, 35:167-174, 1977.
16. Rai, A. & Lahire, D.K. - A microenzyme-labellle immunosorbent assay (MICROELISA) for the detection of foot and mouth disease virus antigen and antibody. *Acta Virol.*, 25:49-52, 1981.
17. Rivenson, S. - Técnica para la obtención de sueros hiperimunes antiaftoso fijador de complemento de alto título en cobayos. *Rev. Med. Vet. (Buenos Aires)*, 38:13-22, 1956.
18. Rweyemamu, M.M.; Ouldridge, E.L.; Head, M. & Ferrari, R. - The effect of antiserum quality on strain specificity assessment of foot and mouth disease virus by the neutralization reaction. *J. Biol. Standard.*, 12:295-303, 1984.
19. Voller, A.; Bidwell, D.E. & Bartlett, A. - Enzyme immunoassays in diagnostic medicin. *Bull. Wldh. Hlth. Org.*, 53:55-65, 1976.
20. Wardley, R.C.; Abu Elzein, E.M.E.; Crowther, J.R. & Wilkinson, P.J. - A solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of african swine fever virus antigen and antibody. *J. Hyg. Camb.*, 83:363-369, 1979.

OCORRÊNCIA DE CAMPYLOBACTER JEJUNI EM CRIANÇAS COM E SEM DIARRÉIA, EM BELO HORIZONTE*

Edilberto Nogueira Mendes
Dulciene Maria de Magalhães Queiroz

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

Eduardo Osório Cisalpino
José Noronha Peres

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

Francisco José Penna
& Paulo Pimenta Figueiredo Filho

Deptº de Pediatria
Faculdade de Medicina UFMG

Resumo

Campylobacter jejuni foi pesquisado nas fezes de 98 crianças com diarréia aguda e de 30 crianças sem diarréia, menores de 2 anos, em Belo Horizonte, no período de agosto/1982 a janeiro/1984. Amostras de *Campylobacter jejuni* foram isoladas de 11 pacientes (11,2%) e de 2 crianças do grupo controle (6,6%). Entre 10 amostras testadas, apenas uma (10%) revelou a capacidade de produzir enterotoxina termolábil, através do teste de imunohemólise passiva. Nenhuma amostra mostrou-se capaz de produzir enterotoxina termoestável (teste do camundongo recém-nascido), ou de invadir a mucosa do olho de cobaio (teste de Serény). As 11 amostras de *Campylobacter jejuni*, isoladas de crianças com diarréia, mostraram-se sensíveis à Eritromicina, Gentamicina, Amicacina, Canamicina, Neomicina e Cloranfenicol e resistentes à associação Sulfa-metoxazol-trimetoprim. Apenas uma delas (9,1%) foi resistente à Tetraciclina e três (27,3%) à Ampicilina. De acordo com o esquema de biotipagem de Skirrow & Benjamin as 12 amostras de *Campylobacter jejuni* testadas foram classificadas no biotipo 1. Adotando-se o esquema de Hébert & col. classificou-se 10 amostras isoladas de crianças com diarréia como pertencentes ao biotípo 4 e duas amostras isoladas do grupo controle como pertencentes aos biotipos 3 e 4.

Summary

Campylobacter jejuni isolated from children with acute diarrhoea and controls, in Belo Horizonte

* Trabalho realizado no Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia Médica, Faculdade de Medicina UFMG. Parte da tese de mestrado do primeiro autor.

In the last decade, *Campylobacter jejuni* has been recognized as an important agent of acute diarrhoea. However, in Brazil, the pertinent bibliography is scanty, especially in Belo Horizonte, where this pathology contributes for high rates of infantile morbidity and mortality. *Campylobacter jejuni* were searched for in feces of 98 children with acute diarrhoea and 30 children without diarrhoea (control group), all of them younger than two years, in Belo Horizonte MG, Brazil, in the period from August/82 to January/84. Using Butzler's medium, *Campylobacter jejuni* were isolated from 11,2% of the patients with acute diarrhoea and from 6,6% of the control group. Using passive immune hemolysis, only one strain (10%) could be considered LT-enterotoxin-producing and using the suckling mouse test no one strain revealed capacity to produce ST-enterotoxin. All of the tested strains of *Campylobacter jejuni* (11) were sensible to Erythromycin, Gentamicin, Amikacin, Kanamycin, Neomycin and Chloranphenicol and resistant to the association of Sulfa-methoxazole-trimetoprim. Only one strain was resistant to Tetracycline (9,1%) and three strains were resistant to Ampicilin (27,3%). The strains isolated from patients were placed in biotype 4 (15) and biotype 1 (Skirrow & Benjamin). In the control group the strains isolated were placed in biotype 1 (Skirrow & Benjamin) and, according to the biotyping proposal of Hébert & col. (15), one strain was placed in the biotype 3 and the other in biotype 4.

Introdução

A etiologia da diarréia aguda da infância inclui um espectro amplo de agentes como bactérias, vírus, protozoários e fungos (32). Algumas bactérias são, há décadas, consideradas enteropatogênicas. Outras apenas mais recentemente foram reconhecidas como tal e entre elas o *Campylobacter jejuni*, na última década, emergiu como importante causa de enterite humana. Através da utilização de técnicas apropriadas, esse microrganismo tem sido isolado de fezes de crianças com diarréia tão ou mais frequentemente que *Salmonella* ou *Shigella*, sendo encontrado em virtualmente toda região do mundo onde tem sido pesquisado (2).

Os mecanismos envolvidos na enteropatogenicidade do *Campylobacter jejuni* não estão completamente esclarecidos. Existem evidências de que a invasibilidade é o principal mecanismo; entretanto, o teste de Serény tem-se mostrado invariavelmente negativo (4). Por outro lado, não se pode afastar a possibilidade da participação de uma enterotoxina no processo, embora o seu encontro seja irregular, como relatado por diferentes autores (8, 16, 23).

Dante do exposto, considerando-se as elevadas taxas de morbidade e mortalidade por diarréia aguda no mundo em desenvolvimento e a escassez de publicações brasileiras referentes ao assunto, foi desenvolvido este trabalho.

Material e Métodos

População estudada - Foram estudadas, no período compreendido entre agosto de 1982 e fevereiro de 1984, 128 crianças de até 2 anos de idade, de baixo nível sócio-econômico, que não se encontravam em uso de antibacterianos, procedentes dos Hospitais das Clínicas, Sávio Nunes e São Domingos Sávio, em Belo Horizonte, Minas Gerais. Dentre elas, 98 apresentavam diarréia aguda, no máximo com 10 dias de evolução, e 30 não apresentavam sintomatologia gastrointestinal (grupo controle).

Colheita do material - As amostras de fezes foram colhidas através de sonda retal ou imediatamente após evacuação espontânea e processadas laboratorialmente em, no

máximo, duas horas.

Isolamento e identificação - As amostras de fezes foram semeadas em meio de Butzler modificado e incubadas a 42°C em atmosfera de microaerofilia, obtida através do sistema Gas Pak (BBL), sem o emprego do catalizador de paládio (18). As colônias suspeitas, ou seja, lisas e brilhantes, pequenas, às vezes puntiformes, ligeiramente elevadas, translúcidas, não hemolíticas, isoladas ou sob a forma de um "vêu" delgado (26), foram identificadas como *Campylobacter jejuni* através do aspecto característico, da motilidade em saca-rolhas ou em dardo, das provas de oxidase e catalase positivas, da sensibilidade ao ácido nalidíxico na concentração de 30µg, da capacidade de crescimento a 42°C e incapacidade de crescimento a 25°C, da produção de ácido sulfídrico e capacidade de hidrolisar o hipurato de sódio (16).

Biotipagem - A biotipagem das amostras de *Campylobacter jejuni* isoladas foi feita de acordo com os esquemas propostos por Skirrow & Benjamin (25) e Hébert & col. (15).

Pesquisa de enterotoxinas - A capacidade de produzir enterotoxina termolábil (LT) e termoestável (ST) foi pesquisada nas amostras de *Campylobacter jejuni* isoladas empregando-se o teste da imunohemólise passiva (12) e o teste de Dean & col. (10), respectivamente. O meio de cultura utilizado foi preparado de acordo com Ruiz-Palacios & col. (23).

Pesquisa de invasibilidade - Foi pesquisada, através do teste de Serény, em 12 amostras, de acordo com a metodologia descrita por Toledo & Trabulsi (27).

Antibiograma - As amostras de *Campylobacter jejuni* isoladas foram submetidas a testes de susceptibilidade a antimicrobianos através do método de difusão (22), utilizando-se discos BBL das seguintes drogas: Amicacina, Ampicilina, Canamicina, Cloranfenicol, Eritromicina, Gentamicina, Neomicina, Sulfametoxazol-trimetoprim e Tetraciclina. No controle de qualidade, foram empregadas amostras padrão de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Bactrol Disks Set B-Difco), preparadas de acordo com as instruções do fabricante.

Resultados

Amostras de *Campylobacter jejuni* foram isoladas de 11 pacientes com diarréia aguda (11,2%) e de duas crianças (6,6%) do grupo controle.

Entre as 12 amostras classificadas quanto ao biotipo todas foram incluídas no biotipo 1 de acordo com Skirrow & Benjamin (25). Adotando-se o esquema proposto por Hébert & col. (15) 10 amostras isoladas de crianças com diarréia aguda foram incluídas no biotipo 4 e, no grupo controle, uma amostra foi classificada como pertencente ao biotipo 3 e a outra ao biotipo 4.

Entre as 10 amostras de *Campylobacter jejuni* testadas, isoladas de crianças com diarréia aguda, apenas uma amostra demonstrou capacidade de produzir enterotoxina LT. No grupo controle nenhuma amostra revelou esta propriedade. A produção de toxina ST não foi detectada nas 12 amostras testadas.

A pesquisa de invasibilidade (Teste de Serény) foi negativa em todas as amostras testadas.

As 11 amostras de *Campylobacter jejuni* isoladas a partir das fezes de crianças portadoras de diarréia aguda foram suscetíveis à Eritromicina, Gentamicina, Amicacina, Canamicina, Neomicina e Cloranfenicol e resistentes à associação Sulfametoxazol-trimetoprim. Apenas uma amostra (9,1%) apresentou resistência à Tetraciclina e três (27,3%) mostraram resistência à Ampicilina.

Discussão

Os resultados deste trabalho evidenciam a importante participação do

Campylobacter jejuni na etiologia da diarréia aguda da infância, em Belo Horizonte, onde foi observada incidência maior (11,2%) que a relatada por outros autores, no Brasil, como Ricciardi & col. (22) e Ricciardi & Ferreira (21) que isolaram, no Rio de Janeiro, este microrganismo em 2,4% e 6,4%, respectivamente, e Jaramillo (16) que, em São Paulo, encontrou esta bactéria em 7,4% dos casos. Frequência mais elevada (18,5%) foi relatada por Magalhães & col. (17), em Recife.

Resultados semelhantes ao encontrado neste estudo foram relatados por Billingham (1), em Gambia (14,8%); por DeMol & Bosmans (11), em Rwanda (11,0%) e por Glass & col. (13), em Bangladesh (14,0%). Por outro lado, nos países desenvolvidos, o *Campylobacter jejuni* tem sido identificado como agente de diarréia aguda em menor incidência. Skirrow (24), na Inglaterra, relatou o encontro do microrganismo em 7,1%; Walder (29), na Suécia, em 6,9%; Pai & col. (19), no Canadá, em 4,3%; Butzler & col. (9), na Bélgica, em 5,1% e Blaser & col. (5), nos Estados Unidos, em 4,6%. Estes dados mostram ampla variação na incidência da diarréia aguda causada por *Campylobacter jejuni*, devendo-se enfatizar, entretanto, a importância do microrganismo como agente de diarréia, tanto nos países desenvolvidos como nos em desenvolvimento.

Neste estudo foi encontrada frequência relativamente elevada de portadores assintomáticos de *Campylobacter jejuni* não tendo sido observada diferença estatisticamente significativa entre as crianças com e sem diarréia ($\chi^2 = 0,84$), resultado semelhante ao relatado por Jaramillo (16) em São Paulo. Nos países desenvolvidos, o encontro de portadores assintomáticos de *Campylobacter jejuni* é um evento raro (3, 9, 25). No entanto, nos países em desenvolvimento, é frequente o isolamento do *Campylobacter jejuni* na população sem diarréia (3, 12, 20), o que pode ser explicado pela ocorrência provável de um contato precoce com o microrganismo e, consequentemente, desenvolvimento de imunidade (6).

Com relação à biotipagem, os resultados encontrados no presente estudo apresentam diferenças quando comparados com os relatos de outros autores, em diversas partes do mundo (15, 16, 25, 33). Estas discrepâncias podem estar relacionadas a diferenças regionais, tornando necessário o desenvolvimento de pesquisas desta natureza para que se possa compreender melhor a epidemiologia da enterite por *Campylobacter jejuni*.

Neste trabalho, apenas uma dentre as amostras de *Campylobacter jejuni* testadas demonstrou capacidade de produzir enterotoxina termolábil e nenhuma de produzir enterotoxina termoestável. Os relatos da literatura são discordantes quanto a este assunto. Butzler & Skirrow (8) relataram o encontro de amostras produtoras de enterotoxina termoestável, fato que não tem sido reproduzido por outros autores (14, 16). Por outro lado, a pesquisa de enterotoxina termolábil foi negativa nas amostras testadas por Guerrant & col. (14), Butzler & Skirrow (8) e Jaramillo (16), entre outros, e positiva em 24 amostras (75%) ensaiadas por Ruiz-Palacios & col. (23). A capacidade de produzir enterotoxinas pode ser de natureza plasmidial e perder-se após sucessivas passagens em meios de cultura sendo, portanto, recomendado que a pesquisa destas enterotoxinas seja realizada em amostras recentemente isoladas. É indicado, ainda, empregar-se meios de cultura e técnicas de detecção sensíveis para que se possa revelar pequenas quantidades destas substâncias. Estes fatores podem ser os responsáveis pelas diferenças registradas pelos diversos autores. É ainda necessário pesquisar-se o real papel das enterotoxinas na patogenia da diarréia humana causada pelo *Campylobacter jejuni*.

Foi observada resistência à associação Sulfametoaxazol-trimetoprim, à Ampicilina e à Tetraciclina, o que pode estar relacionado ao uso amplamente difundido destes antimicrobianos, favorecendo a seleção de amostras resistentes (31). Por outro lado, neste trabalho, nenhuma das amostras de *Campylobacter jejuni* mostrou resistência à Eritromicina. Entretanto, a resistência a este antibacteriano tem sido relatada em vários países (7, 28, 30) sendo necessária uma vigilância contínua da sensibilidade a essa droga, considerada a mais indicada no tratamento dos casos nos quais a terapêutica específica é indispensável.

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com apoio financeiro do Conselho Nacional de

Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e do Conselho de Pesquisa (Cpq/UFGM).

Referências Bibliográficas

1. Billingham, J.D. - A comparison of two media for the isolation of *Campylobacter* in the tropics. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 15:645-646, 1981.
2. Blaser, M.J. & Reller, L.B. - *Campylobacter enteritis*. *N. Engl. J. Med.*, 305:1444-1452, 1981.
3. Blaser, M.J.; La Force, F.M.; Wilson, N.A. & Wang, W.L.L. - Reservoirs for human campylobacteriosis. *J. Infect. Dis.*, 14:655-667, 1980.
4. Blaser, M.J.; Parsons, R.B. & Wang, W.L.L. - Acute colitis caused by *Campylobacter fetus* ssp. *jejuni*. *Gastroenterol.*, 18:448-453, 1980.
5. Blaser, M.J.; Duncan, D.J.; Osterholm, M.T.; Istre, G.R. & Wang, W.L.L. - Serologic study of two clusters of infection due to *Campylobacter jejuni*. *J. Infect. Dis.*, 147:820-823, 1983.
6. Blaser, M.J.; Taylor, D.N. & Feldman, R.A. - Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections. *Epidemiol. Rev.*, 5:157-176, 1983.
7. Branski, D.; Roll, D.; Gross-Kieselstein, E.; Gross, V.; Greenberg, L. & Abrahamov, A. - *Campylobacter enteritis* in infants and young children. *Isr. J. Med. Sci.*, 18:615-617, 1982.
8. Butzler, J.P. & Skirrow, M.B. - *Campylobacter enteritis*. *Clin. Gastroenterol.*, 8:737-765, 1979.
9. Butzler, J.P.; Dekeyser, P.; Detrain, M. & Dehaen, F. - Related vibrios in stools. *J. Pediatr.*, 82:493-495, 1973.
10. Dean, A.G.; Ching, Y.C.; Williams, R.G. & Harden, L.B. - Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.*, 125:407-411, 1972.
11. De Mol, P. & Bosmans, E. - *Campylobacter enteritis* in Central Africa. *Lancet*, 1:604, 1978.
12. Gatti, M.S.V. - Fatores de virulência em amostras de colibacilos enteropatogênicos isolados no Brasil. São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1983. (Tese de Mestrado).
13. Glass, R.I.; Stoll, B.J.; Huq, M.I.; Struelens, M.J.; Blaser, M. & Kibriya, A.K.M.G. - Epidemiologic and clinical features of endemic *Campylobacter jejuni* infection in Bangladesh. *J. Infect. Dis.*, 148:292-296, 1983.
14. Guerrant, R.L.; Lahita, R.G.; Winn, W.C. & Roberts, R.B. - *Campylobacteriosis* in man: pathogenic mechanisms and review of 91 bloodstream infections. *Am. J. Med.*, 65:584-592, 1978.
15. Hébert, G.A.; Hollis, D.G.; Weaver, R.E.; Lambert, M.A.; Blaser, M.J. & Moss, C.W. - 30 years of campylobacters: biochemical characteristics and a biotyping proposal for *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.*, 15:1065-1073, 1982.
16. Jaramillo, H.F. - Espécies termófilas de *Campylobacter*: aspectos bacteriológicos, epidemiológicos e patogênicos. São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1983. (Tese de Doutorado).
17. Magalhães, M.; Andrade, M.A. & Silva, G.P. - Simple and inexpensive method for culturing *Campylobacter fetus* subsp *jejuni*. *Rev. Microbiol.* (São Paulo), 13:124-125, 1982.
18. Megraud, F. & Latrille, J. - *Campylobacter jejuni* en pathologie humaine. II - Diagnostic biologique et épidémiologie. *Pathol. Biol.*, 29:305-314, 1981.
19. Pai, C.H.; Sorger, S.; Lackman, L.; Sinai, M.D. & Marks, M.I. - *Campylobacter gastroenteritis* in children. *J. Pediatr.*, 94:589-591, 1979.
20. Rajan, D.P. & Mathan, V.I. - Prevalence of *Campylobacter fetus* subsp *jejuni* in healthy populations in southern India. *J. Clin. Microbiol.*, 15:749-751, 1982.
21. Ricciardi, I.D. & Ferreira, M.C.S. - The age distribution in children with *Campylobacter enteritis*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 74:687, 1980.
22. Ricciardi, I.D.; Ferreira, M.C.S.; Otto, S.S.; Oliveira, N.; Sabrá, A. & Fontes, C.F. - Thermophilic *Campylobacter* - associated diarrhoea in Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Pesq. Med. Biol.*, 12:189-191, 1979.

23. Ruiz-Palacios, G.M.; Torres, J.; Torres, N.I.; Escamilla, E.; Ruiz-Palacios, B.R. & Tamayo, J. - Cholera-like enterotoxin produced by *Campylobacter jejuni*. *Lancet*, 2:250-252, 1983.
24. Skirrow, M.B. - *Campylobacter enteritis*: a new disease. *Br. Med. J.*, 2:9-11, 1977.
25. Skirrow, M.B. & Benjamin, J. - Differentiation of enteropathogenic *Campylobacter*. *J. Clin. Pathol.*, 33:1122, 1980.
26. Snubert, R.M. - Aerobic/microaerophilic, motile, helical/vibrioid gram-negative bacteria: genus *Campylobacter*. In: - Krieg, N.R. & Holt, J.G., eds. - *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins, v.1, sect. 2, p.111-118, 1984.
27. Toledo, M.R.F. & Trabulsi, L.R. - Enteropatogenicidade e comportamento bioquímico do colibacilo 0136: K78 (B22). *Rev. Inst. Med. Trop. (São Paulo)*, 11:425-429, 1969.
28. Vanhoof, R.; Vanderlinde, M.P.; Dierickx, R.; Lawrens, S.; Yourassowsky, E. & Butzler, J.P. - Susceptibility of *Campylobacter fetus* ssp. *jejuni* to twenty nine antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 14:553-556, 1978.
29. Walder, M. - Susceptibility of *Campylobacter fetus* ssp. *jejuni* to twenty antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 16:37-39, 1979.
30. Walder, M. - Epidemiology of *Campylobacter enteritis*. *Scand. J. Infect. Dis.*, 14:27-33, 1982.
31. W.H.O. Scientific Working Group - Antimicrobial resistance. *Bull. WHO*, 61:383-394, 1983.
32. W.H.O. Scientific Working Group - Enteric infections due to *Campylobacter*, *Versinia*, *Salmonella*, and *Shigella*. *Bull. WHO*, 58:519-537, 1980.
33. Wright, E.P. - The occurrence of *Campylobacter jejuni* in dog feces from a public park. *J. Hyg.*, 89:191-194, 1982.

MÉTODO QUANTITATIVO PARA AVALIAÇÃO DA PLACA DENTAL

Alice Herminia Serpentino
 Manoel Armando Azevedo dos Santos
 Eduardo do Nascimento Mós

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

& Claudio Santos Ferreira

Deptº de Parasitologia
 Instituto de Ciências Biomédicas USP

Resumo

É demonstrada nova técnica para quantificação de placa dental formada "in vitro", sobre lâminula, através do uso de microscópico óptico comum adaptado com célula do tipo fotorresistor, na ocular, e multímetro, para registro.

Summary

Dental plaque evaluation by quantitative method

A new technic is demonstrated for quantification of dental plaque formation "in vitro", on glass-slide, by using the simple microscopic adapted with fotorresistor cell and multimeter, for register.

Introdução

Para avaliação quantitativa da placa dental formada "in vitro", é sugerida a montagem de um instrumento indicado para medir, através do microscópio, intensidade de luz transmitida ou refletida, utilizando célula do tipo fotorresistor (2, 3). Avaliações de intensidades luminosas, em termos de valores de resistência elétrica, são feitas por intermédio de multímetro utilizável como microcolorímetro ou microturbidímetro, que pode substituir equipamentos cujo preço torne inviável sua aquisição em determinadas circunstâncias.

Descrição

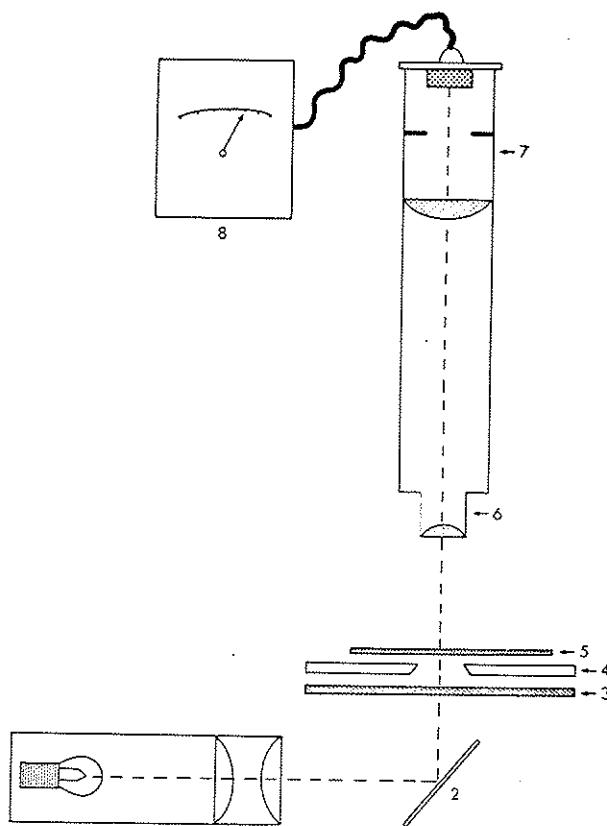
Utiliza-se microscópio mono ou binocular, com fonte de iluminação interna ou externa, sendo entretanto conveniente ligar a lâmpada a uma fonte estabilizada de corrente para evitar os erros resultantes de variações de intensidade luminosa durante as leituras. Um acumulador do tipo usado em automóveis pode desempenhar esse papel. Deve ser ligado um resistor em série se a voltagem do acumulador for superior à indicada para a lâmpada.

A célula fotoelétrica é do tipo "LDR", de sulfeto de cádmio (CdS). Sua resistência elétrica é função da intensidade da luz incidente sobre o elemento sensível. Deve ser montada no tubo de microscópio, de preferência no plano onde se forma a imagem projetada pela objetiva, em um tubo a ser colocado no lugar onde se insere a ocular. Uma ocular poderá servir de suporte para a célula.

O multímetro (instrumento de medidas elétricas) deve ter sensibilidade suficiente

Figura 1 - Componentes.

Símbolos: 1 = Fonte de luz dotada de condensador; 2 = Espelho plano; 3 = Filtro óptico; 4 = Platina de microscópio; 5 = Lâmina (porta-objeto); 6 = Objetiva; 7 = Ocular modificada (com célula fotoelétrica); 8 = Instrumento medidor de resistência elétrica



para medir resistências elétricas na região de megohms ($1\text{ Mohm} = 10^6\text{ ohms}$) e permitir leituras precisas. Os modelos simples possuem microamperímetro, um conjunto de resistores e fonte de corrente constituída por pilhas comuns, dispensando circuitos eletrônicos.

Os filtros devem ser colocados em algum ponto da trajetória dos raios luminosos, entre a lâmpada e o condensador. Devem ser escolhidos de acordo com as finalidades. Para determinações turbidimétricas recomenda-se filtros azuis.

Ligações

A célula é ligada por meio de fios flexíveis, de comprimento conveniente, ao multímetro. Todas as conexões devem ser soldadas.

Operação

Montada a célula no microscópio, deve-se inicialmente regular a intensidade

luminosa e a sensibilidade do multímetro para que seja possível levar o instrumento a marcar zero ohms com o filtro instalado. Para medir turbidez de material colocado entre lâmina e laminula, é usada outra lâmina com laminula, sem a preparação, para servir de "branco". A resposta da célula de CdS é relativamente lenta, devendo se esperar o tempo necessário para sua estabilização. Entretanto, tomada essa precaução, os resultados das leituras serão suficientemente precisos.

Aferição

O equipamento descrito permite medir valores de resistência de célula enquanto sobre esta incidir a luz proveniente do sistema de iluminação do microscópio, atenuada de modo mais ou menos intenso pelas preparações colocadas sobre a platina. É necessário, entretanto, medir a diferença entre a intensidade da luz após a passagem pelo "branco" e pela preparação. Essencialmente, esse processo consiste em colocarem-se no caminho do feixe luminoso (sobre a platina do microscópio), sucessivamente, o branco e filtros que transmitam percentagens conhecidas da luz incidente sobre eles e anotar os valores correspondentes de resistência elétrica. Por meio de regressão linear, usando-se os logarítmos dos valores de resistência elétrica e absorbância (calculada como 2-log transmitância ou obtida a partir de tabela), chega-se à equação que permitirá calcular valores quaisquer de absorbância a partir dos de resistência elétrica, fornecidos pelo multímetro. Elabora-se então uma tabela em que são confrontados valores de resistência, absorbância e transmitância.

Não sendo possível conseguir os filtros citados, podem-se improvisar cubetas para fotometria usando lâminas de microscopia. Sobre uma lâmina colocam-se, separados entre si por um espaço de cerca de 20 ou 30 milímetros, dois pedaços retangulares de vidro cortados de outra lâmina, tendo o comprimento igual ou pouco menor que a largura da lâmina. Coladas à superfície da lâmina, essas peças servirão de suporte a uma laminula, limitando um espaço que terá altura correspondente à espessura da lâmina (cerca de 1mm). Soluções de corantes solúveis em água serão colocados nas cubetas improvisadas, devendo ser conhecidas as relações entre suas concentrações. Escolhidos os corantes e filtros adequados, os valores de absorbância serão diretamente proporcionais à concentrações.

Aplicação

Para avaliar a sensibilidade do método proposto, na quantificação da placa dental formada "in vitro" (1), foram realizados exercícios utilizando sacarose (5%) e xilitol (5%) como padrões positivo e negativo, respectivamente, de indução de placa, amostra de *Streptococcus mutans* e laminula de vidro em caldo PY (PRAS).

Foi determinada a absorbância de um total de 82 placas formadas sobre laminulas, sendo 40 correspondentes ao grupo xilitol e 42 ao sacarose, através de 10 leituras para cada laminula.

Face aos resultados obtidos, expressos em média de absorbância, 0,2373 para sacarose e 0,0175 para xilitol, comprovadores da identidade dos padrões utilizados, conclui-se que: a simplicidade, baixo custo operacional e rapidez do método proposto, aliados à sensibilidade dessa metodologia para quantificar placa dental formada "in vitro", justificam seu uso rotineiro nas análises quantitativas da placa dental.

Referências Bibliográficas

1. Araújo, W.C. - Microbiologia oral: manual de exercícios práticos. Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1971.
2. Ewing, G.W. - Instrumental methods of chemical analysis. New York, McGraw-Hill, 1960.
3. Ferreira, C.S. - Avaliação de técnicas de pesquisa de ovos de helmintos nas fezes: alguns aspectos básicos. São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas USP, 1978. (Tese de Docência Livre).

TRANSFERÊNCIA DE PLASMÍDIOS E DE MARCAS CROMOSSÔMICAS EM *ZYMO-* *NAS MOBILIS*

Jairo Pizzi de Assis

Deptº de Morfologia
Universidade Federal de Sergipe
Campus Universitário
49000 Aracaju SE, Brasil

Walter Vieira Guimarães
Arnaldo Chaer Borges
Elza Fernandes de Araújo
& Daison Olzany Silva

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

Resumo

Os plasmídios RP4 e R68.45 foram transferidos para *Zymomonas mobilis* CP4 pelo processo de conjugação. A estabilidade da marca de resistência à kanamicina, promovida por estes plasmídios foi elevada. No entanto, a estabilidade da marca de resistência à tetraciclina foi baixa. A frequência de transferência dos referidos plasmídios, em *Z. mobilis* aumentou nas primeiras quatro horas de cruzamento, sendo o plasmídio R68.45 transferido com maior frequência que o RP4. O plasmídio R68.45 foi capaz de mobilizar as marcas cromossômicas his, trp e cys, nas frequências de $8,2 \times 10^{-5}$, $9,8 \times 10^{-6}$ e $2,5 \times 10^{-6}$ recombinantes/doador, respectivamente. Estas frequências foram 215, 70 e 12,5 vezes maiores que as frequências de reversão para os respectivos tipos selvagens. O RP4 não promoveu a mobilização de marcas cromossômicas.

Summary

Plasmids and chromosome transfer in Zymomonas mobilis

The plasmids RP4 and R68.45 were transferred by conjugation into *Zymomonas mobilis* CP4. The resistance marker stability promoted by these plasmids was high to kanamycin and low to tetracycline. The transfer frequency of these plasmids into *Z. mobilis* CP4 increased in the first four hours of mating and R68.45 was transferred at higher frequency than RP4. The plasmid R68.45 mobilized the chromosome markers his, trp and cys, in the frequencies of 8.2×10^{-5} , 9.8×10^{-6} and 2.5×10^{-6} recombinants/donor, respectively. These frequencies were 215, 70 and 12,5 times higher than the spontaneous reversion frequencies to the wild type. The plasmid RP4 did not promote chromosome transfer.

Introdução

O etanol pode ser obtido industrialmente, por processos de síntese química ou de fermentação. Este último é o mais utilizado no Brasil e nele são empregadas

leveduras, usualmente dos gêneros *Saccharomyces* ou *Schizosaccharomyces*, que fermentam açúcares a etanol. Contudo, a fermentação alcoólica pode também ser realizada por bactérias. Entre estas, *Zymomonas mobilis* é considerada como uma das mais promissoras para utilização em indústrias (1, 14, 17).

Z. mobilis tem sido caracterizada como sendo capaz de produzir maiores quantidades de etanol a partir de glicose ou frutose, do que as leveduras (15). No entanto, com sacarose, o rendimento alcoólico é menor, o que pode ser atribuído, entre outras razões, à produção de levano, um polímero de frutose excretado pelas células (11).

Estudos genéticos em *Z. mobilis* demonstraram a possibilidade da bactéria ser utilizada como receptoras e doadoras de diferentes plasmídios. Skotnicki & col. (13) em cruzamento intergenérico, transferiram os plasmídios Rldrd19, pRD1 e R68.45 para diferentes estirpes de *Z. mobilis*. As maiores frequências atingiram valores acima de 10^{-1} transconjugantes/doador, o que expressa a grande capacidade receptora das estirpes utilizadas. Stokes & col. (15), também em cruzamentos intergenéricos, transferiram os plasmídios RP1 e R68 para estirpes de *Z. mobilis*, no entanto, as frequências obtidas eram menores, da ordem de 10^{-6} transconjugantes/doador. Em cruzamentos intraespecíficos a frequência de transferência dos plasmídios ultrapassou o valor de 10^{-1} transconjugantes/doador, na maioria dos casos (13), indicando que *Z. mobilis*, além de funcionar como boa receptora pode funcionar também como doadora.

Skotnicki & col. (13) relataram a transferência de marcas cromossômicas para a resistência à rifampicina em *Z. mobilis*, utilizando o plasmídio R68.45 em que obtiveram a frequência de 9×10^{-7} recombinantes por doador. Goodman & col. (8) encontraram frequências de 9×10^{-5} e 2×10^{-4} recombinantes/receptora quando utilizaram o mesmo plasmídio para a mobilização das marcas adenina e triptofano, respectivamente.

A constatação da existência de plasmídios em *Z. mobilis* (16, 18) e de marcadores genéticos para a resistência aos antibióticos gentamicina, kanamicina e estreptomicina (19) tornou mais factível o objetivo de se conseguir um veículo de clonagem adequado para *Z. mobilis*. A transformação em *Z. mobilis*, processo importante para trabalhos de engenharia genética, foi obtida com a utilização de variação no método desenvolvido para *E. coli* (2). Assim, foram associados um plasmídio criptico de *Z. mobilis* com um plasmídio de *E. coli*, contendo marcas de resistência a antibióticos, conseguindo-se transformantes com frequência da ordem de 5×10^{-3} por μg de DNA.

Para que *Z. mobilis* possa ser utilizada na produção comercial de etanol é necessário melhorar seu rendimento alcoólico, a partir da fermentação de sacarose e também ampliar a relação de substratos que possam ser utilizados pela bactéria. A associação de métodos tradicionais de genética microbiana com as novas técnicas de DNA recombinante tem sido preconizada como a melhor forma para o melhoramento desejado em *Z. mobilis*.

Com o objetivo de estabelecer um sistema de transferência de genes, em alta frequência, foram estudados a cinética de transmissão dos plasmídios e a transferência de marcas cromossômicas em *Z. mobilis*.

Material e Métodos

As bactérias utilizadas, suas características e origens estão indicadas na Tabela 1.

Para o crescimento de *Z. mobilis* foi utilizado o meio RM (13); para obtenção de mutantes auxotróficos o meio mínimo e o procedimento recomendado por Goodman & col. (8).

A transferência de plasmídios foi feita cruzando-se as doadoras *E. coli* J53 (RP4) e J53 (R68.45) com receptora *Z. mobilis* CP4. Culturas ativas das doadoras, crescidas em caldo nutritivo, foram misturadas com células receptoras, na proporção aproximada de 1:10, em caldo RM. Após 4h de incubação a 30°C, aliquotas de 0,1ml das misturas foram espalhadas, individualmente, na superfície de Ágar-RM acrescido de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de kanamicina e de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ácido nalidíxico. Os controles foram

Tabela 1 - Características relevantes das bactérias *Escherichia coli* e *Zymomonas mobilis* utilizadas.

Símbolos: Ap = Ampicilina; Km = Kanamicina; Nx = Ácido nalidíxico; Rf = Rifampicina; Tc = Tetraciclina; Cys = Cisteina; His = Histidina; Trp = Triptofano; R = Resistente; S = Sensível; PRC = Plasmid Reference Center (Stanford University, School of Medicine, Stanford, California, USA)

Bactérias	Plasmídios	Características fenotípicas		
		Origem cromossômica	Origem plasmidial	Origem
<i>E. coli</i>				
J53	RP4	Nx ^R Ap ^S	Ap ^R Km ^R Tc ^R	PRC
RR1	R68.45	Nx ^R Rf ^S	Ap ^R Km ^R Tc ^R	M. Skotnicki
<i>Z. mobilis</i>				
CP4	-	Km ^S Nx ^R Rf ^S	-	Gonçalves de Lima
CP41	-	Km ^S Nx ^R Rf ^R	-	presente trabalho
CP404	RP4	Nx ^R Rf ^S	Ap ^R Km ^R Tc ^R	" "
CP410	-	His ^R Km ^S Nx ^R Rf ^R	-	" "
CP412	-	Cys ^R Km ^S Nx ^R Rf ^R	-	" "
CP413	-	Trp ^R Km ^S Nx ^R Rf ^R	-	" "
CP445	R68.45	Nx ^R Rf ^S	Ap ^R Km ^R Tc ^R	" "

feitos semeando-se no mesmo meio seletivo, 0,1ml de cada doadora e 0,1ml da receptora, separadamente. Após 72h de incubação a 30°C os transconjugantes foram purificados no mesmo meio seletivo. Os transconjugantes obtidos foram caracterizados pelo crescimento a 30°C, mas não a 42°C, pela produção de álcool em caldo de cana e pela ausência de crescimento em caldo nutritivo. Com os testes de resistência a Ap, Km, Tc, Nx e Rf completou-se a caracterização dos transconjugantes. A conservação dos transconjugantes foi feita em caldo RM acrescido de 50µg/ml de kanamicina e 50µg/ml de ácido nalidíxico, com repicagens a cada 3 a 4 semanas.

A cinética de transmissão de plasmídios entre as culturas de *Z. mobilis* foi feita após a obtenção de uma receptora resistente à rifampicina. Para os cruzamentos, utilizaram-se os transconjugantes CP404 e CP445, contendo os plasmídios RP4 e R68.45 respectivamente, e a cultura CP41, como receptora. As culturas doadoras e receptoras foram cultivadas, individualmente, em caldo RM à 30°C até a fase logarítmica de crescimento. Em sequida, 0,5ml de cada doadora foi misturado com 1,5ml da receptora, em 3ml de caldo RM. Após 0, 1, 2, 4 e 6h de incubação a 30°C, os cruzamentos foram interrompidos por agitação e aliquotas de 0,1ml foram espalhadas, individualmente, na superfície de Ágar-RM contendo 100µg/ml de kanamicina e de rifampicina. Os transconjugantes foram contados após a incubação a 30°C por 96 horas.

A estabilidade dos plasmídios RP4 e R68.45 nos transconjugantes de *Z. mobilis* foi ensaiada após o crescimento das culturas em caldo RM contendo 100µg/ml de ampicilina, de kanamicina e de tetraciclina. Elas foram transferidas diariamente, durante 7 dias, para caldo RM sem antibióticos. A cada dia eram feitas diluições e semeaduras das culturas em meio RM. Após o aparecimento das colônias eram feitas réplicas para três placas com RM contendo, individualmente, 100µg/ml de ampicilina, de kanamicina ou de tetraciclina. Após a incubação a 30°C, por 48 horas, determinou-se o número de transconjugantes que mantinham a capacidade de crescer no meio com os antibióticos.

A transferência de marcas cromossômicas entre as culturas de *Z. mobilis* foi realizada por cruzamento entre os transconjugantes CP404 e CP445 com as receptoras CP410, CP412 e CP413. Aliquotas de 0,5ml de células doadoras, em fase ativa de crescimento, foram misturadas com 1,5ml de células receptoras em 3,0ml de caldo RM.

Após 4h de cruzamento as células foram centrifugadas a 1.200xg por 10 minutos e ressuspensas em 5mL de meio mínimo (8). A seguir 0,1mL das células foram espalhadas na superfície Ágar-meio mínimo acrescido de 50µg/ml de rifampicina. Os controles foram feitos inoculando-se as doadoras e receptoras, separadamente, no mesmo meio mínimo seletivo. O número de recombinantes foi determinado após 5 dias de incubação a 30°C.

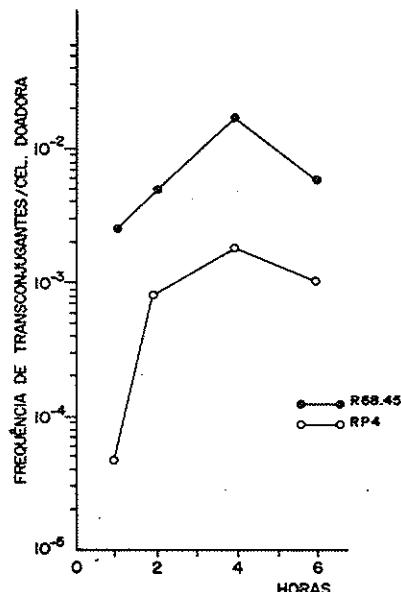
Resultados e Discussão

Dos cruzamentos entre as células doadoras *Escherichia coli* J53 (RP4) e RR1 (R68.45) e a receptora *Z. mobilis* CP4 foram obtidos os transconjugantes CP404 e CP445, respectivamente. Estes se comportaram como *Z. mobilis* nos testes de caracterização e expressaram integralmente as marcas de resistência aos antibióticos codificados pelos plasmídios (Tabela 2). A frequência de transferência dos plasmídios RP4 e R68.45 nos cruzamentos intergenéricos não foi determinada, porém, observou-se uma redução do número de transconjugantes após 4 horas de conjugação, o que pode ser atribuído à sensibilidade de *E. coli* ao álcool que se formou no caldo RM, após o crescimento de *Z. mobilis*. A transferência de plasmídios de resistência para *Z. mobilis*, em cruzamentos intergenéricos foi constatada pela primeira vez por Skotnicki & col. (13), utilizando os plasmídios pJB4J1, R68.45 e pRD1, pertencentes ao grupo IncP1 e o plasmídio R1drd19, do grupo IncFII. A frequência de transferência destes plasmídios foi relativamente elevada, em alguns casos, com frequência maior que 10^{-1} , demonstrando a facilidade com que estes plasmídios são transferidos entre os diferentes gêneros. Em 1982, Dally & col. (5), utilizando outros plasmídios do grupo IncP1, demonstraram a capacidade de *Z. mobilis* receber plasmídios; no entanto, as maiores frequências obtidas foram bem inferiores às encontradas por Skotnicki & col. (13). A diferença entre os resultados pode ser em razão das características dos plasmídios, das receptoras ou das metodologias utilizadas para os cruzamentos.

Tabela 2 - Caracterização das estírpes doadoras, receptora e transconjugantes nos cruzamentos intergenéricos entre *Escherichia coli* J53 (RP4), J53 (R68.45) e *Zymomonas mobilis* CP4.

Símbolos: + = Com crescimento; - = Sem crescimento

Figura 1 - Cinética de transferência dos plasmídios RP4 e R68.45 de *Zymomonas mobilis* CP404 e CP445 para CP41, respectivamente



Meios de cultura	Estírpes conjugantes			Transconjugantes	
	<i>E. coli</i> J53 (RP4)	RR1 (68.45)	<i>Z. mobilis</i> CP4	<i>Z. mobilis</i> CP404	<i>Z. mobilis</i> CP445
Caldo de cana	-	-	+	+	+
Caldo nutritivo	+	+	-	-	-
Meio mínimo + lactose	+	+	-	-	-
Meio mínimo + xilose	+	+	-	-	-
RM + 7% etanol	-	-	+	+	+
RM + Nx	-	-	+	+	+
RM + Ap + Km + Tc	+	+	-	+	+

Tabela 3 - Estabilidade das marcas de resistências dos plasmídios RP4 e R68.45 em transconjugantes de *Zymomonas mobilis*, durante sete transferências sucessivas em meio RM sem antibióticos.

Símbolos: Km = Kanamicina; Tc = Tetraciclina

Transconjugantes	Transferências	Colônias testadas	Percentagem de colônias resistentes	
			Km	Tc
CP404	1♀	15	100	96
	2♀	28	100	100
	3♀	45	100	100
	4♀	76	98	94
	5♀	40	100	70
	6♀	83	95	63
	7♀	69	100	45
CP445	1♀	32	100	100
	2♀	56	98	98
	3♀	82	100	93
	4♀	26	100	77
	5♀	51	98	63
	6♀	79	100	34
	7♀	74	98	46

A estabilidade dos plasmídios RP4 e R68.45 em *Z. mobilis* CP4 foi testada pelas marcas de resistência a kanamicina e tetraciclina (Tabela 3). Os resultados demonstraram que as marcas para resistência à kanamicina são praticamente estáveis após sete passagens sucessivas em meio sem antibióticos. No entanto, a marca para resistência à tetraciclina apresenta segregação elevada após 3 a 4 passagens sucessivas em meio não seletivo. Resultado de instabilidade da marca para resistência a tetraciclina já foi observada em *Z. mobilis* (15). Por outro lado, a literatura também registra resultados de estabilidade para resistência a kanamicina em transconjugantes de *Z. mobilis* contendo plasmídios R (13).

A cinética de transferência dos plasmídios RP4 e R68.45, em cruzamentos intraespecíficos de *Z. mobilis* está representada na Figura 1. A frequência de transferência do R68.45 foi sempre maior que a do RP4. As frequências máximas foram obtidas após 4h de cruzamentos e, com 6h de conjugação, já havia redução nas frequências. Skotnicki & col. (13) estudando a transferência do plasmídio PJB4J1 para *Z. mobilis*, em cruzamentos intergenéricos, também constataram as maiores frequências com 4h de conjugação.

A frequência máxima de transferência do plasmídio R68.45 para *Z. mobilis* CP4 foi em torno de 40 vezes menor que a obtida por Skotnicki & col. (13). Deve-se ressaltar que estes autores utilizaram a membrana "Millipore" ao passo que, no presente trabalho, foi feito o cruzamento em meio líquido. Sabe-se que o cruzamento em membrana favorece a conjugação pela maior estabilização dos pares conjugantes.

Os resultados dos experimentos visando a transferência de marcas cromossônicas em *Z. mobilis*, promovidas pelos plasmídios RP4 e R68.45 estão indicados na Tabela 4. Quando se utilizou o plasmídio RP4 às frequências de recombinação para as marcas his, cys e trp praticamente se igualaram às frequências de reversão para os tipos selvagens, mostrando que não houve recombinação. O plasmídio RP4 tem sido transferido com facilidade para diferentes gêneros bacterianos, mas a sua capacidade de mobilizar marcas cromossônicas, é baixa (10). A aplicação de ultra-violeta, raio X, etil metanossulfonato ou alaranjado de acridina pode favorecer a transferência de marcas cromossônicas por RP4 (6, 7).

Quando se utilizou o plasmídio R68.45 foram obtidos recombinantes para as marcas his, trp e cys, nas frequências de $8,2 \times 10^{-5}$, $9,8 \times 10^{-6}$ e $2,5 \times 10^{-6}$ recombinantes/doador, respectivamente (Tabela 4). Estas frequências foram 215, 70 e

Tabela 4 - Frequência de recombinação e de reversão espontânea em *Zymomonas mobilis*.

Símbolos: His⁻ = Auxotrofia para histidina; Cys⁻ = Auxotrofia para cisteína; Trp⁻ = Auxotrofia para triptofano; 1 = Número de recombinantes/doadora; 2 = Número de prototróficos/número total de célula

Células receptoras	Características fenotípicas	Frequência de recombinação ¹		Frequências de reversão espontânea ²
		Células doadoras CP404	CP445	
CP410	His ⁻	$1,9 \times 10^{-7}$	$8,2 \times 10^{-5}$	$3,8 \times 10^{-7}$
CP412	Cys ⁻	$2,1 \times 10^{-7}$	$2,5 \times 10^{-6}$	$2,0 \times 10^{-7}$
CP413	Trp ⁻	$1,1 \times 10^{-7}$	$9,8 \times 10^{-6}$	$1,4 \times 10^{-7}$

12,5 vezes maiores que as frequências de reversão para os respectivos tipos selvagens, indicando que R68.45 é um plasmídio também eficiente na mobilização de genes cromossômicos, em *Z. mobilis*. Esse plasmídio tem sido utilizado, com sucesso, para a transferência de marcas cromossômicas em vários gêneros bacterianos (3, 12, 13). Esta capacidade de mobilização cromossônica (Cma) apresentada pelo plasmídio R68.45 pode ser perdida sem que outras marcas do plasmídio sejam também perdidas. No entanto, a Cma pode ser estabilizada mantendo a célula com o R68.45 em meio contendo kanamicina (4).

A utilização de R68.45 para mobilizar genes cromossômicos em *Z. mobilis* foi testada com sucesso, pela primeira vez, por Skotnicki & col. (13), tendo sido transferida a marca para resistência a rifampicina com a frequência de 9×10^{-7} recombinantes/doador. Goodman & col. (8), em cruzamento semelhante obtiveram como resultados preliminares as transferências das marcas ade e trp nas frequências de 9×10^{-6} e 2×10^{-4} recombinantes/receptora, respectivamente.

Confirmada a eficiência do R68.45 em transferir marcas cromossômicas em *Z. mobilis*, deve-se, a seguir, iniciar o mapeamento desta bactéria. Para tal, mutantes com vários marcadores genéticos devem ser produzidos e através de cruzamentos interrompidos ou de herança de marcas não selecionadas, determinar a ordem e a distância dos genes no cromossomo de *Z. mobilis*.

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Processo nº 402782-83.

Referências Bibliográficas

1. Belaich, J.P.A.; Belaich, A & Simonpietri, P. - Uncoupling in bacterial growth: effect of pantothenate starvation on growth of *Zymomonas mobilis*. *J. Gen. Microbiol.*, 70:179-185, 1972.
2. Browne, G.M.; Skotnicki, M.L.; Goodman, A.E. & Rogers, P.L. - Transformation of *Zymomonas mobilis* by a hybrid plasmid. *Plasmid*, 12:211-214, 1984.
3. Chatterjee, A.K. - Acceptance by *Erwinia* spp. of R plasmid R68.45 and its ability to mobilize the chromosome of *Erwinia chrysanthem*. *J. Bacteriol.*, 142:111-119, 1980.
4. Currier, T.C. & Morgan, M.K. - Direct DNA repeat in plasmid R68.45 is associated with deletion formation and concomitant loss of chromosome mobilization ability. *J. Bacteriol.*, 150:251-259, 1982.
5. Dally, E.L.; Stokes, H.W. & Eveleigh, D.E. - A genetic comparison of strains of *Zymomonas mobilis* by analysis of plasmid DNA. *Biotechnol. Lett.*, 4:91-96, 1982.

6. Evenchik, Z.; Stacey, K.A. & Hayes, W. - Ultraviolet induction of chromosome transfer by autonomous sex factors in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.*, 56:1-14, 1969.
7. Falkow, S.; Wohlhietter, J.A.; Citairella, R.V. & Baron, L.S. - Transfer of episomic elements to *Proteus*. *J. Bacteriol.*, 87:209-219, 1964.
8. Goodman, A.E.; Rogers, P.L. & Skotnicki, M.L. - Minimal medium for isolation of auxotrophic *Zymomonas* mutants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44:496-498, 1982.
9. Holloway, B.W.; Krishnapillai, V. & Morgan, A.F. - Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiol. Rev.*, 43:73-102, 1979.
10. Jacob, A.E.; Creswell, J.M.; Hedges, R.W.; Coetzela, J.N. & Beringer, J.E. - Properties of plasmids constructed by the in vitro insertion of DNA from *Rhizobium leguminosarum* or *Proteus mirabilis* into RP4. *Molec. Gen. Genet.*, 147:315-323, 1976.
11. Lyness, E.W. & Doelle, H.W. - Ethanol production from cane juice by *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.*, 3:257-260, 1981.
12. Siström, W.R. - Transfer of chromosomal genes mediated by plasmid R68.45 in *Rhodopseudomonas sphaerooides*. *J. Bacteriol.*, 133:526-532, 1977.
13. Skotnicki, M.L.; Tribe, D.E. & Rogers, P.L. - R-plasmid transfer in *Zymomonas mobilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40:7-12, 1980.
14. Stokes, H.W.; Dally, E.L.; Spaniel, D.T.; Williams, R.L.; Montenecourt, B.S. & Eveleigh, D.E. - *Zymomonas*: the phantom ethanol producer. *Biosources Digest*, 3:124-132, 1981.
15. Stokes, H.W.; Dally, E.L.; Williams, R.L.; Montenecourt, B.S. & Eveleigh, D.E. - Ethanol from biomass: development of a *Zymomonas* genetic system: In: - Keller, O.L. & Wymer, R.G., eds. - *Chemistry in energy production*. Oak Ridge, National Lab., p.115-121, 1982.
16. Stokes, H.W.; Dally, E.L.; Yablonsky, M.D. & Eveleigh, D.E. - Comparison of plasmids in strains of *Zymomonas mobilis*. *Plasmid*, 9:138-146, 1983.
17. Swings, J. & De Ley, J. - The biology of *Zymomonas*. *Bacteriol. Rev.*, 41:1-46, 1977.
18. Tonomura, K.; Kurose, N.; Konishi, S.; Kawasaki, H. - Occurrence of plasmids in *Zymomonas mobilis*. *Agric. Biol. Chem.*, 46:2851-2853, 1982.
19. Walia, S.K.; Carey, V.C.; All III, B.P. & Ingram, L.O. - Self-transmissible plasmids in *Zymomonas mobilis* carrying antibiotic resistance. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47:198-200, 1984.

TRANSFORMAÇÃO COM GENES NIF EM AZOTOBACTER PASPALI

Gislene Garcia Franco do Nascimento
 & Flávio Cesar Almeida Tavares

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

Resumo

Foi feita a localização de genes nif em uma amostra da bactéria fixadora assimbiótica de N_2 , *Azotobacter paspalii*, não portadora de plasmídio. Foram isolados mutantes auxotróficos e nif⁻, a partir da indução com luz ultra-violeta e tratamento com ácido nitroso. A localização de algumas mutações nif foi possível, através da análise de complementação após a transformação de mutantes nif⁻ em todas as combinações possíveis, verificando-se que os genes estavam ligados na maioria dos casos.

Summary

Transformation with nif genes in Azotobacter paspalii

A natural isolate of *Azotobacter paspalii*, a non-symbiotic N_2 fixer strain lacking plasmids, was genetically studied with the objective of locating the nif genes. Auxotrophic and non-fixing mutants (nif⁻) were isolated after treatment by UV light and nitrous acid. Complementation analysis after genetic transformation of the different nif⁻ mutants allowed the detection of linkage among the markers under analysis.

Introdução

Os primeiros estudos genéticos e bioquímicos da fixação de nitrogênio atmosférico foram realizados com *Azotobacter vinelandii* e *A. chroococcum* (10, 23, 25). No entanto, vários fatores como perda de mutantes ou instabilidade associados com técnicas impróprias, resultaram em um lento avanço no estudo genético destas bactérias.

O primeiro processo de transformação em *Azotobacter*, foi descrito por Sen & Sen (21) entre *A. vinelandii* e *A. chroococcum*, com relação à produção de pigmento. A partir disso, foram desenvolvidas melhores condições para realização deste processo em *A. vinelandii*, utilizando-se marcas genéticas mais eficazes. Assim, foi conseguida a transformação para prototrofia de inúmeras mutações auxotróficas (uracila, adenina, hipoxantina) nif⁻ (incapacidade de fixar N_2) e rifampicina (15, 16, 17). Embora não tenha sido bem definida a posição dos genes para fixação de N_2 (nif) nesta bactéria, há indicações de que não estejam todos num único grupo de ligação (2).

Foi também realizada a transformação intergenérica de *Azotobacter nif⁻* com DNA de *Rhizobium*, fixadora simbiótica de N_2 . Neste caso, 10% dos transformantes nif⁺ continham inclusive o sítio de ligação à lectina, que especifica a relação entre *Rhizobium* e a planta hospedeira (13).

O estudo em outras espécies de *Azotobacter*, tais como *A. beijerinckii* e *A. paspalii*, ainda é inicial. Alguns trabalhos sobre *A. paspalii* são encontrados na literatura, principalmente considerando a associação desta com a rizosfera de *Paspalum notatum* (7, 8, 9, 12), mas nenhuma menção foi feita a respeito da genética

da fixação de N₂ nesta bactéria.

Em vista destes fatos, o objetivo deste trabalho foi localizar os genes nif, em uma amostra de *A. paspalii*, procurando-se ainda uma similaridade com outras espécies do mesmo gênero, bem estudadas geneticamente.

Material e Métodos

A linhagem de *A. paspalii* foi isolada de solo latossol roxo (14) e classificada de acordo com os critérios citados por Becking (1), Dobereiner (7) e Breed & col. (5). A linhagem bacteriana foi submetida à eletroforese em gel de agarose e não foi visualizada a presença de plasmídio por nenhum dos métodos utilizados (11, 20).

Para obtenção de mutantes nif⁻, uma suspensão de células foi centrifugada, o sobrenadante desprezado e a seguir, irradiada com luz ultra-violeta por 2 minutos ou tratada com ácido nitroso (0,5ml da suspensão de células em 0,33ml sol. nitrito de sódio 0,5M e 9,17ml de sol. acetato pH 4,4) por 8 minutos. Estes tempos foram pré-determinados em experimentos anteriores de curvas de sobrevivência aos agentes mutagênicos citados. Após os tratamentos, aliquotas da suspensão de células diluídas, foram semeadas em placas contendo meio LG (1) suprido com fonte de nitrogênio por 48 horas a 30°C. As colônias que se desenvolveram foram replicadas para placas com o mesmo meio, com e sem fontes de nitrogênio. Os mutantes nif⁻ obtidos desta forma, foram submetidos a auxanografia, a fim de se observar a ocorrência de possíveis mutantes auxotróficos, sendo inoculados em meios complementados com aminoácidos, vitaminas ou ácidos nucleicos.

Para a extração do DNA de células mutantes nif⁻ e da linhagem original as células foram crescidas em meio LG e centrifugadas por 15 minutos a ~ 12000g. Em seguida, foram suspensas em 5ml de tris-HCl 0,05M (pH 8,0), centrifugadas novamente, sendo ressuspensas em 8ml de sacarose 25% (em tris-HCl 0,05M) contendo lisozima (10mg/ml) e mais 2ml de EDTA 0,5M pH 8,2 (em tris-HCl 0,05M). Fez-se uma incubação por 10 minutos a 25°C e acrescentou-se 1ml de SDS 10%, deixando-se durante 30 minutos a 60°C. A seguir, foi adicionada uma solução clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), em volume igual ao volume total do tubo, agitando-se lentamente até a formação de emulsão homogênea. Centrifugou-se a ~ 14000g por 20 minutos e transferiu-se a fase aquosa superior para outro tubo, onde se adicionou 2 volumes de etanol gelado (~ -5°C). Após a centrifugação, fez-se a secagem a vácuo do álcool remanescente e adicionou-se 1ml de tampão SSC; seguindo-se à dissolução dos ácidos nucleicos, foi colocada solução de RNase, até atingir a concentração de 50µg/ml. A seguir, foram repetidos os passos descritos, após a colocação da solução clorofórmio-isoamílico, finalizando-se com a dissolução do DNA em tampão SSC (14).

Nos experimentos de transformação foram utilizados os mutantes nif⁻, como células receptoras e o DNA doador da linhagem original e também dos mutantes nif⁻. No primeiro processo de transformação, os mutantes nif⁻ foram crescidos em meio para indução de competência (OFe + N) por 24 horas a 30°C (17). Cerca de 50ml de células competentes (2×10^7 cels/ml) foram colocadas em tampão Burk (22) e acrescentou-se 2,0µg de DNA da linhagem original de *A. paspalii*. Após 2 horas de incubação a 30°C a mistura foi semeada no meio Burk com e sem adição de nitrogênio, incubando-se por 72 horas a 30°C (22). No segundo processo de transformação, os mutantes nif⁻¹ e nif⁻⁵ foram crescidos nas mesmas condições anteriores. Para cada cultura nif⁻, foram feitos ensaios envolvendo sua transformação com o DNA isolado de cada um dos mutantes nif⁻.

A frequência de transformação foi calculada em função do número de células receptoras utilizadas. O DNA foi ensaiado para se verificar a esterilidade em meio Burk e cada uma das linhagens mutantes nif⁻ também foi ensaiada a fim de se observar a possível reversão.

Resultados e Discussão

Foram selecionados 6 e 10 mutantes nif⁻, respectivamente, após os tratamentos com luz ultra-violeta e ácido nitroso. Do total, 2 eram mutantes auxotróficos para

vitamina B1 e 1 para timina, o que foi revelado pela auxanografia; 8 sofreram reversão para prototrofia e apenas 5 mantiveram sua condição *nif*⁻, ou seja, incapacidade de fixar nitrogênio. A frequência de aparecimento de mutantes *nif*⁻ foi baixa, principalmente considerando a necessidade dos experimentos posteriores de transformação a que se destinavam.

Houve dificuldades no isolamento de maior número de mutantes nesta bactéria, o mesmo ocorrendo para vários autores em outras espécies de *Azotobacter*. Sadoff & col. (19) justificam isto, como sendo devido ao fato de *Azotobacter* ter grande quantidade de DNA (dez vezes mais do que *E. coli*), inclusive sugerindo a existência de 40 cópias de cromossomos por célula. No entanto, Terzaghi (24) considera que a maioria destes cromossomos não devem ser biologicamente funcionais. De acordo com Page & Sadoff (15) a dificuldade de obtenção de mutantes em *A. vinelandii* se deve à existência de um sistema de reparo pós-mutacional eficiente. Neste trabalho, as dificuldades encontradas podem ser assim justificadas, além de se considerar a difícil manutenção dos mutantes obtidos, pois após algumas repicagens havia reversão do caráter.

Para melhor estudo dos mutantes *nif*⁻ haveria necessidade de testes mais precisos, como sugerido por Brill (6), que incluem ressonância paramagnética ou reação com antissoros específicos, para verificar se a sua deficiência se relacionou com os componentes I, II ou I e II da nitrogenase.

Na Tabela 1 estão os resultados da transformação entre mutantes *nif*⁻ e DNA da linhagem original de *A. paspali*. A seleção dos transformantes foi em função da recuperação da capacidade de fixar N₂ (*nif*⁺) por parte dos mutantes *nif*⁻, o que pode ser verificado através do crescimento de colônias em meio isento de nitrogênio. Para cada experimento foi feito simultaneamente um controle dos mutantes *nif*⁻, a fim de se verificar a possível ocorrência de reversão. Nota-se que a frequência de transformação foi relativamente alta (média de $2,7 \times 10^{-3}\%$) entre os mutantes *nif*⁻, podendo-se inferir que estes deveriam apresentar mutações simples, facilmente corrigidas pela incorporação de DNA exógeno. Experimentos deste tipo também foram realizados por outros autores em *A. vinelandii* e *A. chroococcum* (15, 16, 17, 21), porém nesses trabalhos, o DNA de células doadoras foi obtido de lisados celulares, sem que tivesse sido feita qualquer purificação, gerando inúmeras controvérsias nos resultados.

Os mutantes *nif*⁻ foram, posteriormente, transformados com DNA extraído destes mesmos mutantes, em todas as combinações possíveis. As porcentagens de recombinação das transformações estão na Tabela 2 e a Figura 1 mostra a ordem das mutações afetando a fixação de nitrogênio na bactéria. O aparecimento de células *nif*⁺ indicou a recombinação do material genético correspondente às mutações das duas linhagens. Assim, recombinantes *nif*⁺ só puderam ocorrer quando a mutação do doador não foi a mesma do genoma receptor.

Como é sabido, a distância entre dois genes é diretamente proporcional à frequência de recombinação, ou seja, valores de recombinação altos, em determinados cruzamentos indicam que a distância entre os genes é relativamente grande (2). Pode-se notar pelos dados, que os mutantes *nif*⁻¹ e *nif*⁻⁵ provavelmente apresentam o mesmo tipo de mutação, pois não se detectou transformantes entre eles; mutantes *nif*⁻² e *nif*⁻³ devem estar bem próximos, pois apresentaram uma frequência de recombinação muito baixa. Foram obtidas diferentes frequências de transformação entre as linhagens mutantes, isto devido, em parte ao tamanho do segmento de DNA envolvido. No entanto, em qualquer frequência, esta variação entre as linhagens indicou que as mutações não foram idênticas, pelo menos na maioria dos casos.

Nota-se que a frequência de transformantes

Tabela 1 - Recombinantes *nif*⁺ de transformação entre mutantes *nif*⁻ e DNA da linhagem original.

Símbolos: * = O número de células utilizadas foi de 10^7 - 10^8 cels/ml

Linhagens receptoras*	% Transformantes <i>nif</i> ⁺
<i>nif</i> ⁻¹	$1,7 \times 10^{-2}$
<i>nif</i> ⁻²	$8,5 \times 10^{-3}$
<i>nif</i> ⁻³	$4,0 \times 10^{-2}$
<i>nif</i> ⁻⁴	$1,1 \times 10^{-3}$
<i>nif</i> ⁻⁵	$3,2 \times 10^{-3}$

Tabela 2 - Transformantes nif^+ obtidos de cruzamentos entre mutantes nif^- e DNA destas mesmas linhagens.

Símbolos: * = O número de células receptoras utilizadas foi de 10^7 - 10^8 células/ml

Linhagens receptoras*	Linhagens doadoras				
	nif_1^-	nif_2^-	nif_3^-	nif_4^-	nif_5^-
nif_1^-	0	$5,4 \times 10^{-4}$	$7,2 \times 10^{-3}$	$3,5 \times 10^{-3}$	$8,7 \times 10^{-7}$
nif_2^-	$1,3 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-7}$	$4,5 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-3}$	$8,1 \times 10^{-3}$
nif_3^-	$6,7 \times 10^{-3}$	$5,6 \times 10^{-5}$	0	$2,8 \times 10^{-3}$	$5,2 \times 10^{-3}$
nif_4^-	$7,0 \times 10^{-3}$	$2,6 \times 10^{-3}$	$3,0 \times 10^{-7}$	$3,2 \times 10^{-7}$	$3,1 \times 10^{-3}$
nif_5^-	0	$1,5 \times 10^{-4}$	$7,3 \times 10^{-3}$	$8,0 \times 10^{-3}$	$3,8 \times 10^{-7}$

nif^+ obtidos com DNA mutante (Tabela 2) foi consideravelmente menor do que com o DNA da linhagem selvagem (Tabela 1). A partir dos valores de recombinação, pode-se estabelecer a posição das mutações nif , envolvendo *A. paspali* (Figura 1). Alguns valores discrepantes são observados entre os cruzamentos reciprocos, decorrentes da própria metodologia empregada, mas apesar disto, os dados sugerem que pelo menos três mutações diferentes estão relacionadas (nif^2 , 3 e 5) e que nif^4 deve estar distante deste grupo.

Para melhor conhecimento a respeito da localização dos genes nif nesta bactéria, haveria necessidade de se trabalhar com maior número de mutantes, cuja obtenção não foi possível. Bishop & Brill (2), em experimento semelhante com *A. vinelandii*, não conseguiram estabelecer posições bem definidas para as mutações nif , apesar de utilizarem maior número de mutantes. Entretanto, deve-se ressaltar que há certas dificuldades na utilização do método de transformação para se fazer o mapeamento, pois o pedaço de DNA envolvido é pequeno e, assim, não é tão simples mostrar que dois genes são ligados, mesmo quando grande número de mutações são analisadas.

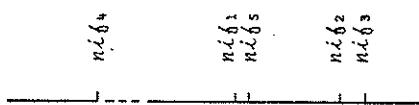
Apesar de *A. vinelandii* ser bem estudada, muitos detalhes necessitam ser conhecidos a respeito da posição dos genes nif , em seu genoma, tendo sido demonstrada (3, 4) a existência de um sistema alternativo de fixação de N_2 nesta bactéria. Além disto, em trabalhos mais recentes (18) foi verificado que plasmídios contendo genes nif de *Klebsiella pneumoniae* hibridizaram com cinco diferentes fragmentos de DNA de *A. vinelandii*. Uma análise destes resultados, leva a concluir que há mais do que uma região do cromossoma desta bactéria que contém homologia com *Klebsiella*. Provavelmente estas várias regiões de homologia correspondem a dois sistemas diferentes de fixação de N_2 .

Como já salientado, apesar de não estar bem definida a posição dos genes nif em *A. vinelandii*, os dados sugerem que estes não estão num único grupo de ligação. A partir dos resultados do presente trabalho, nota-se que é possível a existência de um sistema diferente de fixação de N_2 da linhagem de *A. paspali* em estudo, pois, além da espécie não ter sido anteriormente estudada geneticamente, deve-se considerar que esta foi isolada diretamente do solo, podendo apresentar características próprias, ao contrário de outras culturas, pertencentes a coleções e já bem caracterizadas.

Referências Bibliográficas

1. Becking, J.H. - Species differences in molybdenum and vanadium requirements and combined nitrogen utilization by Azotobacteriaceae. Plant and Soil, 16:171-201, 1962.

Figura 1 - Ordem das mutações afetando a fixação de N_2 . As distâncias entre as mutações não são dadas em escalas



2. Bishop, P.E. & Brill, W.J. - Genetic analysis of *Azotobacter vinelandii* mutants strains unable to fix nitrogen. *J. Bacteriol.*, 130:954-956, 1977.
3. Bishop, P.E.; Jarlenski, D.M.L. & Hetherington, D.R. - Evidence for an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 77:7342-7346, 1980.
4. Bishop, P.E.; Jarlenski, D.M.L. & Hetherington, D.R. - Expression of an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, 150:1244-1251, 1982.
5. Breed, R.S.; Murray, E.G.D. & Smith, N. - Bergey's manual of determinative bacteriology. Baltimore, William of Wilkins, 1974.
6. Brill, W.J. - Control of nitrogenase synthesis in *Azotobacter vinelandii*. In: Nutman, P.S., ed. - Symbiotic nitrogen fixation in plants. Cambridge University Press, p.39-47, 1976.
7. Dobereiner, J. - *Azotobacter paspali* sp. n., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. *Pesq. Agrop. Bras.*, 11:357-365, 1966.
8. Dobereiner, J. - Fixation of atmospheric nitrogen in the rhizosphere of tropical gramine. *Rev. Microbiol. (São Paulo)*, 1:461-481, 1973.
9. Dobereiner, J.; Day, J.M. & Dart, P.J. - Nitrogenase activity and oxygen sensitivity of the *Paspalum notatum* - *Azotobacter paspali* association. *J. Gen. Microbiol.*, 71:103-116, 1972.
10. Green, M.; Alexander, M. & Wilson, P.W. - Mutants of the *Azotobacter* unable to use N₂. *J. Bacteriol.*, 66:623-624, 1953.
11. Kado, C.I. & Liu, S.T. - Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.*, 145:1365-1373, 1981.
12. Machado, V.C. & Dobereiner, J. - Estudos complementares sobre a fisiologia de *Azotobacter paspali* e sua dependência da planta (*Paspalum notatum*). *Pesq. Agrop. Bras.*, 4:53-58, 1969.
13. Maier, R.J.; Bishop, P.E. & Brill, W.J. - Transfer from *Rhizobium japonicum* to *Azotobacter vinelandii* of genes required for nodulation. *J. Bacteriol.*, 134:1199-1201, 1978.
14. Nascimento, G.G.F. - Aspectos genéticos da fixação assimbiótica de nitrogênio em bactérias do solo. Piracicaba, ESALQ/USP, 1985. (Tese de Doutoramento).
15. Page, W.J. & Sadoff, H.L. - Physiological factors affecting transformation of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, 125:1080-1087, 1976a.
16. Page, W.J. & Sadoff, H.L. - Control of transformation competence in *Azotobacter vinelandii* by nitrogen catabolite derepression. *J. Bacteriol.*, 125:1088-1095, 1976b.
17. Page, W.J. & von Tigerstrom, M. - Optimal conditions for transformation of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, 139:1058-1061, 1979.
18. Ruvkun, G.B. & Ausubel, F.M. - Interspecies homology of nitrogenase genes. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 77:191-195, 1980.
19. Sadoff, H.L.; Shime, B. & Ellis, S. - Characterization of *Azotobacter vinelandii* deoxyribonucleic acid and folded chromosomes. *J. Bacteriol.*, 138:871-877, 1979.
20. Santos, D.S. & Affonso, M.H.T. - 1º Curso avançado sobre biologia molecular de plasmídios bacterianos: guia de trabalhos práticos. São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1982.
21. Sen, M. & Sen, S.P. - Interspecific transformation in *Azotobacter*. *J. Gen. Microbiol.*, 41:1-6, 1965.
22. Strandberg, G.W. & Wilson, P.W. - Molecular H₂ and the N₂ function of *Azotobacter*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 58:1404-1409, 1967.
23. Stumbo, C.R. & Gainey, P.L. - An apparent induces loss of nitrogen-fixing ability in *Azotobacter*. *J. Agric. Res.*, 57:217-227, 1938.
24. Terzaghi, B.E. - Ultraviolet sensitivity and mutagenesis of *Azotobacter*. *J. Gen. Microbiol.*, 118:271-273, 1980.
25. Wiss, O. & Wiss, B.M. - Mutants of *Azotobacter* that do not fix nitrogen. *J. Bacteriol.*, 59:287-291, 1950.

ENERGIA DE DESATIVADAÇÃO DE AMILOGLICOSIDASE EM SOLUÇÃO DE AMIDO

Euclides Honório de Araújo

Deptº de Engenharia Química da UFU
Caixa Postal 593
38400 Uberlândia MG, Brasil

& Willibaldo Schmidell Netto

Deptº de Engenharia Química da EPUSP
Caixa Postal 8174
01051 São Paulo SP, Brasil

Resumo

Foram determinadas as velocidades de inativação térmica da enzima amiloglicosidase, Amilo P-250 da Pfizer, para uso industrial, acompanhando-se a diminuição da atividade enzimática situada na faixa de 25U/l, em solução de amido a 40g/l, variando-se a temperatura de reação de 55°C a 70°C. Em seguida calculou-se a energia de desativação (Ea) da referida enzima utilizando-se a equação de Arrhenius, obtendo-se um valor de Ea igual a 57,31kcal/mol.

Summary

Deactivation energy for glucoamylase on soluble starch

Thermal inactivation rates of glucoamylase (Pfizer commercial enzyme) on soluble starch Merck, were determined by measuring the enzymatic activity placed in the range of 25U/l, starch solution of 40g/l, changing the reaction temperature from 55°C to 70°C. The deactivation energy (Ea) was then calculated for the same enzyme, from the Arrhenius equation, obtaining the value of 57,31kcal/mol for Ea.

Introdução

A enzima amiloglicosidase é de importância fundamental na etapa de sacarificação de materiais amiláceos, para produção de glicose e consequente aproveitamento para fermentação alcoólica.

O estudo do comportamento desta enzima em termos da sua atividade em função do pH e da temperatura em meio contendo material amiláceo é de grande interesse, principalmente no estabelecimento de uma cinética de hidrólise.

Neste trabalho, é relatado o comportamento da amiloglicosidase em termos da sua perda de atividade em função da temperatura, em meio contendo amido solúvel, calculando também a energia de desativação desta enzima.

Material e Métodos

1. Material utilizado - a. Enzima - Amiloglicosidase para uso industrial da Pfizer (3), Amilo P-250, com uma atividade enzimática de 295250U/l (1).

Uma unidade de atividade enzimática (U) é a quantidade de enzima que produz uma grama de glicose por hora, numa solução de amido a 4% (P/V) e mantendo-se fixos o

pH no valor de 4,2 e a temperatura em 60°C(1). b. Amido - Amido solúvel da marca Merck, pró-análise na concentração de 40g/l.

2. **Equipamento** - Utilizou-se, como aparato para conter um volume de reação de 500ml, um Erlenmeyer de 2l, no qual se adaptou um agitador de marca Sp. Pr. Motoruch, Cracovia - Polônia, modelo MSR-1, tendo uma pá de vidro para agitação propriamente dita.

O Erlenmeyer era mantido num banho termostatizado, marca Fanem, modelo 112-2, sendo a solução mantida no banho, previamente por 15 minutos para se estabelecer o equilíbrio térmico.

3. **Procedimento experimental** - 1ml da enzima previamente diluída era colocado no volume de solução de amido de 500ml, quando então iniciava-se o ensaio, marcando-se o tempo zero e retirando-se duas amostras: a primeira, de 3ml, que era colocada num tubo de ensaio para pronta inativação da enzima por fervura, para posterior análise de açúcares redutores medidos como glicose, e a segunda, de 1ml, que era colocada no balão volumétrico de 50ml, para dosagem de atividade enzimática conforme descrito no item 4.

As amostras foram retiradas de 15 em 15 minutos, até a segunda hora; de 30 em 30 minutos até a quinta hora e, finalmente, de hora em hora, até o final do ensaio.

4. **Análises efetuadas - a. Determinação da glicose** - As medidas de concentração de glicose foram efetuadas no equipamento Auto-Analyser II da Technicon Instruments Corporation, pelo emprego da rotina "Clinical Method", que utiliza, como reagente principal, a enzima hexoquinase (5).

A calibração do equipamento foi realizada com soluções de glicose, nas concentrações em gramas por litro, de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0. b. **Atividade enzimática** - O método de determinação da atividade enzimática previa a preparação de uma solução de amido solúvel a 4% (P/V), tamponada com tampão acético pH-4,2. Para se efetuar as medidas de atividade da enzima amiloglicosidase, colocava-se, num balão volumétrico de 50ml, 25ml da solução de amido supracitada. Este balão era levado para um termostato mantido a 60°C, permanecendo a esta temperatura durante 15 minutos, a fim de atingir aquela temperatura.

Em seguida, colocava-se 1ml da amostra retirada e marcava-se um tempo de 60 minutos. Decorridos os 60 minutos a 60°C, procedia-se uma inativação térmica da enzima, através do aquecimento do conteúdo do balão volumétrico em banho fervente, por 5 minutos. Após isto, resfriava-se o balão em água corrente, completando-se o volume para 50ml e dosando-se o teor de glicose pelo método descrito em 4.a.

O cálculo da atividade enzimática era efetuado considerando-se a concentração de glicose obtida no balão de 50ml, menos a quantidade de glicose que era introduzida no mesmo balão.

Desta maneira a expressão que fornece a atividade enzimática em determinado instante do ensaio é a seguinte: $A.E. = 50 G.d - A.R_i \cdot 1$ [1], onde:

$A.E.$ = Atividade enzimática (U/l); 50 = Volume do balão; (ml); G = Concentração da glicose presente no balão em (mg/ml); d = Diluição efetuada na amostra.

$A.R_i$ = Concentração de glicose presente na amostra em (mg/ml); 1 = Volume de amostra introduzida (.ml)

Resultados

Foram realizados sete ensaios nas temperaturas de 55°; 58°; 60°; 63°; 67° e 70° graus Celcius.

Na Tabela 1 são apresentados os resultados para os sete ensaios, onde aparecem os resultados da glicose produzida em g/l, bem como a atividade calculada em U/l ao longo do tempo.

Na Figura 1 são apresentadas as curvas de glicose produzida e atividade

enzimática para o ensaio nº 4, conduzido a 63°C. Curvas idênticas são também obtidas para os demais ensaios.

Para o cálculo das velocidades de inativação dos ensaios realizados, considerou-se a atividade enzimática inicial de cada ensaio (A_0) e exprimiu-se as atividades como frações da atividade inicial (A/A_0). Em seguida, correlacionou-se o logaritmo natural das frações de atividades em função do tempo de ensaio, resultando na relação 2: $\ln(A/A_0) = -kt + B$ [2], onde:

A/A₀ = Relação entre atividade num dado instante e a atividade inicial do ensaio; k = Velocidade de inativação (h^{-1}); t = Tempo em horas; B = Constante.

Na Tabela 2 são apresentados os resultados obtidos para os ensaios, onde aparecem os valores de k , B , índice de correlação, para a equação 2, aplicada para cada um dos ensaios, além dos valores de $\ln k$ e $1/T$ ($^{\circ}K^{-1}$) que serão utilizados em seguida.

Para o cálculo da energia de desativação da enzima amiloglicosidase em solução, com amido Merck, utilizou-se a equação de Arrhenius que estabelece a relação entre velocidade de inativação, com a temperatura em graus absolutos e com a energia de desativação, dada pela expressão 3:

$k = F \cdot e^{-EA/RT}$ [3], onde:

k = Velocidade específica de inativação (h^{-1}): F = Fator de frequência.

E_a = Energia de desativação (kcal/mol); $R = 1,987 \times 10^{-3}$ kcal/ok mol; T = Temperatura (ok).

A partir dos dados contidos na Tabela 2, construiu-se a Figura 2, que apresenta os valores dos logarítmos da velocidade de inativação em função do inverso da temperatura absoluta.

Através de uma regressão linear aplicada aos pontos colocados na Figura 2, chega-se a equação da reta dada pela expressão 4, com um índice de correlação $r = 0,990$: $\ln k = 28843,39 \cdot (1/T) + 85,21$ [4], utilizando-se a equação 4 pode-se obter o valor da energia de desativação $E_a = 57,31 \text{ kcal/mol}$, que se encontra dentro dos valores previstos na literatura [3].

Tabela 1 - Resultados da glicose produzida em (g/l) e atividades enzimáticas para os ensaios de 1 a 7 em função do tempo de ensaio.

Símbolos: C.G. = Concentração de glicose em (g/l); A.E. = Atividade enzimática em (U/l)

Discussão

A enzima amiloglicosidase em solução, na presença do amido Merck, é severamente inativada pela temperatura, para valores acima de 55°C.

Deve ser ainda ressaltado que para a hidrólise, conduzida a 55°C, valor próximo da temperatura ótima de atuação da enzima (6), obteve-se a menor inativação porcentual, além de se ter as maiores flutuações nos valores de atividade enzimática ao longo do ensaio, o que de certa forma dificulta uma determinação mais precisa da velocidade de inativação.

Contrariamente ao que ocorre com a enzima amiloglicosidase (Pfizer), atuando em solução com amido Merck, apresentamos (Figura 3), o resultado de uma hidrólise conduzida em fermentador (1) a 55°C, na presença de farinha de mandioca, na concentração de amido de 150g/l e com uma atividade aproximada da mesma enzima de 60U/l, onde se pode notar que a enzima conserva sua atividade pelo período de 30 horas.

A inexistência de inativação térmica, para processos conduzidos com materiais amiláceos (1), é de certa forma surpreendente, e não se tem uma explicação fisicamente razoável para este fato, a não ser a diferença de matéria-prima, que fica em contato com a enzima, num caso, amido dextrinizado e no outro amido solúvel.

Deve-se portanto tomar cuidado ao se generalizar resultados obtidos com amido solúvel, na presença de enzima amiloglicosidase e extrapolar os mesmos para materiais amiláceos naturais como por exemplo mandioca e sorgo sacarino.

Figura 1 - Glicose produzida em g/l e atividade enzimática para o ensaio 4 conduzido a 63°C, em função do tempo de hidrólise. Atividade enzimática inicial 25,20U/l

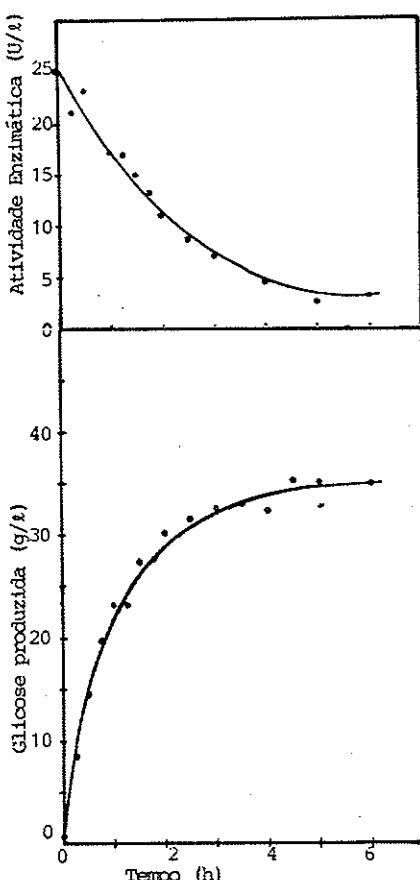


Tabela 2 - Resultados das velocidades de inativação (k) da enzima amiloglicosidase (Pfizer) em função da temperatura; $\ln k$ e inverso da temperatura absoluta

Ensaio	Temperatura °C	Temperatura °K	k (h^{-1})	B	índice de correla- ção (r)		$\ln k$	$1/T$ $^{\circ}K^{-1} \times 10^4$
					correla- ção (r)	$\ln k$		
1	55	328	0,0739	-0,1085	0,90	-2,605	30,49	
2	58	331	0,1263	-0,0630	0,97	-2,069	30,21	
3	60	333	0,3040	-0,0447	0,91	-1,191	30,03	
4	63	336	0,4064	0,0206	0,98	-0,900	29,76	
5	65	338	1,0093	0,2910	0,96	0,009	29,59	
6	67	340	1,1649	0,2203	0,98	0,153	29,41	
7	70	343	3,7754	0,1991	0,993	1,329	29,15	

Figura 2 - Logaritmo neperiano da velocidade de inativação em função do inverso da temperatura absoluta para os ensaios de n°s 1 a 7

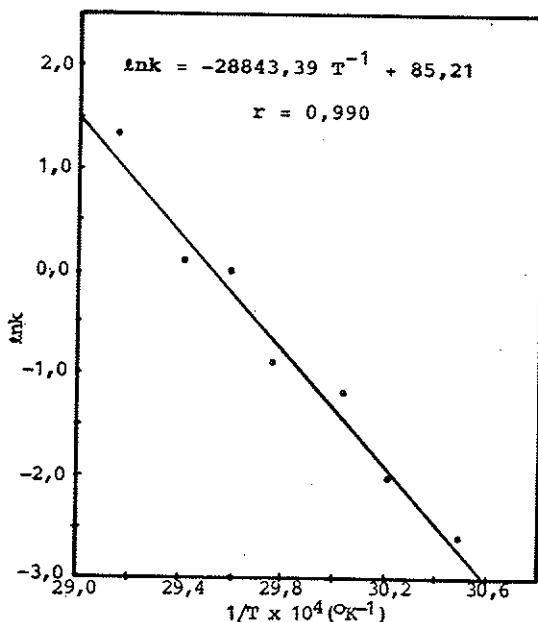
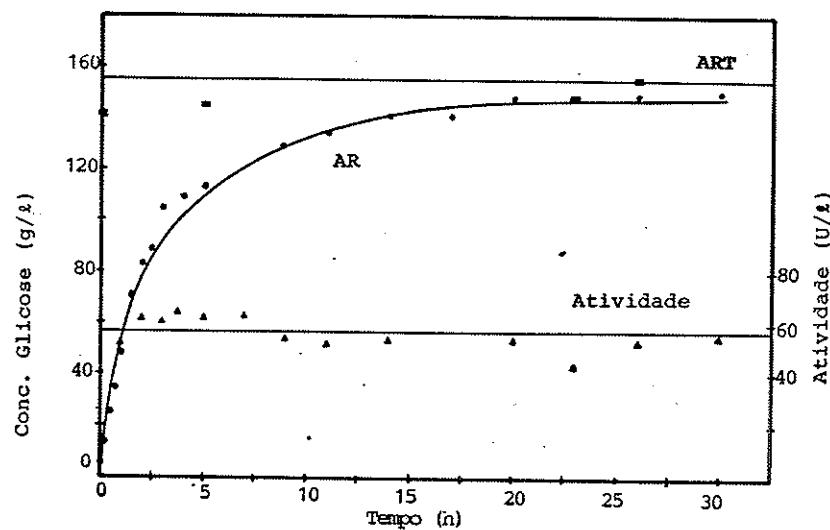


Figura 3 - Resultados de açúcares redutores e açúcares redutores totais, ambos expressos como glicose; atividade enzimática. Hidrólise com amido de mandioca (150g/l); temperatura 55°C; atividade inicial da amiloglicosidase 60U/l



Referências Bibliográficas

1. Araújo, E.H. - Influência de fatores na velocidade de hidrólise de materiais amiláceos para a produção de etanol. São Paulo, EPUSP, 1985. (Tese de Doutorado).
2. Browne, C.A. & Lerban, N.F. - Physical and chemical methods of sugar analysis. 3.ed. New York, John Wiley & Sons, 1948.
3. Pfizer Divisão Química - Boletim Técnico BT. 002/78. Guarulhos, Ago., 1978.
4. Pitcher, W.H. - Design and operation of immobilized enzyme reactors. In: - Messing, R.A., ed. - Immobilized enzymes for industrial reactors. New York, Academic Press, p.174, 1974.
5. Technicon Auto-Analyser II - Industrial method n°285, 73p. New York Tarry Town, Technicon Indl. Systems, 1973.
6. Zanin, G.M. & Moraes, F.F. - Amiloglicosidase imobilizada em suportes inorgânicos: preparação e estabilidade operacional em microreator de leito fluidizado. Rev. Brasileira Engenharia Química, 7:47-58, 1983.

AUMENTO DO RENDIMENTO DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA PELA ADIÇÃO DE ÓLEO DE SOJA

Flávio Alterthum

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

Maria Regina de Melo Cruz

Instituto de Pesquisas Tecnológicas
do Estado de São Paulo - IPT
Caixa Postal 7141
01051 São Paulo SP, Brasil

Resumo

Na fermentação alcoólica, em escala industrial, o oxigênio dissolvido no meio é consumido em pouco tempo. Na sua ausência, a levedura fermentadora é incapaz de sintetizar ácidos graxos insaturados e esteróis essenciais para a manutenção da membrana citoplasmática em boas condições fisiológicas. Em fermentadores com dornas de dois litros de capacidade e fermento na concentração de 40,0g/l, a deficiência em ácidos graxos insaturados foi suprida pela adição, ao melão de cana de açúcar, de ácido oleico ou de óleo de soja comercial. A partir do 2º reciclo de células, já foi registrado aumento de rendimento em etanol, de 3% em média. A concentração do óleo de soja equivalente a 10,0mg de ácido oleico por litro deu melhores resultados: concentrações maiores aumentam o tempo de fermentação, enquanto as menores deixam de promover aumentos de rendimentos significativos. Considerando-se o volume de álcool produzido no Brasil, o custo do óleo de soja e que a adição deste não altera o processo, recomenda-se sua adição na fermentação alcoólica, em escala industrial.

Summary

Yield increase in alcoholic fermentation by the addition of soybean oil

In industrial alcoholic fermentation the oxygen dissolved in the medium is rapidly exhausted. In the absence of oxygen the yeast is unable to synthetise the unsaturated fatty acids and sterols, essential to the maintenance of adequate physiological conditions of the cell membrane. In two liter fermentors and with yeast concentration of 40g/l the deficiency was eliminated by the addition of commercial soy bean oil to the sugar cane must. An average of 3% yield increase began with the second cell recycling. The best concentration of soy bean oil, furnished the equivalent of 10,0mg of oleic acid per liter of must. With larger amounts of oil, fermentation time was increased whereas with smaller amounts no significant improvement in yield was obtained. The addition of this substance does not alter the process; the volume of alcohol produces by fermentation processes is of the order of 11 billion

liters (Brazilian estimative for 1986) and the price of the additive brings no cost problems. Therefore the addition of soy bean oil to the must in alcoholic fermentation is technically recommended and economically feasible.

Introdução

Os produtores de bebidas alcoólicas e, mais recentemente, os produtores de álcool têm procurado obter rendimentos mais elevados em etanol, ao longo das fermentações. A disponibilidade de leveduras melhor produtoras e o acerto das melhores condições de fermentação, são, pelo menos, dois modos diferentes de se atingir este objetivo.

Obter melhores rendimentos em etanol, através de ajustes fisiológicos da levedura, é algo mais recente e teve início com os trabalhos empíricos de Hayashida & col. (6, 7), quando descobriu-se, em *Aspergillus oryzae*, um fator estimulante da produção de álcool no saké. O grupo liderado por Hayashida detectou e identificou a fosfatidilcolina associada a uma proteína como sendo o fator responsável pela alteração (8). Mais tarde, chegou-se à conclusão de que os ácidos graxos insaturados, presentes neste fosfolipídeo, era a fração determinante (9, 10), comprovado por ensaios recentes com Tween 80 e outros ácidos graxos (15). Embora os aditivos favorecessem a melhor produção de etanol, a produtividade era e é problemática, uma vez que as fermentações ainda demoram quatro dias. Não obstante os trabalhos do grupo de Hayashida representaram grande avanço, pois, até então, a fermentação do saké demorava cerca de 20 dias.

Outro grupo, interessado em fermentações mais rápidas e com apreciáveis teores de etanol, foi constituído pelos franceses Larue, Lafon-Lafourcade e Ribereau-Gayon, dispostos a apresentar as fermentações de sucos de uva para produção de vinho. Os "fatores" capazes de interferir no processo e favorecer a obtenção de vinhos mais ricos em etanol foram, novamente, identificados como sendo os ácidos graxos insaturados e os esteróis (11, 12).

A tolerância da levedura ao etanol está intimamente ligada a composição química dos lipídios da membrana citoplasmática (3, 16, 17, 19, 20, 23), onde os ácidos graxos exercem relevante papel. Do ponto de vista estrutural, os ácidos graxos fazem parte da região hidrofóbica da membrana, separando dois ambientes aquosos. A dimensão e natureza da saturação das cadeias representam uma resposta altamente dependente das condições prévias de cultura do microrganismo considerado. As temperaturas elevadas são formadas cadeias carbônicas saturadas e longas; baixas temperaturas conduzem ao aumento do grau de insaturação e diminuição do comprimento das mesmas. Além disso, em *Saccharomyces cerevisiae*, a cultura em anaerobiose torna este microrganismo auxotrófico para ácidos graxos insaturados (2), podendo pois receber diferentes ácidos graxos exógenos (1, 4). Na levedura cultivada a 30°C, os principais ácidos graxos insaturados são o palmitoleico e o oleico, ao passo que os saturados são palmitico e esteárico.

Em fermentações conduzidas em tubos de ensaio (10ml), a adição de ácido oleico aumenta o rendimento da fermentação alcoólica, da ordem de 2 a 5% (13). O objetivo deste trabalho foi verificar se os mesmos ganhos de rendimento são encontrados na escala de micro-fermentadores. Além disso, procurou-se avaliar a possibilidade de substituir o ácido oleico pelo óleo de soja vendido comercialmente.

Material e Métodos

Inóculo de levedura - Foi utilizado fermento prensado na concentração de 40g de fermento úmido por litro de mosto.

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

Fermentações - Os ensaios de fermentação foram realizados em dois fermentadores Microferm (New Brunswick) em dornas de dois litros de capacidade contendo um litro de mosto a ser fermentado. As fermentações eram acompanhadas através de medidas periódicas de densidade relativa e determinações iniciais e finais de acidez e pH, concentração de açúcares redutores totais, concentração de etanol e porcentagem de leveduras mortas (14).

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

Ácido oleico - Foi adicionado 10mg/litro de mosto, quantidade esta previamente estabelecida em ensaios de pequeno volume como a menor quantidade que favorece a fermentação alcoólica, sem interferir no tempo de fermentação (13).

Óleo de soja - Foi adicionado 30ml/l de mosto, quantidade equivalente a 10mg de ácido oleico.

Foram realizados controles em fermentadores cujas dornas não receberam ácido oleico e óleo de soja.

Resultados e Discussão

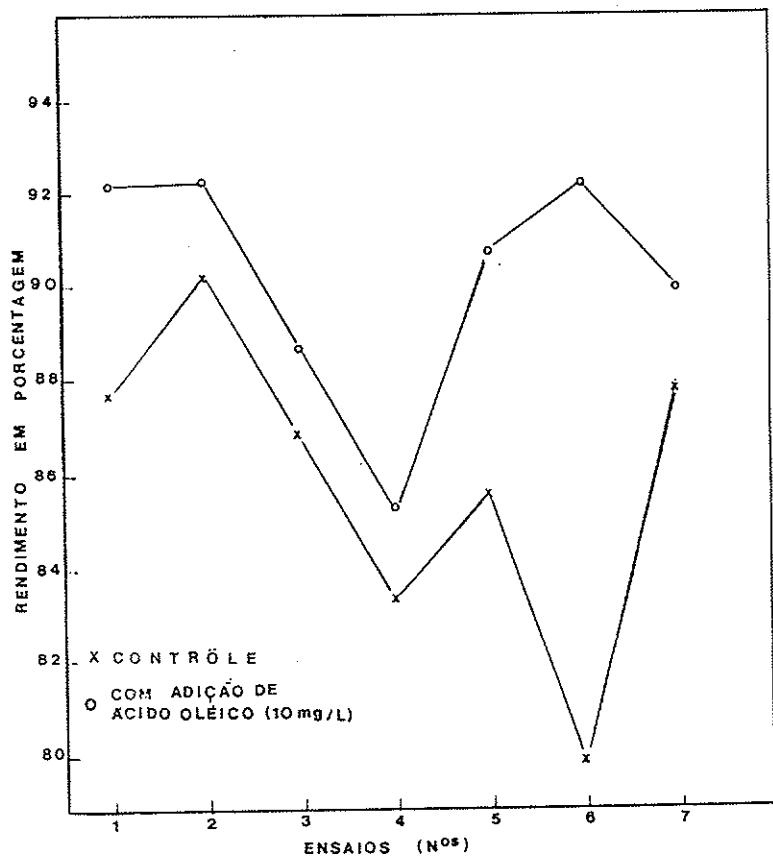
Os resultados estão representados pelos rendimentos alcoólicos em porcentagem após uma série de sete ensaios onde o produto adicionado foi ácido oleico (Fig. 1) e por uma série de oito ensaios consecutivos com adição de óleo de soja (Tabela 1). Baseado somente nos resultados apresentados na Tabela, o aumento médio foi de 1,97% porém baseado em quatro séries de ensaios, as análises estatísticas revelaram um percentual de aumento de rendimento da ordem de 3%, valor este significativo ao

Tabela 1 - Resultados de uma série de fermentação alcoólica utilizando como substrato o melago de cana de açúcar diluído, acrescido de sulfato de amônio e óleo de soja comercial, em fermentadores, com dornas de 2 litros de capacidade.

Símbolos: * = Fermentador controle (sem óleo de soja);
** = Fermentador com óleo de soja (30ml/l)

Ensaios (nºs)	Tempo de Fermentação (horas)	Células mortas (%)	Etanol produzido (g/l)	Rendimento em etanol (%)
1 A*	20	2,6	83,6	96,0
B**	21	1,8	83,9	95,4
2 A	18	18,0	82,0	89,1
B	19	17,9	85,5	89,1
3 A	15	19,1	81,4	87,5
B	15	18,8	86,1	92,6
4 A	13	12,8	81,9	90,6
B	13	-	83,4	91,0
5 A	15	16,1	81,9	89,0
B	13	18,4	84,5	91,8
6 A	24	17,0	80,0	88,8
B	27	18,9	80,8	89,8
7 A	18	16,3	82,0	89,9
B	19	20,4	83,9	92,0
8 A	14	20,8	81,7	86,0
B	15	22,1	85,4	91,0

Figura 1 - Rendimentos alcoólicos obtidos ao longo de uma série de ensaios fermentativos



nível de 1%. O percentual pode parecer pequeno porém se forem considerados os volumes de etanol produzidos nas usinas brasileiras (11,0 bilhões de litros, na safra de 86) verifica-se que, economicamente, poderá haver um ganho ponderável, sem interferência, em nenhum momento, na conduta rotineira já instalada.

O processo industrial de fermentação alcoólica, empregando leveduras, é, em grande parte, anaeróbio ou semi-aeróbio. Nestas condições, as células estão afetadas no esquema biossintético de ácidos graxos. A adição de uma fonte exógena destes supre as necessidades e as células têm condições de continuar a fermentação, transformando o açúcar presente em etanol. Beavan & col. (13) mostraram que células contendo maior porcentagem de ácidos graxos insaturados na membrana minimizavam os efeitos do etanol nessa estrutura, explicando, pelo menos em parte, a maior tolerância ao etanol. Combinando-se estes achados com os de Thomas & Rose (20) que verificaram ser as membranas de células ricas em ácidos graxos saturados menos permeáveis ao etanol - poderíamos explicar por que células ricas em insaturações liberam mais etanol ao meio.

Ao avaliar o efeito da adição de óleo de soja ou ácido oleico, o reciclo das células, é importante, pois, em alguns ensaios realizados, o efeito tornou-se aparente após o primeiro, o segundo ou somente após o terceiro reciclo.

A adição de ácido oleico não é economicamente viável. Entretanto, óleos vegetais ricos neste composto, poderiam ser empregados, como por exemplo os óleos de linhaça, algodão e amendoim (18). Escolhemos o óleo de soja, que existe em

abundância no mercado nacional, é encontrado ao longo de toda a safra alcooleira e é o mais barato.

A adição de óleo de soja é recomendada, pois, além de ser rico em ácidos graxos, poderia atuar, dependendo das concentrações adicionais, como anti-espumante e bactericida. Ensaios realizados com concentrações mais elevadas do que 30mg/l mosto, embora mantivessem o aumento do rendimento, revelaram aumento no tempo de fermentação e consequentemente uma queda na produtividade.

Não detectamos variações nas concentrações de células após cada reciclo, como Damiano & Wang (5) e Viegas & col. (21, 22) que, desta forma justificaram os aumentos de rendimento, após adição de farinha de soja.

Forçamos a levedura a seu limite de tolerância ao etanol, a fim de também avaliar sua viabilidade, uma vez que o reciclo de células é fundamental, ao contrário da fermentação com vistas à produção de vinho, onde a morte da levedura pode até beneficiar o processo (11).

Acompanhando os resultados de células mortas, observamos um paralelismo dos controles com aqueles adicionados de óleo de soja ou ácido oleico. O que entretanto chamou nossa atenção foi que nas fermentações em que adicionamos ácido oleico, este valor era da ordem de 40% ao passo que, naquelas em que o produto adicionado era o óleo de soja, este valor era da ordem de 20%, após oito reciclos, mostrando um benefício adicional da adição de óleo.

Referências Bibliográficas

1. Alterthum, F. & Rose, A.H. - Osmotic lysis of spheroplasts from *Saccharomyces cerevisiae* grown anaerobically in media containing different unsaturated fatty acids. *J. Gen. Microbiol.*, 77:371-382, 1973.
2. Andreasen, A.A. & Stier, T.J.B. - Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. II - Unsaturated fatty acid requirement for growth in a defined medium. *J. Cell Comp. Physiol.*, 43:271-281, 1954.
3. Beavan, M.J.; Charpentier, C. & Rose, A.H. - Production and tolerance of ethanol in relation to phospholipid fatty-acyl composition in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 431. *J. Gen. Microbiol.*, 128:1447-1455, 1982.
4. Carvalhal, M.L.C.; Castellani, B.R. & Alterthum, F. - Efeito de antibióticos poliénicos sobre *Saccharomyces cerevisiae* contendo diferentes esteróis e ácidos graxos insaturados incorporados a membrana citoplasmática. *Rev. Microbiol.* (S. Paulo), 11:71-75, 1980.
5. Damiano, D. & Wang, S.S. - Improvements in ethanol concentration and ethanol productivity in yeast fermentation using whole soy flour in batch and continuous recycle systems. *Biotechnol. Lett.*, 7:135-140, 1985.
6. Hayashida, S.; Feng, D.D. & Hongo, M. - Function of the high concentration alcohol-producing factor. *Agric. Biol. Chem.*, 38:2001-2006, 1974.
7. Hayashida, S.; Feng, D.D.; Ohta, K.; Chaitivmuong, S. & Hongo, M. - Composition and a role of *Aspergillus oryzae*-proteolipid as a high concentration alcohol producing factor. *Agric. Biol. Chem.*, 40:73-78, 1976.
8. Hayashida, S. & Ohta, K. - Cell structure of yeasts grown anaerobically in *Aspergillus oryzae* - proteolipid supplemented media. *Agric. Biol. Chem.*, 42:1139-1145, 1978.
9. Hayashida, S. & Ohta, K. - Effects of phosphatidylcholine or ergosterol oleate on physiological properties of *Saccharomyces sake*. *Agric. Biol. Chem.*, 44:2561-2567, 1980.
10. Hayashida, S.; Ohta, K.; Flor, P.Q.; Nanri, N. & Miyahara, L. - High concentration-ethanol fermentation of raw ground corn. *Agric. Biol. Chem.*, 46:1947-1950, 1982.
11. Lafon-Lafourcade, S. - New progress in wine and wine research. *Experientia*, 42:904-920, 1986.
12. Lafon-Lafourcade, S. & Ribereau-Gayon, P. - Developments in the microbiology of wine production. *Prog. Ind. Microbiol.*, 19:1-46, 1984.
13. Melo Cruz, M.R.; Alterthum, F. & Santos, A.L. - Aumento do rendimento da fermentação alcoólica com a adição de ácido oleico. *Anais do VI Simp. Nac. Ferment.*, p.5, 1982.

14. Melo Cruz, M.R.; Vairo, M.L.R.; Gambassi, D.M. & Alterthum, F. - Influência da penicilina V-ácida no controle das infecções bacterianas na fermentação alcoólica. *Rev. Microbiol.* (S. Paulo), 16:138-142, 1985.
15. Ohta, K. & Hayashida, S. - Roles of tween 80 and monoolein in a lipid-sterol-protein complex which enhances ethanol tolerance of sake yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46:821-825, 1983.
16. Rose, A.H. - Recent research on industrially important strains of *Saccharomyces cerevisiae*. In: - Skinner, F.A. & col., eds. - *Biology and activity of yeasts*. London, Academic Press, p.103-121, 1980.
17. Rose, A.H. & Beavan, M.J. - End-product tolerance and ethanol. In: - Holland, A., ed. - *Trends in biology of fermentation for fuels and chemicals*. New York, Academic Press, p.513-531, 1980.
18. Saigal, T. & Viswanathan, L. - Effect of oils and fatty acids on molasses fermentation by distillers yeast. *Enz. Microbiol. Technol.*, 6:78-80, 1984.
19. Thomas, D.S.; Hossack, J.A. & Rose, A.H. - Plasma-membrane lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.*, 117:239-245, 1978.
20. Thomas, D.S. & Rose, A.H. - Inhibitory effect of ethanol on growth and solute accumulation by *Saccharomyces cerevisiae* as affected by plasma-membrane composition. *Arch. Microbiol.*, 122:49-55, 1979.
21. Viegas, A.C.; Correia, I.S. & Novais, J.M. - Nutrient-enhanced production of remarkably high concentrations of ethanol by *Saccharomyces bayanus* through soy flour supplementation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50:1333-1335, 1985.
22. Viegas, A.C.; Correia, I.S. & Novais, J.M. - Rapid production of high concentrations of ethanol by *Saccharomyces bayanus*: mechanisms of action of soy flour supplementation. *Biotechnol. Lett.* 7:515-520, 1985.
23. Wang, S.S.; Chiang, H.L. & Jin, C.K. - Steady state analysis of the enhancement in ethanol productivity of a continuous fermentation process employing a protein-phospholipid complex as a protecting agent. *Enz. Microbiol. Technol.*, 3:249-257, 1981.

INFLUENCE OF SPORE AND MYCELIUM INOCULATION OF PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM ON SOLID-STATE FERMENTATION OF NAPIER GRASS (*PENNISETUM PURPUREUM SHUMAKER*) RESIDUE

Vânia Maria Martin Braga
& Jacques R. Nicoli*

Deptº de Bioquímica e Imunologia
Instituto de Ciências Biológicas UFMG
Caixa Postal 2486
30161 Belo Horizonte MG, Brasil

Summary

The fibrous residue of Napier grass remaining after protein extraction (*Pennisetum purpureum Shumaker*) was converted into a protein-enriched animal feed supplement by solid-state fermentation with *Phanerochaete chrysosporium*. The influence of spore or mycelium inoculation on growth parameters was studied. The total protein values of Napier grass residue were increased from 10.2% to approximately 16.3% and 18.7% within 6 and 7 days of fermentation for spore and mycelium inoculation, respectively. The release of cellulolytic enzymes was the same for either spore or mycelium inoculation. The amino acid pattern of the total protein did not show any significant change due to fermentation. The patterns of amino acids for both spore and mycelium inoculated solid-state fermentations are reasonably good when compared to the FAO reference protein.

Resumo

Influência da inoculação de esporos ou micélio de Phanerochaete chrysosporium em fermentação em meio sólido de resíduo de capim Napier (Pennisetum purpureum Shumaker)

O resíduo fibroso de capim Napier (*Pennisetum purpureum Shumaker*) obtido após extração de proteína, foi enriquecido em proteína por cultura em meio sólido com *Phanerochaete chrysosporium*. A influência do modo de inoculação (esporo ou micélio) sobre os parâmetros de crescimento foi estudada. Os valores em proteína total de capim Napier foram aumentados de 10,2% para 16,3% e 18,7% em 6 e 7 dias para as culturas inoculadas com esporo e micélio respectivamente. A liberação das enzimas celulolíticas foi semelhante para as inoculações com esporo e micélio. O perfil em aminoácidos da proteína total não mostrou mudança significativa devida à cultura. Os perfis em aminoácidos para os dois tipos de inoculação são razoavelmente bons quando comparados com a proteína de referência da FAO.

Introduction

For centuries, solid-state fermentation (SSF) has been used for upgrading the va-

* Author to whom reprint requests should be addressed.

lue of food, specially oriental foods (11), and today the technology may be usefully applied to new situations. The advantages of SSF are: (1) it yields a directly edible product; (2) the growth conditions for fungi are close to the natural ones and (3) it can be performed under local farm conditions. Several projects have been described to upgrade the protein content of starchy and cellulosic materials such as cassava (17) and corn stover (3). The most promising organisms for biological conversion of lignocellulosic materials to a more digestible feedstock are the white-rot fungi, which belong to the class Basidiomycetes. These organisms can degrade all wood components, although the relative enzyme activities and the order of attack vary between species. The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* exhibits lignolytic and cellulolytic abilities and yields high growth rates on lignocellulosic materials (5). This fungus has been suggested as a source of single cell protein (12). Its growth in various media and its nutritive value have been reported (2, 20).

A description of a process for the production of a protein-enriched fermented feed by direct SSF of Napier grass (*Pennisetum purpureum* Shumaker) residue with *P. chrysosporium* is here described.

Material and Methods

Microorganism - The fungus *P. chrysosporium* ATCC 28236 was used. The culture was grown on Sabouraud dextrose agar for seven days at 37°C and then stored in the refrigerator at 4°C for a maximum of one month.

Substrate - The substrate is the fibrous residue of the leaf protein concentrate production (4) from Napier grass (*P. purpureum* Shumaker) and was kindly provided by Dr. Rolf Carlsson, Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC).

Analysis of the fiber residue - Total nitrogen was determined according to the Kjeldahl method (1). Crude protein was expressed as total nitrogen multiplied by 6.25. Moisture, ether extractives and total ash were determined according to AOAC (1). Cellulose and lignin were determined by the methods of Updegraff (21) and Tappi (19), respectively.

Preparation of the solid medium - Dried Napier grass residue was chopped into a fibrous form (particles varied between 0.1 and 0.5cm long) and aliquots of 1g were dispensed into Petri dishes. These samples were sterilized for 15 min at 120°C and the fibers were moistened with 4ml of a sterile solution of the following composition: KH_2PO_4 , 0.6g/l; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.4g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5g/l; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.0g/l; and urea, 1.0g/l. This solution was sterilized by autoclaving at 120°C for 15 min. The urea component was sterilized separately by membrane filtration. The sterile material was inoculated with 5ml of a spore or mycelium inoculum and incubated at 30°C. The final moisture content after adding salt mixture and inoculum was about 90%.

Preparation of the spore inoculum - Spores were obtained from slant cultures. Sterile distilled water was added and the spores suspended by stirring. Each Petri dish was inoculated with 5ml of the spore suspension which contained about 3.36×10^7 spores.

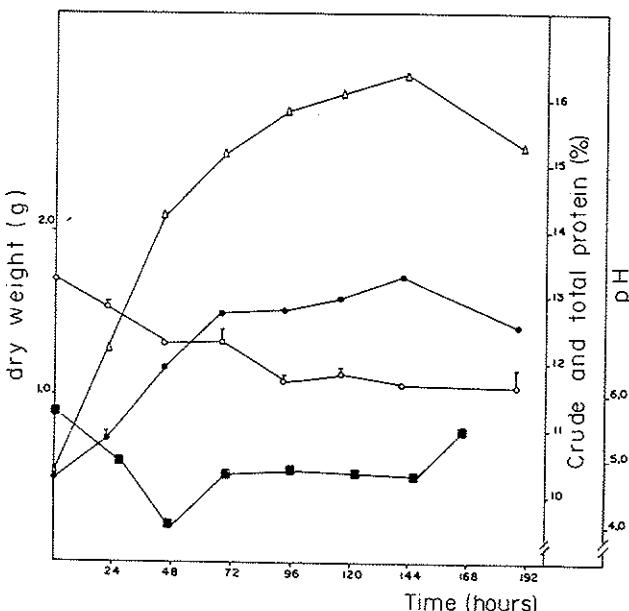
Preparation of mycelium inoculum - A *P. chrysosporium* spore suspension with approximately 1.08×10^8 spores from a slant culture was transferred to a 2 liter Erlenmeyer flask containing 500ml of culture medium with the following constituents per liter: glucose, 20g; KH_2PO_4 , 0.6g; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.4g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5g; NaCl , 0.1g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3.9g; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 6.0mg; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 3.76mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 6.6mg; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 7.4mg; CoCl_2 , 1.0mg; and yeast extract, 2.0g. The inoculated flask was incubated at room temperature on a reciprocating shaker set at 120 strokes per min. Very good mycelial growth was obtained within 72 hours. The inoculum culture was centrifuged and washed three times with 100ml of sterile

distilled water and then suspended in 250ml of sterile distilled water. Each Petri dish was inoculated with 5ml of the suspension of mycelium (about 0.1g dry weight mycelium) which had been homogenized in a Waring blender under aseptic conditions.

Sample treatment and analysis - The entire contents (fiber plus biomass) of six Petri dishes were harvested each day for analysis. Each sample was thoroughly washed three times with 70ml of 0.05M citrate buffer pH 4.8 to remove soluble nitrogen and extract cellulolytic enzymes, and dried at 100°C overnight. Crude protein was determined in the solids and extracellular protein was measured by the Lowry procedure (10), with crystalline bovine serum albumin as the standard. Total protein was calculated by summing up non extractable crude and extracellular proteins. The amino acid analysis of the protein in the biomass plus fiber was done in a Beckman Model 120°C amino acid analyzer after hydrolysis of the sample in 6N HCl for 20 hours (18). Tryptophan was determined by the Miller procedure (15). True protein was obtained by summing up amino acid values (g/100g dry weight). All enzymatic assays and extracellular determinations were carried out in the buffer extracts. Cellulase activity was measured either as the capacity to hydrolyze Whatman N° 1 filter paper (FPase) or as carboxymethylcellulase (CMCase) as described by Mandels & Andreotti (14). β -glucosidase activity was estimated by the salicin method (14). The protease activity was determined using Azocasein (Sigma Chemical Company) at a concentration of 5mg/ml suspended in 0.05M sodium acetate buffer pH 5.0 as substrate. A 1ml aliquot of Azocasein suspension was incubated with 1ml of enzyme solution at 37°C for 30 min. The reaction was stopped with a 10% trichloroacetic acid solution and residual Azocasein was removed by centrifugation. The absorbance of the supernatant was measured at 428nm. These activities are expressed as units per gram of substrate. The pH of Napier grass mycelium mixture was measured with a glass electrode. For this purpose 50ml of distilled water added to the entire content of a Petri dish. The pH of the suspension was measured after 15 min shaking. Standard deviation limits are represented by vertical bars in the figures.

Figure 1 - Solid-state fermentation of *P. chrysosporium* on Napier grass residue after spore inoculation.

Symbols: (●) = Crude protein; (Δ) = Total protein; (■) = pH; (○) = Dry weight



Results and Discussion

In the SSF of Napier grass residue by *P. chrysosporium*, both spore and mycelium inoculum started to show mycelial growth within 24 hours of inoculation. Irregularly distributed tufts of fresh mycelial growth were visible on the exposed solid surface only with mycelium inoculation. Within the next 36 to 96 hours, very thick mycelial growth was noticed on the surface of the substrate. The mycelia penetrated also the whole depth of the solids in the Petri dishes but was heaviest at the upper surface.

Enrichment of the protein content of Napier grass fiber residue after spore inoculation is shown in Figure 1. The proportion of non extractable crude protein was increased from 10% to about 13% within 72 hours. However crude protein could be considered as only intracellular. Summing up non extractable crude and extracellular proteins showed that the resulting total protein reached 16.3% within 144 hours. The dry matter loss of the residue caused by fermentation could not be readily measured in the SSF, because the weight loss was associated with a given amount of growth.

Figure 2 shows that the protein enrichment of the Napier grass residue after mycelium inoculation was higher than after spore inoculation. Crude and total protein values of about 15.7 and 18.7%, respectively, were obtained within 168 hours. Mycelium growth could be estimated from the increase in crude protein, assuming a constant proportion of protein in the mycelium. Protein production and growth increased continuously in the mycelium-inoculated SSF whereas they stopped at 72 hours in the spore-inoculated SSF. The factors limiting growth in the spore-inoculated SSF. The factors limiting growth in the spore inoculated samples are not known.

Figure 2 - Solid-state fermentation of *P. chrysosporium* on Napier grass residue after mycelium inoculation.

Symbols: (●) = Crude protein; (Δ) = Total protein; (■) = pH; (○) = Dry weight

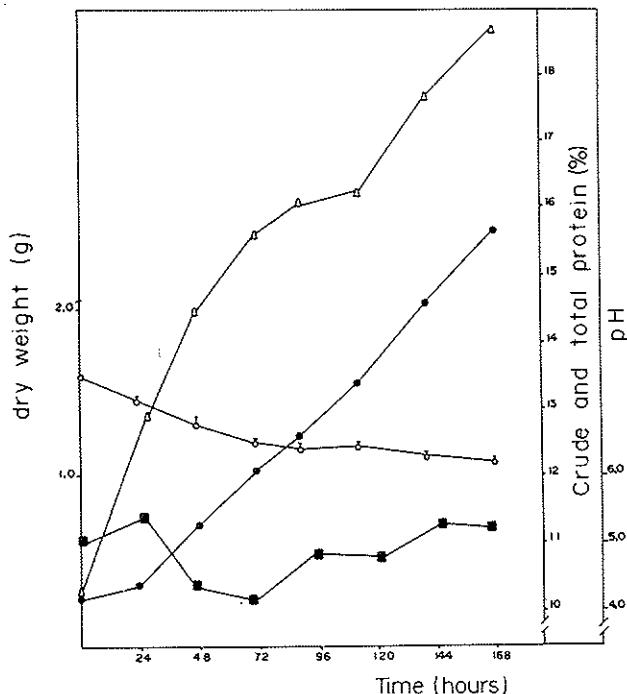
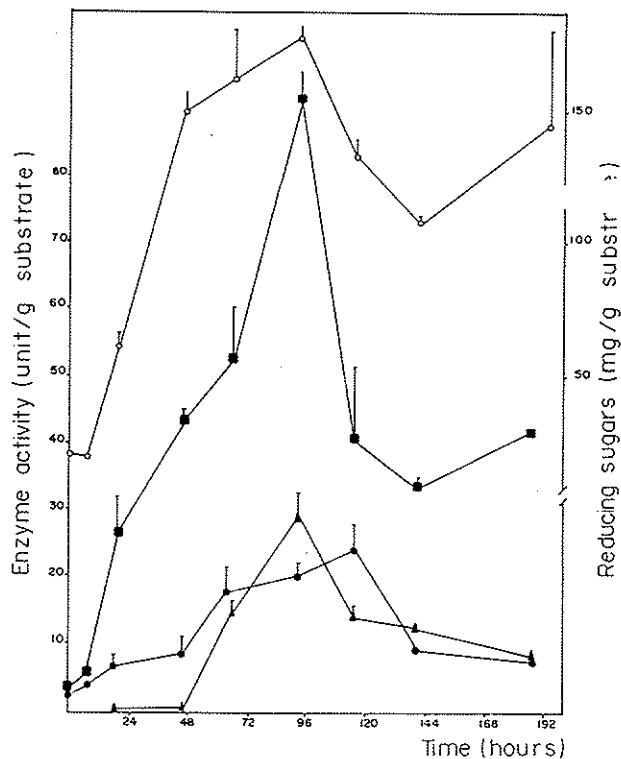


Figure 3 - Solid-state fermentation of *P. chrysosporium* on Napier grass residue after spore inoculation.

Symbols: (■) = CMCase; (●) = FPase; (▲) = β -glucosidase; (○) = Activities and reducing sugars



The values of final protein content compared favorably with other cellulolytic processes. Han & Henderson (9) reported 14% protein content in the final product when acid-treated rye-grass was fermented for 2-3 days by *Aureobasidium pullulans*. Yu & col. (22) obtained 6.8% protein in the end product when alkali-treated rye-grass was fermented with a mixed culture of *Cellulomonas* sp. and *Alcaligenes faecalis* for 2-3 days. Protein upgrading could be higher with a more assimilable substrate such as starch (17).

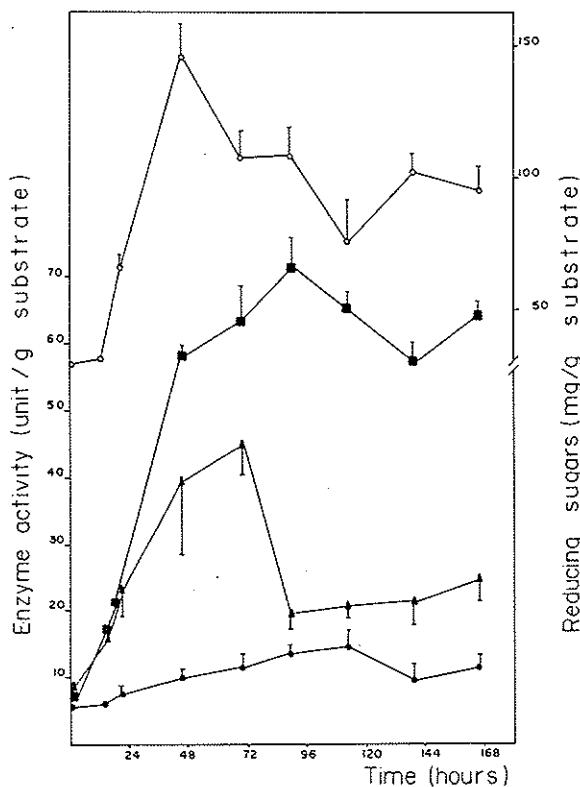
Figure 3 shows the CMCase, the FPase, and the β -glucosidase activities during the SSF of Napier grass residue inoculated with spores. The activities tested were maximal at the 4th and 5th days, corresponding to the maximum protein enrichment, and then a sharp decrease was noted. The appearance of β -glucosidase activity lagged two days behind cellulase production.

Figure 4 shows the cellulase activities during the SSF of Napier grass residue inoculated with mycelium. The initial value for β -glucosidase was higher than the one obtained with spore inoculum; its maximal value was reached at the 2nd and 3rd days. Except for β -glucosidase, there was no sharp decrease in the enzymatic activities. This fact was consistent with the continuous protein enrichment in the mycelium inoculated SSF.

Figure 5 shows the extracellular protein and the protease activity for both inoculum processes. As it could be noted, the concentration of soluble

Figure 4 - Solid-state fermentation of *P. chrysosporium* on Napier grass residue after mycelium inoculation.

Symbols: (■) = CMCase; (●) = FPase; (▲) = β -glucosidase; (○) = Activities and reducing sugars



extracellular protein corresponds to the enzymatic activities of the different cellulolytic enzymes, thus indicating that high enzyme yields are result of a

Table 1 - Chemical composition of Napier grass (*Pennisetum purpureum* Shumaker) residue before and after solid-state fermentation by *Phanerochaete chrysosporium*

Component (g/100g)	Napier grass residue	Fermentation product	
		Spore inoculation	Mycelium inoculation
Moisture	3.93	-	-
Crude protein	10.25	13.30	15.70
True protein	8.05	9.76	14.09
Ether extractives	2.80	8.35	4.12
Ash	4.51	4.15	4.39
Cellulose	30.94	20.59	27.15
Lignin	20.15	18.83	18.50

strengthened secretion of protein. It seems obvious that the production of these extracellular enzymes increases at the expense of the protein content of the mycelium. It can be seen that the extracellular protein makes up between 18.6% and 16.3% of the total protein enrichment (Figures 1 and 2) for the spore and mycelium inoculation, respectively. Similar results were obtained with *Sporotrichum pulverulentum* grown on waste fibers (6). If the intention of a cellulosic fermentation is to produce microbial protein, it may therefore be advantageous to operate the fermentation in order to minimize any overproduction of extracellular enzymes that could reduce the protein content of the mycelium. The occurrence of protease activity may be the reason why cellulase activities decrease slightly after 72 to 96 hours, particularly in spore inoculated SSF. However protease activity shows two peaks at 60 and 156 hours for both inoculation processes.

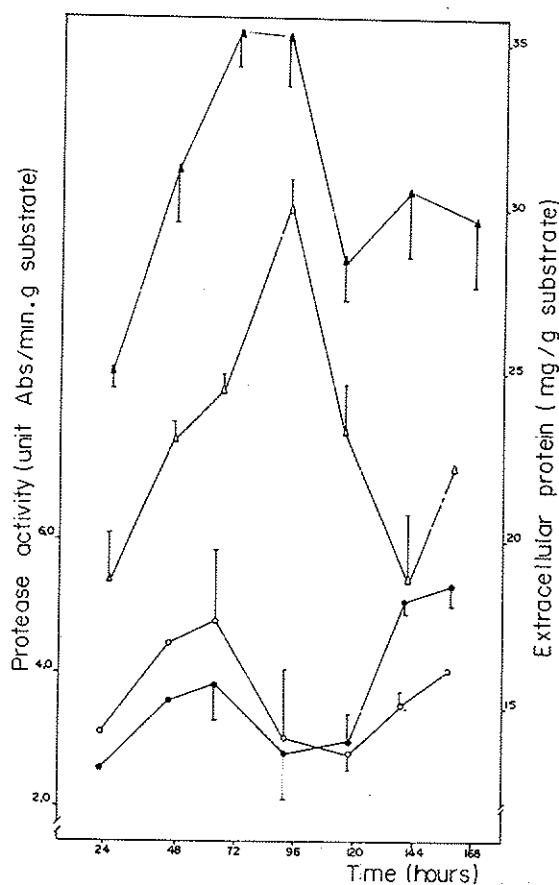
Table 1 shows the chemical composition of the Napier grass residue before and after both SSF procedures. True protein of the residue before the fermentation is low as to be expected in this kind of material. Cellulose and lignin values are in the range considered as normal for such a product. Because of the low moisture content of the Napier grass residue, a great water volume is needed to moisten the substrate. True protein and ether extractives increased as a result of fermentation.

Figure 5 - Solid-state fermentation of *P. chrysosporium* of Napier grass residue after spore (open symbols) or mycelium (closed symbols) inoculation.

Symbols: (Δ , \blacktriangle) = Extracellular protein; (\circ , \bullet) = Protease activity

The mycelium inoculation yielded a higher protein content and a lower ether extractive value than did the spore inoculation. Kirk and co-workers have characterized many physiological parameters required by *P. chrysosporium* for enhanced lignin degradation. The conditions are somewhat unusual as the fungus requires a nonagitated mode of cultivation (13) and nitrogen starvation (8). Studies on SSF of lignocellulosic materials by *S. pulverulentum* showed that nitrogen supplementation over 3.36mg/g of substrate had an unfavourable effect on degradation (23). The supplementation of 3.6mg N/g of substrate used in this works was a compromise to obtain protein production and lignocellulose degradation. At the end of the SSF the fungus consumed 56.6% of the cellulose and 39.2% of the lignin with the spore inoculation; the respective values for mycelium inoculation were 41.2% and 38.6%.

In Table 2, the amino acid patterns of Napier grass residue before and after SSF are given. During the fermentation processes, the amino acid pattern appeared to remain unchanged as for coffee pulp SSF (16). A comparison with the FAO reference protein (7) shows that the products obtained with both spore and mycelium



inoculation processes had a reasonable pattern with the low contents of sulfur amino acids and lysine as the most obvious deficits.

This work gives a preliminary indication that the solid-state process may be technically and economically competitive with slurry processes for single cell protein production from cellulosic substrates, specially when considered in the light of reduced product recovery costs. However, a lower moisture content of the substrate would be desirable for the aeration in such a system as soon as an attempt will be made to scale the process up to a practical quantity. The best result in terms of increasing protein of Napier grass residue was obtained with mycelium inoculation.

Table 2 - Amino acid composition of the Napier grass residue, of the final products from solid-state fermentation of Napier grass residue after spore or mycelial inoculation and FAO reference protein (1973)

Amino acid (g/100g protein)	Napier grass residue	Fermentation product		FAO
		Spore inoculation	Mycelium inoculation	
Lysine	3.60	3.21	3.61	5.5
Histidine	2.40	2.27	3.20	
Arginine	5.40	5.00	6.54	
Aspartic acid	9.25	10.30	9.87	
Threonine	4.56	4.25	4.42	4.0
Serine	4.44	3.97	4.15	
Glutamic acid	11.17	11.72	11.03	
Proline	5.28	4.91	4.70	
Glycine	6.72	7.09	6.88	
Alanine	6.36	6.43	6.13	
Total S amino acid	2.76	2.36	2.79	3.5
Valine	6.48	6.99	6.54	5.0
Isoleucine	5.52	5.48	5.24	4.0
Leucine	11.29	10.49	10.07	7.0
Total aromatics	10.44	11.63	11.51	6.0
Tryptophan	0.92	1.04	0.95	1.0

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge Dr. Armando Gil de Almeida Neves for the amino acid analysis, Dr. Enio Cardillo Vieira for going through the manuscript and making helpful suggestions, and Mrs Miram Perez Maluf for valuable technical help. This work was supported by a research grant from the Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

References

- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. 10.ed. Washington, Association of Official Analytical Chemists, 1965.
- Cardoso, M.B. & Nicoli, J.R. - Single cell protein from the thermotolerant fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown in vinasse. II - Nutritive value. Nutr. Rep. Intern., 24:249-255, 1981.
- Chahal, D.S.; Moo-Young, M. & Vlach, D. - Protein production and growth characteristics of *Chaetomium cellulolyticum* during solid state fermentation of corn stover. Mycologia, 75:587-603, 1983.
- Edwards, R.H.; Miller, R.E.; de Fremery, D.; Knuckles, B.E.; Bickoff, E.M. & Kohler, G.O. - Pilot plant production of non edible white fraction leaf protein concentrate from alfalfa. J. Agric. Food Chem., 23:620-626, 1975.

5. Eriksson, K.E. - Enzyme mechanisms involved in cellulose hydrolysis by the rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Biotechnol. Bioeng.*, 20:317-332, 1978.
6. Eriksson, K.E. & Larsson, K. - Fermentation of waste mechanical fibers from a newsprint mill by the rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Biotechnol. Bioeng.*, 17:327-348, 1975.
7. FAO/WHO - Energy and protein requirements. Geneva, World Health Organization, Technical Reports Series n° 522, 1973.
8. Fenn, P. & Kirk, T.K. - Relationship of nitrogen to the onset and suppression of lignolytic activity and secondary metabolism in *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.*, 130:59-60, 1981.
9. Han, Y.W. & Anderson, A.W. - Semi solid fermentation of rye grass straw. *Appl. Microbiol.*, 30:930-934, 1975.
10. Hartree, E.F. - Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, 48:422-427, 1972.
11. Heseltine, C.W. - A millenium of fungi, food and fermentation. *Mycologia*, 57:149-197, 1965.
12. Hofsten, B. & Hofsten, A. - Ultrastructure of a thermotolerant basidiomycete suitable for production of food protein. *Appl. Microbiol.*, 27:1142-1148, 1974.
13. Kirk, T.K.; Schultz, E.; Connors, W.J.; Lorenz, L.F. & Zeikus, J.G. - Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.*, 117:277-285, 1978.
14. Mandels, M. & Andreotti, R. - Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnol. Bioeng.*, 6:21-33, 1976.
15. Miller, E.L. - Determination of the tryptophan content of feedingstuffs with particular reference to cereals. *J. Sci. Food Agric.*, 18:381-386, 1967.
16. Peñazola, W.; Molina, M.R.; Brenes, R.G. & Bressani, R. - Solid state fermentation: an alternative to improve the nutritive value of coffee pulp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49:388-393, 1985.
17. Raimbault, M. & Alazard, D. - Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 9:199-209, 1980.
18. Spackman, O.H.; Stein, W.H. & Moore, S. - Automatic recording apparatus for the use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.*, 30:1190-1206, 1958.
19. TAPPI - Technical Association of the Pulp and Paper Industry - Acid insoluble lignin in wood and pulp. *Stand. Meth.*, T-222 os 74. New York, Tappi Standards and Suggested Methods, 1974.
20. Thomke, S.; Rundgren, M. & Eriksson, S. - Nutritional evaluation of the white rot fungus *Sporotrichum pulverulentum* as a feedstuff to rats, pigs, and sheep. *Biotechnol. Bioeng.*, 22:2285-2303, 1980.
21. Updegraff, D.M. - Semimicro determination of cellulose in biological materials. *Anal. Biochem.*, 32:420-424, 1969.
22. Yu, P.L.; Han, Y.W. & Anderson, A.W. - Semi solid fermentation of alkali-treated straw. *Proc. Western Section Amer. Soc. Anim. Sci.*, 27:189:191, 1976.
23. Zadrazil, F. & Brunnert, H. - Solid-state fermentation of lignocellulose containing plant residues with *Sporotrichum pulverulentum* Nov. and *Diochomitus squalens* (Karst.) Reid. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 16:45-51, 1982.

**ALGUNS ASPECTOS DA MICROBIOTA DO SOLO SOB VEGETAÇÃO DE CERRADO,
TRATADO COM VINHAÇA, NO MUNICÍPIO DE CORUMBATAÍ, SP***

Sânia Maria Tauk
& Marcelo Silveira Ruegger

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

Resumo

Foi analisado o efeito da adição de vinhaça nos tamanhos das comunidades microbianas crescidas nos meios com sacarose, amido e carboximetil celulose (CMC) como única fonte de carbono em solo sob cerrado, juntamente com alguns fatores abióticos deste ecossistema: pH; umidade relativa do ar; umidade do solo; temperatura do ar; temperatura do solo e matéria orgânica. O número de microrganismos foi determinado pelo método indireto, utilizando-se a técnica de diluição em série e meios de cultura com pH específicos para cada grupo nutricional analisado. As placas foram incubadas a 28°C por seis dias. A vinhaça adicionada ao solo aumentou significativamente os números de fungos capazes de crescer no meio com CMC, amido ou sacarose como única fonte de carbono. Entretanto, este efeito foi temporário, porque após cinco meses da adição da vinhaça, as condições no solo com ou sem tratamento, mostraram uma tendência de serem iguais. Foi observada uma correlação entre a sazonalidade e a adição do resíduo sobre os números de fungos e a umidade do solo. Não houve correlação entre matéria orgânica e o pH do solo estudado.

Summary

Aspects of microflora in soil under "cerrado" vegetation, treated with vinasse in Corumbataí, São Paulo, Brazil

The effect of vinasse addition on the microbial communities growing in culture media with sucrose, starch and carboxymethyl cellulose (CMC) as the sole carbon source, was analysed in the "cerrado" soil. Some abiotic factors such as; pH; relative air and soil moisture; air and soil temperature and organic matter were also analysed. The number of microorganisms was determined by the indirect method using serial dilution plate method and specific culture media and pH for each nutritional group analysed. The plates were incubated at 28°C for 6 days. The vinasse which was added to soil increased significantly the number of fungi which are able to grow on CMC, starch and sucrose culture media as the only carbon source. However, this effect was temporary since the conditions in both soils showed a tendency to be similar after 5 months from the vinasse addition. An interaction of sazonality with the vinasse addition could be observed on the number of fungi and the soil moisture. This interaction was not

*Projeto financiado pela FINEP e CNPq.

found for organic matter and pH of "cerrado" soil.

Introdução

A tecnologia da fabricação do açúcar e do álcool origina ao longo do processo, vários efluentes e outros resíduos. Porém o problema maior de poluição provocado por muitos destes, situa-se na vinhaça (2). Este resíduo tem coloração escura, contendo basicamente água (93%) e sólidos orgânicos e minerais (7%). Possui ainda alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO), sendo em média 25.000ppm, porém em casos especiais pode este valor chegar a 50.000ppm (26). Embora a vinhaça não seja tóxica, ela é corrosiva e tem provocado desequilíbrio nos ecossistemas onde vem sendo eliminada, estimulando estudos sobre sua aplicação imediata, sem que ocorra efeitos adversos colaterais (25).

Uma das alternativas da utilização da vinhaça tem sido como fertilizante (4, 13, 14), entretanto existindo alguns fatores limitantes (24) que precisam ser melhor estudados.

A vinhaça apesar de seu alto teor em água, possui grande quantidade em matéria orgânica, e ao ser adicionada no solo, poderá acarretar efeitos similares aos outros resíduos orgânicos. Existem poucas informações sobre a microbiota do solo tratado com vinhaça em agroecossistemas (8, 18) e, em solo sob cerrado observou-se que este resíduo adicionado consecutivamente por dois anos, provocou aumento de fungos e uma tendência em diminuir os actinomicetos (10). Quanto às bactérias fixadoras de nitrogênio verificou-se que a vinhaça provocou inibição temporária do gênero *Beijerinckia*, enquanto houve aumento da comunidade bacteriana. Quando ocorreu declínio desta, houve aumento daquele (22).

Os microrganismos do solo podem aumentar em número e em atividade quando há acréscimo da matéria orgânica no mesmo, desde que outros elementos nutricionais estejam presentes (1). Em solo sob cerrado, a matéria orgânica sofre uma decomposição rápida, sob ação de microrganismos, havendo necessidade de reposição na mesma intensidade (23).

Com o objetivo de verificar o efeito acumulativo da vinhaça em solo sob cerrado, foram estudados diversos fatores ecológicos que atuam neste ecossistema (10). Continuando com estes mesmos objetivos vem sendo observados diversos fatores, a partir de 1983, entretanto, os microrganismos telúricos segundo algumas de suas funções nutricionais, juntamente com alguns fatores abióticos presentes na área em estudo, como: matéria orgânica; pH; umidade e temperatura do solo; foram estudados em 1984 e 1985, procurando-se estabelecer uma possível interação dos mesmos.

Material e Métodos

A área em estudo constituiu uma reserva de cerrado localizada no município de Corumbataí, SP, onde a vegetação varia de 4 a 12 metros de altura em um Latossolo Vermelho-Amarelo, fase arenosa (3). Esta área vem sendo mantida livre da ação do fogo desde 1962, o que tem possibilitado o desenvolvimento da vegetação sem alterações bruscas.

No cerrado "sensu stricto" (11) foram escolhidos ao acaso, dois locais com 18m²/cada, sendo que um recebeu a vinhaça e o outro não sofreu nenhum tratamento, servindo este último para controle do experimento. O resíduo tem sido adicionado em um dos locais desde 1981, em doses de 20L/m²/ano e após 1984, esta dose foi e 50L/m²/ano, sendo esta adicionada ao solo sempre no mês de junho.

O resíduo foi levado a quente até a reserva natural, em galões de 20L e distribuído uniformemente na área, com regadores de volumes conhecidos.

A vinhaça utilizada foi do tipo caldo misto (13), pH 4,5 tendo a composição: matéria orgânica 3,81%; magnésio 0,04%; potássio 0,38%; nitrogênio total 0,08%; íon fosfato (PO_4^{3-}) 0,02%; íon sulfato (SO_4^{2-}) 0,40% e sólidos totais 4,8% (Tauk, S.M., trabalho não publicado).

Os períodos correspondentes aos parâmetros aqui descritos se referiam apenas de abril/1984 a abril/1985 e posteriormente aos meses de setembro a dezembro de 1985.

Foram tomadas amostras compostas de solo (6/local), das 9:00 às 11:00 horas, no horizonte A até 15cm de profundidade, retirando-se antes a serapilheira. No mês de junho, amostras foram coletadas logo após a adição do resíduo e depois de 15 dias, desta.

As amostras de solo foram levadas ao laboratório para serem imediatamente processadas considerando as diferentes análises realizadas, após peneirá-las em malha de 2,83mm (20).

Durante as coletas realizaram-se leituras de temperatura e umidade relativa do ar com termohigrômetro e temperaturas do solo a 5 e a 20cm de profundidade com termômetro de haste. Determinou-se a umidade do solo à 105°C até a obtenção do peso constante (20). Amostras de 10g de solo peso seco foram colocadas a 800°C/3 horas para determinação dos teores de cinzas, calculando-se a partir destes a porcentagem de matéria orgânica (19). Para a determinação do pH do solo utilizou-se uma suspensão de solo (10g) em 90ml de solução salina, fortemente agitada e foi medido em pHímetro digital.

Estimou-se a densidade de grupos de microrganismos pelo método indireto, utilizando-se a técnica de diluição em série (9) a partir de uma suspensão de 10g de solo em 90ml de solução salina previamente esterilizada. Os meios de cultura utilizados foram meio mineral (16) com 2% de ágar acrescido de 0,5% de sacarose, amido ou carboximetil celulose (CMC), respectivamente para organismos capazes de crescer em meio de cultura com estas substâncias, como única fonte de carbono. Os dois primeiros tiveram pH 4,1 e o último um pH 4,6. O número de repetições n = 30. Todos os meios de cultura e solução salina foram autoclavados à 120°C atm/20 minutos (16).

Através de ensaios prévios foram estabelecidas as diluições ideais para determinar número de organismos capazes de crescer em meio mineral com CMC, 10^{-3} , e para aqueles que crescem em meios com amido ou sacarose, 10^{-4} .

As placas foram incubadas a 28°C durante seis dias, após os quais as colônias foram contadas. Para a identificação dos fungos até gênero foram feitas lâminas assepticamente e observadas em microscópio marca Zeiss. Quando necessário utilizou-se corante azul de Aman para evidenciação de frutificações e foram utilizadas chaves específicas de identificação (5, 6).

Os fatores estudados mensalmente, em cada um dos dois grupos experimentais, foram caracterizados pelas médias e desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas com o teste "t" (7) comparando-se mensalmente os fatores estudados. Para verificar as alterações durante o período de estudo utilizou-se a análise de variância com dois fatores e com replicação (29).

Resultados e Discussão

Procurou-se padronizar o horário em que as coletas foram realizadas, na tentativa de minimizar os efeitos das flutuações diárias dos fatores ecológicos no solo (1). A umidade relativa e a temperatura do ar determinadas durante as coletas estão na Figura 1. Estas observações juntamente com as de outros autores (10, 21) demonstraram que a área de estudo possui padrão climático tropical.

Os efeitos da vinhaça sobre a temperatura do solo medida a 5 e a 20cm de profundidade (Figura 1), foram observados. Constatou-se que houve aumento estatisticamente significativo desse parâmetro somente no mês de junho, quando a vinhaça foi adicionada a quente, como tem sido utilizada em agroecossistemas (15, 19).

Outros efeitos de resíduo sobre a matéria orgânica, umidade e pH são apresentados nas Figuras 2 e 3. A análise estatística demonstrou que a vinhaça aumentou os teores desses três parâmetros no solo (Tabela 1). Foi observada a correlação entre o resíduo e a sazonalidade sobre a umidade do solo, fato este não observado para os outros dois parâmetros. Verificou-se ainda sazonalidade para o pH e a umidade do solo, durante o período de estudo.

A vinhaça demonstrou comportamento similar a outros resíduos também ricos em compostos orgânicos que, ao serem adicionados no solo, aumentaram o teor de matéria orgânica (19), a retenção de água (12) e o pH (27, 28).

Figura 1 - Média das medidas dos fatores abióticos durante as coletas mensais das amostras de solo sob cerrado, nas áreas de estudo, com (—) e sem (---) vinhaça (v)

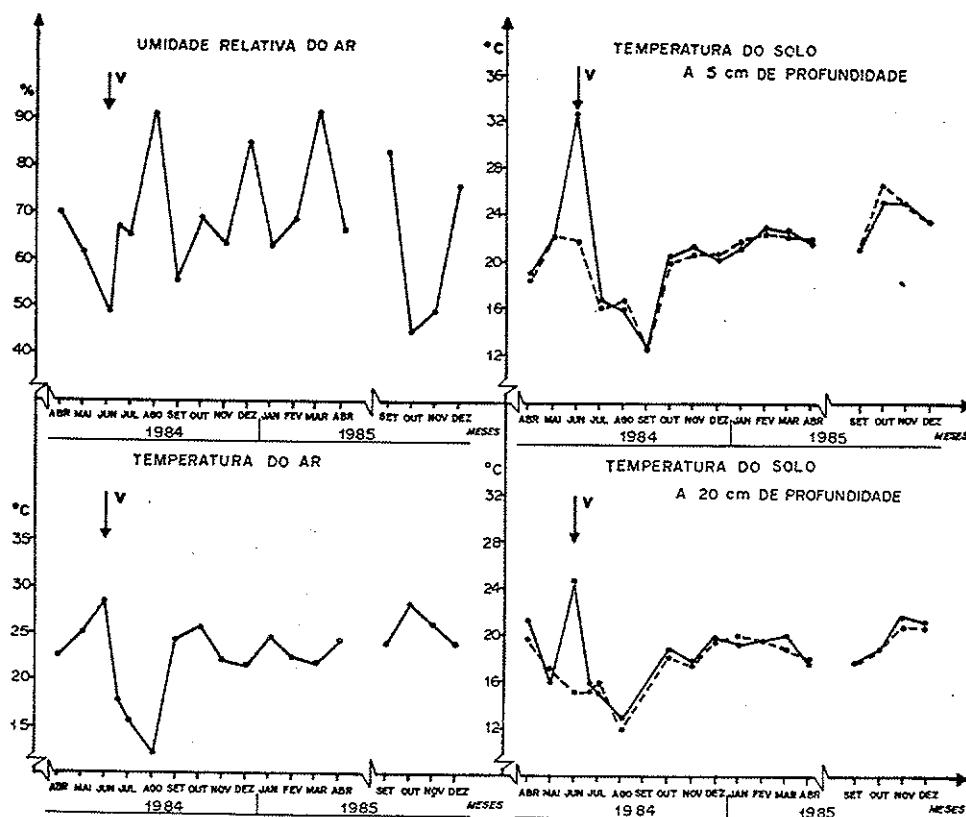


Tabela 1 - Efeito da adição da vinhaça sobre a matéria orgânica (%), umidade (%) e pH do solo sob cerrado com ou sem vinhaça, observado estatisticamente pela análise de variância com dois fatores e com replicação.

Símbolos: n.s. = Não significativo; ** = Probabilidade de erro menor que 0,001

Fonte de variação	df	F. calculado		
		Materia orgânica	Unidade	pH
Sub-grupos	25	-	-	-
Vinhaça	1	19,43**	7,10**	38,94**
Meses	12	1,26ns	18,09**	9,79**
Vinhaça/Meses	12	0,50ns	2,81**	1,77ns
Erro	130	-	-	-
Total	155	-	-	-

Figura 2 - Média das medidas de matéria orgânica e umidade do solo sob cerrado com (—) ou sem (---) vinhaca (v)

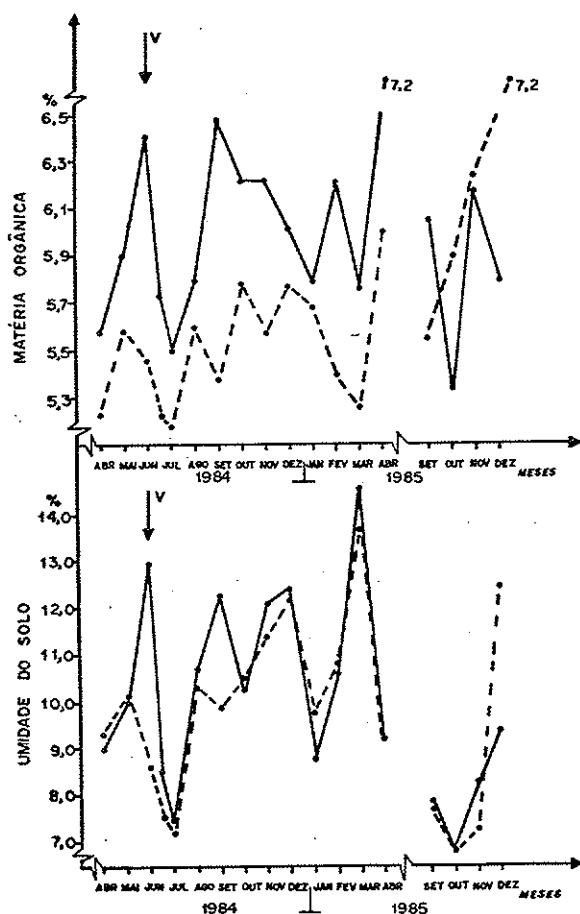


Tabela 2 - Efeito da adição da vinhaca na comunidade de microrganismos, determinada pelo número total através da técnica de diluição em série.

Símbolos: n = 30 e analisado de variância com dois fatores e com replicação; ** = Probabilidade de erro menor que 0,001

Fonte de variação	df	F. calculado		
		Sacarolíticos	Amilolíticos	Celulolíticos
Sub-grupos	23	-	-	-
Vinhaca	1	114,14**	140,56**	24,74**
Meses	13	19,26**	23,95**	278,34**
Vinhaca/Meses	13	12,18**	11,20**	10,76**
Erro	696	-	-	-
Total	746	-	-	-

Figura 3 - Média das medidas do pH do solo sob cerrado com (—) ou sem (---) vinhaça (v)

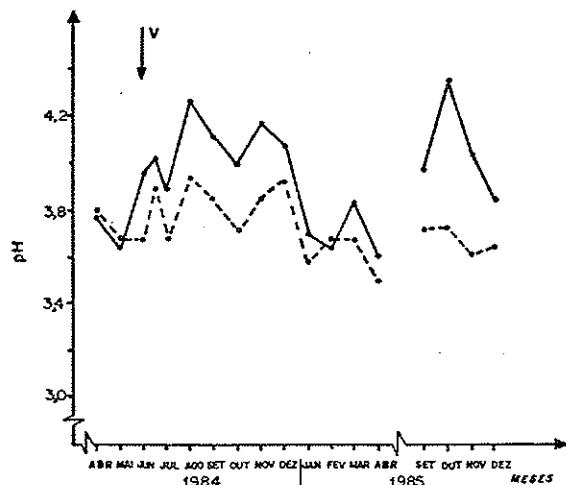


Figura 4 - Média do número de sacarolíticos/grama de solo (peso seco) sob cerrado com (—) ou sem (---) vinhaça (v)

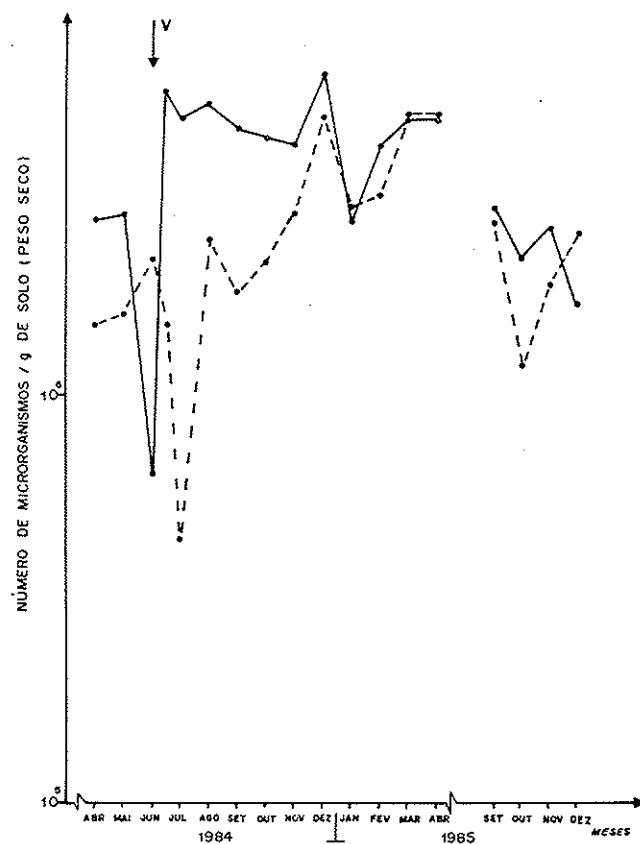
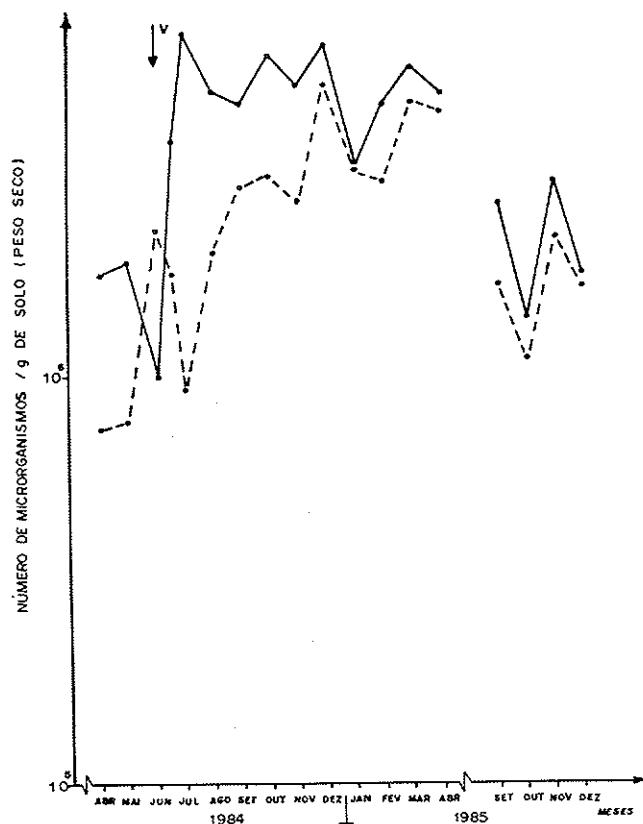


Figura 5 - Média do número de amilolíticos/ grama de solo (peso seco) sob cerrado com (—) ou sem (---) vinhaça (v)



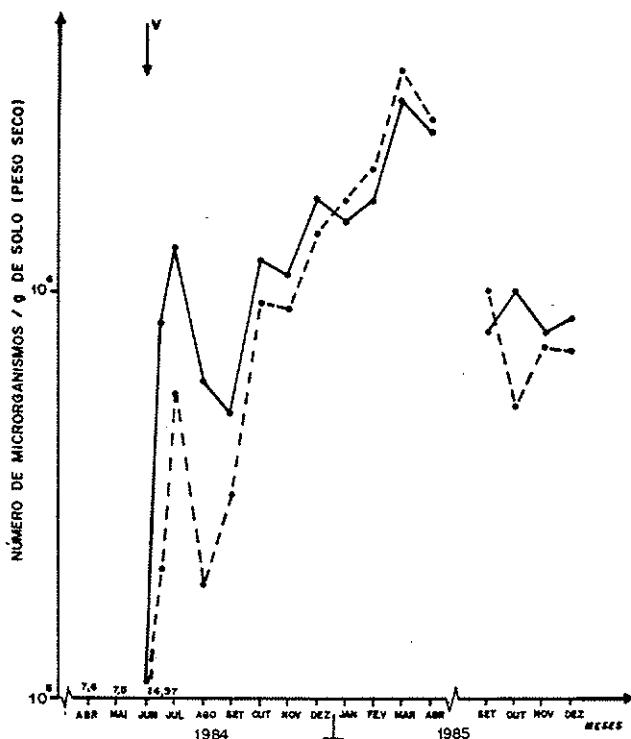
O teor de matéria orgânica do solo sob cerrado, da área de estudo, situou-se próxima daquelas citadas para 48% dos solos sob cerrado do Brasil (25).

Com a adição do resíduo, verificou-se aumento significativo dos organismos capazes de crescer em meio contendo sacarose, como única fonte de carbono, ocorrendo variação sazonal destes organismos e uma interação da sazonalidade com o resíduo e com o número destes microrganismos no solo (Tabela 2). Nas amostras de solo, coletadas logo após a adição da vinhaça, houve diminuição significativa destes organismos (Figura 4). As mesmas observações foram encontradas para a comunidade dos microrganismos capazes de crescer em meio contendo amido, como única fonte de carbono (Figura 5 e Tabela 2), excetuando que o menor número destes foi observado em período diferente.

O tamanho da comunidade dos organismos capazes de crescer em meio com CMC, como única fonte de carbono (Figura 6), aumentou com adição da vinhaça, sendo observada ainda variação sazonal e interação da adição do resíduo, sazonalidade e número de microrganismos (Tabela 2). As adições do resíduo realizadas na área de estudo (10) e aquelas citadas no presente trabalho, junho de 1984 e de 1985, não foram suficientes para aumentar, definitivamente, o número desses organismos no solo, sendo este efeito temporário, permanecendo até três ou quatro meses, após a adição da vinhaça no solo.

A observação das placas revelou que nos três grupos nutricionais houve predominância de fungos, talvez devido aos pH dos meios utilizados ou pelo fato da

Figura 6 - Média do número de celulolíticos/grama de solo (peso seco) sob cerrado com (—) ou sem (---) vinhaça (v)



vinhaça aumentar significativamente os fungos no solo (10). A utilização de meio com pH baixo 4,1 ou 4,6 foi proposta devido ao solo em estudo, ter sido citado com pH muito ácido (10), fato este observado nos resultados aqui encontrados (Figura 3).

As variações sazonais das densidades das comunidades microbianas (Tabela 2) podem ter sido resultados das interações da umidade, pH e vinhaça. Isto porque tem sido citado que a umidade, temperatura e teores de substratos energéticos podem participar das variações das densidades microbianas (12, 17).

Durante um ano, abril/1984 a abril/1985 demonstrou-se que a vinhaça adicionada ($20\text{g/m}^2/\text{ano}$) anteriormente na área (1981-1983) provocou aumento significativo do número de microrganismos capazes de crescer em amido ou sacarose, como única fonte de carbono. Nova adição do resíduo (junho/1984), mesmo em dose maior (50g/m^2) acarretou o mesmo efeito, aumentando ainda o número de microrganismos capazes de crescer em CMC, entretanto este efeito foi temporário. Em 1985, com outra dose do resíduo (50g/m^2) houve também aumento do número destes microrganismos, porém para alguns, este efeito continuou sendo temporário.

Comparando-se o número de microrganismos encontrado (Figuras 4 a 6) verificou-se que este foi menor nos meses de outubro e novembro de 1985, quando comparou-se com aquele encontrado nos mesmos meses de 1984.

Os fungos mais frequentes encontrados nas placas de Petri contendo somente sacarose como fonte de carbono, foram: *Trichoderma*, *Verticillium*, *Chaetomium*, *Penicillium* e *Aspergillus*. Os mesmos foram identificados em meios contendo amido, excetuando o gênero *Verticillium* e aqueles que desenvolveram em meio com CMC foram predominantemente: *Trichoderma* e *Aspergillus*.

Referências Bibliográficas

1. Alexander, M. - *Introduction to soil microbiology*. New York, John Wiley & Sons, 1977.
2. Almeida, J.R. - O problema da vinhaça em São Paulo. *Bol. do Inst. Zimotécnico, ESALQ, Piracicaba*, 1952.
3. Almeida, C.L.F. de; Oliveira, J.B. de & Prado, H. do - Levantamento pedológico semidetalhado do Estado de São Paulo: Quadricula de São Carlos, escala 1:100000. *Campinas, Instituto Agronômico*, 1981.
4. Arruda, H.C. de - Aplicação econômica da vinhaça na adubação da cana-de-açúcar. *Bol. do Inst. Agronômico de Campinas*, 144:27, 1957.
5. Barnedtt, H.L. & Hunter, B.B. - *Illustrated genera of imperfect fungi*. Minneapolis, Burgess Publ., 1972.
6. Barron, G.L. - *The genera of hyphomycetes from soil*. New York, Robert E. Krieger, 1972.
7. Berquo, E.S.; Souza, J.M.P. de & Gotlieb, S.L.D. - *Bioestatística*. São Paulo, Editora Pedagógica e Universitária, 1980.
8. Caldas, H.E. - Os fenômenos microbiológicos nos solos tratados com caldas de destilaria. *Bol. Técnico do Inst. Agronômico do Nordeste (Recife)*, 10:41-82, 1960.
9. Clark, F.E. - Agar-plate method for total microbial count. In: - *Methods of soil analysis. Part 2 - Chemical and microbiological properties*. Madison, Wisconsin, American Society of Agronomy, p.1460-1466, 1965.
10. Costa, S.M.G. da - Efeito da adição da vinhaça na microflora do solo de cerrado, da região de Corumbataí, SP. Rio Claro, Inst. de Biociências UNESP, 1983. (Dissertação de Tese de Mestrado).
11. Coutinho, L.M. - O conceito de cerrado. *Rev. Bras. Bot.*, 1:17-23, 1978.
12. Domergues, Y. & Mangenot, F. - *Écologie microbienne du sol*. Paris, Masson, 1970.
13. Glória, N.A. da - Utilização agrícola da vinhaça. *Brasil Açuc.*, 86:397-403, 1975.
14. Guimarães, E.; Betke, E.G. & Bassinello, J.L. - Determinação da dose econômica da vinhaça na adubação da cana-de-açúcar. O solo (Piracicaba), LX:87-91, 1968.
15. Haag, H.P.; Orlando Filho, J.; Sarruge, J.R.; Zambello Junior, E. & Rosseto, A. - Utilização da vinhaça em solo argiloso e composição química da cana-de-açúcar. O solo, 72:5-9, 1980.
16. Larpent, J.P. & Larpent-Gougand, M. - *Microbiologia prática*. São Paulo, Edgard Blucher, 1975.
17. Laudelout, H.; Lambert, R. & Pham, M.L. - Variation saisonnière de la population microbienne du sol. *Rev. Écol. Biol. Sol.*, 15:147-158, 1978.
18. Lima, D.M.M.; Costa, V.S. & Lima, J.A. de - Incidência de actinomycetales em solos agrícolas. Inst. de Micologia, Univ. Fed. de Pernambuco, Publicação 673, 1971.
19. Magro, J.A. - Uso da vinhaça em cana-de-açúcar na Usina de Pedra Serrana. *Brasil Açuc.*, 92:40-48, 1978.
20. Mclean, R.C. & Cook, W.R.I. - *Practical field ecology: a guide for the botany departments of universities, colleges and schools*. London, George Allen & Urwin, 1968.
21. Monteiro, R. & Aulino, O. - Clima e balanço hídrico em uma reserva de cerrado no município de Corumbataí. II Seminário Regional de Ecologia São Carlos, UFSCAR: resumos, 1981.
22. Neves, M.C.P.; Lima, I.T. & Dobereiner, J. - Efeito da vinhaça sobre a microflora do solo. *Rev. Brasileira de Ciência do Solo (Campinas)*, 7:131-136, 1983.
23. Pereira, J. & Kage, H. - Manejo da matéria orgânica em solos de cerrado. In: - IV Simpósio sobre o Cerrado. São Paulo, EDUSP, p.581-594, 1979.
24. Ribeiro, A.C.; Novais, R.F. de & Castro, A.F. - Efeito da vinhaça sobre a dispersão de argila de amostras de latossolos. *Rev. Ceres (Viçosa, M.G.)*, 167:12-18, 1983.

25. Rocha, G.L. da - Possibilidade de utilização das terras de cerrado para pastos. Ciência e Cultura, 29:1000-1005, 1977.
26. Rodella, A.A. & Ferrari, S.E. - A composição da vinhaça e efeitos de sua aplicação como fertilizante na cana-de-açúcar. Brasil Açuc., 90:6-13, 1977.
27. Santos, G.A.; Rossiello, R.O.P.; Fernandes, M.S. & O'Grady, P.C.O. - Efeitos da vinhaça sobre o pH do solo, a germinação e o acúmulo de potássio em milho. Pesq. Agrop. Bras., 16:489-493, 1981.
28. Silva, G.M.A. de - Aplicação de vinhaça como fertilizante de solo para cana-de-açúcar. Monografia apresentada no Curso de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, ESALQ, Piracicaba: mimeografadas, 1979.
29. Sokal, R.R. & Rohlf, F.J. - Biometry. San Francisco, W.H. Freeman, 1969.

CRESCIMENTO E ESPORULAÇÃO DE BEAUVÉRIA BASSIANA EM VÁRIOS MEIOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Ely Nahas
 & Neuza Naomi Shiomatsu Arai (Estagiária)

Deptº de Microbiologia
 Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
 de Jaboticabal UNESP
 Campus de Jaboticabal
 14870 Jaboticabal SP, Brasil

Resumo

O fungo entomógeno *Beauveria bassiana* foi cultivado em condições em que se variou a composição e o teor de umidade do meio de cultura de incubação e a luminosidade para se determinar as condições ótimas de crescimento e esporulação. A medida do diâmetro da colônia, após 10 dias de cultivo, decresceu nos vários meios de cultura ensaiados na seguinte ordem: Pontecorvo, farelo de arroz, Tedders, farinha de crisálidas, farelo de trigo, farelo de soja, Czapeck e Sabouraud. Nos meios de farelo de trigo e de Pontecorvo foram produzidos cerca de 13×10^9 e 11×10^9 esporos por placa de cultivo, respectivamente. Esses valores são duas a sete vezes maiores que os encontrados nos outros meios. Meio de cultura de farelo de trigo com níveis crescentes de umidade favoreceu o crescimento, mas reduziu a esporulação. Temperatura de incubação de 25°C e regime de luz alternada foram mais efetivos para esporulação. Porém, o crescimento micelial foi melhor à temperatura de 25°C e na ausência de luz.

Summary

Growth and sporulation of Beauveria bassiana in different media and culture conditions

The entomogenous fungus *Beauveria bassiana* was cultured in different conditions in which the composition and humidity levels of the culture medium, temperature and photoperiod of incubation were varied to determine their effects on growth and sporulation. The diameter of the colonies, after 10 days of cultivation, decreased in the various culture media assayed in the following order: Pontecorvo, rice bran, Tedders, chrysalis flour, wheat bran, soybean bran, Czapeck and Sabouraud. About 13×10^9 and 11×10^9 spores/culture Petri dish in the wheat bran and Pontecorvo media, were produced respectively. These values are two to seven times greater than those obtained on other media. Wheat bran culture medium with increasing humidity levels was favorable to growth, but not to sporulation. Temperature of incubation of 25°C and alternated light regime were most effective for sporulation. However, the micelial growth was better at temperature of 25°C and in absence of light.

Introdução

A infecção causada pelo fungo *Beauveria bassiana* no bicho-da-seda foi demonstrada, Rev. Microbiol., São Paulo, 18(1):77-82, Jan./Mar. 1987.

pela primeira vez em 1835 por Bassi (2). Dentre os muitos estudos realizados, destacam-se os de patogenicidade contra vários insetos (11,20) e seu cultivo em meios naturais ou sintéticos, visando a produção de micélio e de esporos. Neste aspecto, Campbell & col. (9) verificaram que as melhores fontes de nitrogênio são o triptofano e a alanina e, em seguida, glutamina, nitrato de potássio, fenilalanina e leucina. Smith & Grula (17) demonstraram que *B. bassiana* pode requerer para germinação uma fonte de carbono utilizável, como glicose, N-acetilglicosamina, glicosaminas ou alguns ácidos graxos de cadeia longa e, para continuar o crescimento, uma fonte de nitrogênio representada por compostos inorgânicos ou orgânicos. Sansináková (18) mostrou a influência da variação da fonte de carbono e nitrogênio e de sais minerais sobre o crescimento e esporulação de *B. bassiana*. Kucera (12) estudou o efeito de várias peptonas, tendo mostrado que várias delas induzem tanto o crescimento como a esporulação. Entretanto, com *Metarrhizium anisopliae*, alguns substratos naturais como arroz cozido (3, 6) ou mistura de farinha de trigo e de milho (8) têm sido recomendados. Ainda nesse sentido, verificou-se que o meio de cultura à base de semolina-ágar favoreceu a esporulação de *B. bassiana* (20). Em adição, condições de luminosidade e de pH mostraram influir no crescimento e na esporulação desses fungos (7, 20). No presente trabalho, foram investigadas algumas condições relativas ao crescimento e à esporulação de *B. bassiana* tendo em vista o seu uso em controle biológico.

Material e Métodos

Organismo - *Beauveria bassiana*, isolado de larvas de bicho-da-seda, foi identificado segundo a descrição de MacLeod (13) e através de crescimento em meio de cultura seletivo (10).

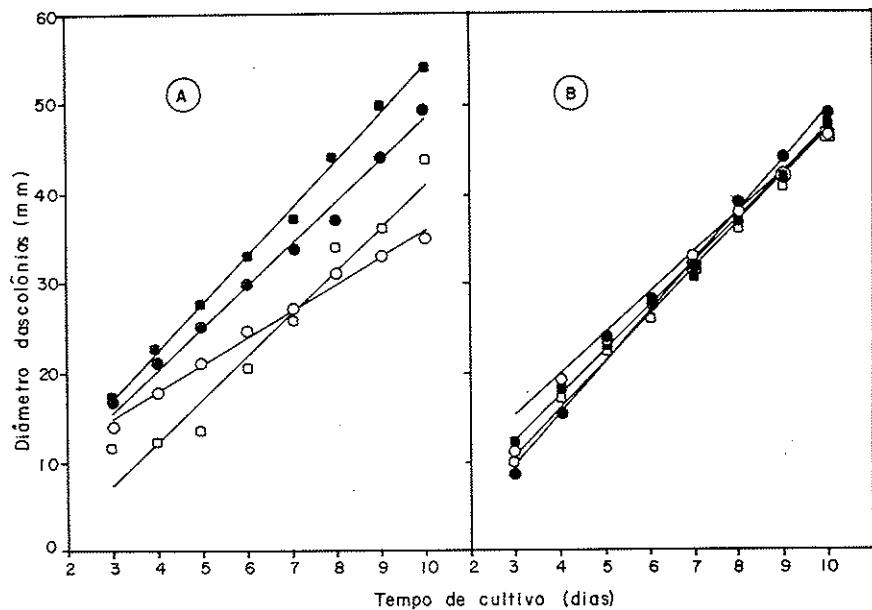
Inóculo e inoculação dos meios - Cultura estoque do fungo foi mantida em Sabouraud a 4°C. Antes de cada ensaio, o fungo foi transferido para o Sabouraud e incubado a 30°C, por 10 dias. Suspensões de esporos foram preparadas em 5ml de solução de "Tween" 80 (0,1% v/v) e agitadas. As suspensões foram então ajustadas para cerca de 10^8 /ml, após contagem em câmara de Neubauer. Nos ensaios de crescimento, 0,01ml da suspensão foi adicionado a discos de papel de filtro esterilizado, de 6mm de diâmetro e colocados no centro de placas, de 7cm de diâmetro contendo meio de cultura. Alternativamente, nos ensaios de esporulação, 0,2ml de suspensão de esporos foram distribuídos no meio sólido e incubados a 30°C por 10 minutos.

Meios de cultura - Os meios semi-sintéticos utilizados foram os de Czapecz-Dox (1), Sabouraud (1), Tedders (19) e Pontecorvo (15) com pH ajustado para 6,0 e acrescidos de 1,5% de ágar. Farelos de arroz, soja e trigo e crisálidas de bicho-de-seda trituradas, foram utilizados como meios de cultura naturais. Esses farelos foram utilizados na concentração de 3% (p/v), contendo 1,5% de ágar e pH 6,0. Foram autoclavados e distribuídos em placas de Petri. Alternativamente, quando não mencionado, uma mistura de farelo de trigo-água na proporção de 10:12 (p/v) foi preparada e 5g dessa mistura foram distribuídos em placas de Petri de 7cm de diâmetro e autoclavados.

Avaliação do crescimento e produção de esporos - O diâmetro da colônia foi medido diariamente, com régua milimetrada. A contagem do número de esporos foi feita em câmara de Neubauer. Para isso, a cultura de cada placa de Petri foi transferida para um recipiente com o auxílio de 100ml de água destilada e então agitada por 2 minutos para obter a suspensão onde se procedeu a contagem.

Análise estatística - Foi realizada através de delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições (14). Para análise da variância, foi utilizado o teste F ao nível de probabilidade de 1%. As retas de crescimento foi aplicado o teste F para coincidência e teste F para paralelismo. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

Figura 1 - Efeito de diversos meios de cultura semi-sintéticos (A) e naturais (B) sobre o crescimento de *B. bassiana*. Meios de cultura: (-o-) Sabouraud e farelo de soja; (-●-) Tedders e farelo de arroz; (-□-) Czaapeck e farelo de trigo; (-■-) Pontecorvo e farinha de crisálidas



Resultados e Discussão

Na tentativa de se obter melhores condições de crescimento e esporulação de *B. bassiana*, diversos substratos e condições de cultivo foram ensaiados.

Nos meios de Sabouraud, Tedders, Czaapeck e Pontecorvo (Figura 1A) o diâmetro das colônias variou, no 10º dia de cultivo, de 34 a 53mm. Quando houve substituição desses meios semi-sintéticos por meios naturais (Figura 1B), constituídos por farelo de soja, farelo de trigo, farelo de arroz ou farinha de crisálida, o diâmetro variou de 46 a 49mm. O meio de Pontecorvo foi o que favoreceu o mais rápido crescimento, cerca de 53mm (10º dia de cultivo). Porém os meios naturais (exceto o farelo de soja) superaram o crescimento apresentado pelos demais meios semi-sintéticos ensaiados.

Além dos componentes comuns a outros meios semi-sintéticos, o meio de Pontecorvo inclui extrato de levedura, caseína hidrolisada, vitaminas e ácidos nucléicos. É possível que alguns desses componentes tenham contribuído para o crescimento inicial do fungo nos meios naturais em velocidade comparável à observada no meio de Pontecorvo. Além do mais, Barnes & col. (4) e Roberts (16) demonstraram que *B. bassiana* pode responder de modo diverso em função a diferentes fontes de peptona.

O efeito dos diferentes meios de cultura

Tabela 1 - Esporulação de *Beauveria bassiana* em meios de cultura semi-sintéticos e naturais

Meios de cultura	Nº de esporos x 10³
Sabouraud	1,91
Czaapeck	2,81
Tedders	6,04
Pontecorvo	11,31
Farelo de arroz	3,65
Farelo de soja	3,84
Farelo de trigo	13,41
Farelo de crisálidas	4,60

experimentados sobre a esporulação ocorreu de modo diverso ao do crescimento. Assim, os meios de farelo de trigo e de Pontecorvo favoreceram a produção do maior número de esporos, respectivamente, $13,4 \times 10^9$ e $11,3 \times 10^9$ esporos/placa de cultivo (Tabela 1). Esses valores correspondem a duas a sete vezes a mais do que os encontrados nos outros meios empregados, dos quais diferiram significativamente ao nível de 5%. Esses resultados foram corroborados por Tonet & Reis (20), quando usaram seis meios de cultura semi-sintéticos e naturais, e obtiveram maior produção de esporos no meio de semolina-ágar. Também, Bastos & col. (8) tiveram melhor esporulação nos meios em que a farinha de trigo entrou na composição.

Campbell & col. (9) sugeriram que *B. bassiana* apresentaria maior esporulação em resposta à sobrevivência nas condições onde a fonte de nitrogênio fosse pouco satisfatória ao crescimento. Porém, isto não foi observado neste trabalho uma vez que maior crescimento micelial foi observado nos meios de Pontecorvo e de farelo de trigo. Por outro lado, outro ponto de especulação relaciona-se com a fonte de peptona adicionada ao meio de cultura, que pode influenciar a esporulação como foi demonstrado por Barnes & col. (4).

Os requerimentos de altos níveis de umidade para crescimento micelial também foram observados em *B. bassiana*, em meio de cultura à base de farelo de trigo (Figura 2). Com o teor de umidade de 29% (p/v), obteve-se um diâmetro de colônias de 13,3mm e com 97% (p/v), de 47,0mm, o que representa um acréscimo de aproximadamente 3,5 vezes ao crescimento do fungo. Porém, como se observa na Figura 3 um aumento no teor de umidade não corresponde a um aumento no número de esporos. O teor de umidade de 55% (p/v) foi o que propiciou o maior índice de esporulação com uma média de $51,7 \times 10^9$ esporos/placa. Abaixo ou acima desse teor de umidade, houve redução do número de esporos. Foi observado que com os teores de umidade reduzidos, o crescimento do fungo ocorreu não só na superfície do substrato, mas também no meio da massa. Então é possível que também essa condição tenha contribuído para a maior esporulação.

Tanto o crescimento (Figura 4) como a esporulação (Figura 5) de *B. bassiana* foram favorecidos pela temperatura de 25°C. Após 10 dias de cultivo, foi verificado na colônia um diâmetro de 29,5mm e $44,4 \times 10^9$ esporos/placa. Temperaturas maiores que

Figura 2 - Efeito do teor de umidade no crescimento de *B. bassiana*. Teor de umidade: 29% (-■-); 38% (-□-); 44% (-○-); 55% (-△-) e 97% (-●-)

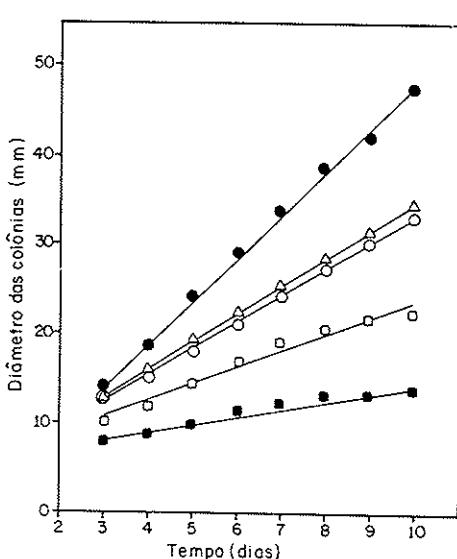


Figura 3 - Efeito do teor de umidade na esporulação de *B. bassiana*

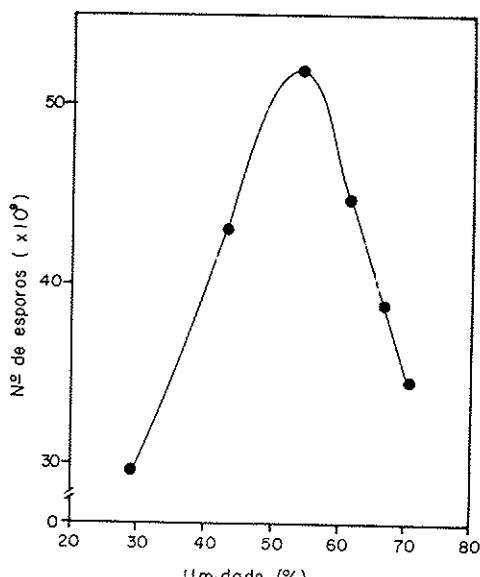


Figura 4 - Efeito da temperatura de incubação no crescimento de *B. bassiana*. Temperaturas: (-o-) 20°C; (-■-) 25°C; (-●-) 30°C e (-□-) 35°C

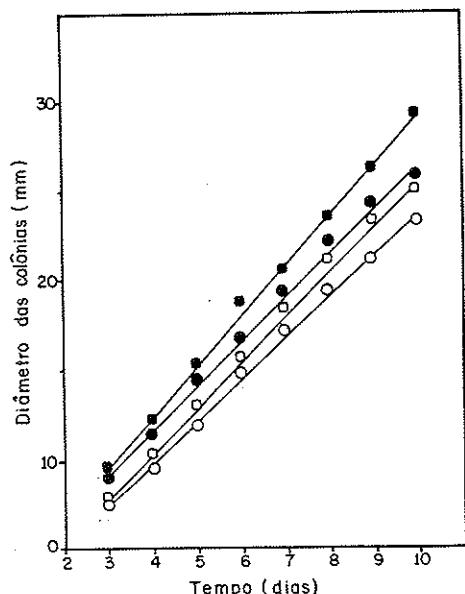


Tabela 2 - Efeito de diferentes regimes de luz na esporulação de *B. bassiana*

Regime de luz	Nº de esporos x 10 ⁹
Escuro contínuo	20,46
Luz contínua	30,74
Luz alternada	48,41

o ótimo (30 e 35°C) ou menores (20°C) reduziram tanto o crescimento como a esporulação como demonstra o teste de Tukey ao nível de 5%. À temperatura de 40°C, o fungo não apresentou crescimento. Resultados semelhantes foram encontrados em *Metarrhizium anisopliae* (7).

Os ensaios conduzidos para se avaliar o efeito da luz sobre o crescimento e a esporulação mostraram que os regimes de escuro contínuo e luz alternada foram os que propiciaram maior velocidade de crescimento (Figura 6) quando comparados

Figura 5 - Efeito da temperatura de incubação na esporulação de *B. bassiana*

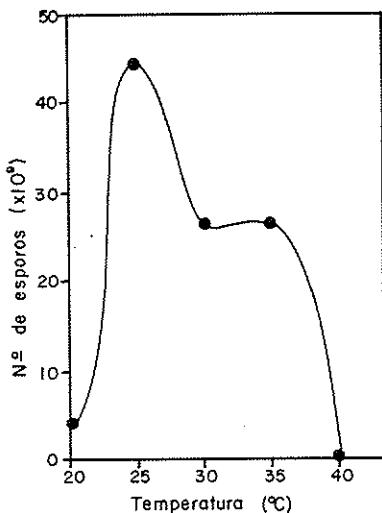
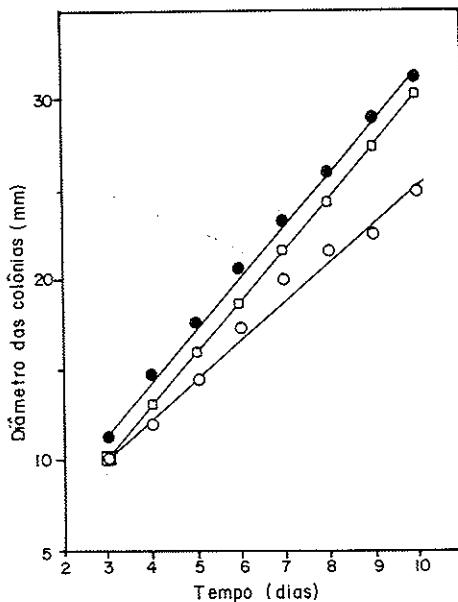


Figura 6 - Efeito da luz sobre o crescimento de *B. Bassiana*. Regimes: (-o-) luz contínua; (-□-) luz alternativa e (-●-) escuro contínuo



com o regime de luz contínua, apresentando diferença significativa ao nível de 5% pelo teste de Tukey. Por outro lado, o regime de luz alternada favoreceu a produção de cerca de $48,4 \times 10^9$ esporos/placa (Tabela 2), o que corresponde a 1,6 a 2,4 vezes mais do que os resultados obtidos sob os outros regimes de luz. Conforme Barnett & Lilly (5), a alternância de luminosidade favorece determinadas reações que ocorrem somente na presença ou ausência de luz. Os resultados deste trabalho e de outros (8, 20) estão de acordo com os obtidos por esses autores.

Referências Bibliográficas

1. Aaronson, S. - Experimental microbial ecology. New York, Academic Press, 1970.
2. Anderson, R.F. & Ignoffo, C.M. - Microbial insecticides. In: - Peppler, H.J. - Microbial technology. New York, Reinhold Publishing, p.172-182, 1967.
3. Aquino, M.L.; Cavalcanti, V.A.L.B.; Sena, R.C.; Queiroz, G.F. - Nova tecnologia de multiplicação do fungo *Metarrhizium anisopliae*. Recife, CODECAP, Bol.4, 1975.
4. Barnes, H.L.; Boethel, D.J.; Eikenbary, R.D.; Criswell, J.T. & Gentry, C.R. - Growth and sporulation of *Metarrhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on media containing various peptone sources. J. Invert. Pathol., 25:301-305, 1975.
5. Barnett, H.L. & Lilly, V.G. - Nutritional and environmental factors influencing assexual sporulation of *Choanephora cucumeritacrum* in culture. Phytopathol., 40:80-89, 1950.
6. Bastos, C.N. - Metodologia para produção e acondicionamento do fungo *Metarrhizium anisopliae* (Metchn) Sorok., em larga escala. Bol. Inst. Biol. da Bahia (Salvador), 15:1-4, 1976.
7. Bastos, C.N. & Matta, E.A.F. - Influência das temperaturas e luz na esporulação do fungo *Metarrhizium anisopliae* (Metchn.) Sorok. Bol. Inst. Biol. da Bahia (Salvador), 15:5-8, 1976.
8. Bastos, C.N.; Matta, E.A.F.; Figueiredo, J.M. - Esporulação de *Metarrhizium anisopliae* (Metchn.) Sorok., em meios de cultura de diferentes composições. Bol. Inst. Biol. da Bahia (Salvador), 15:9-11, 1976.
9. Campbell, R.K.; Perring, T.M.; Barnes, G.L.; Eikenbary, R.D. & Gentry, C.R. - Growth and sporulation of *Beauveria bassiana* and *Metarrhizium anisopliae* on media containing various amino acids. J. Invert. Pathol., 31:289-295, 1978.
10. Doberski, J.M. & Tribe, H.T. - Isolation of entomogenous fungi from elm bark and soil with reference to ecology of *Beauveria bassiana* and *Metarrhizium anisopliae*. Trans. Br. Mycol. Soc., 74(part 1):95-100, 1980.
11. Dunn, P.H. & Mechala, B.J. - The potential of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin as a microbial insecticide. J. Insect. Pathol., 5:451-459, 1963.
12. Kucera, M. - Toxins of the entomophagous fungus *Beauveria bassiana*. II - Effect of nitrogen sources on formation of the toxic protease in submerged culture. J. Invert. Pathol., 17:211-215, 1971.
13. MacLeod, B.M. - Investigations on the genera *Beauveria* Vuill. and *Tritirachium* Limber. Can. J. Bot., 32:818-890, 1954.
14. Pimentel Gomes, F. - Curso de estatística experimental. 3.ed. Piracicaba, ESALQ, 1966.
15. Pontecorvo, G.; Roper, J.A.; Hemmons, L.M.; Donald, K.D. & Bufton, A.W.J. - The genetics of *Aspergillus nidulans*. Adv. Genetic, 3:142-238, 1953.
16. Roberts, D.W. - Toxins from the entomogenous fungus *Metarrhizium anisopliae*: production in submerged and surface cultures, and in inorganic and organic nitrogen media. J. Invertebr. Pathol., 8:212-221, 1966.
17. Smith, R.J. & Grula, E.A. - Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. J. Invert. Pathol., 37:222-230, 1981.
18. Sanšináková, A. - Growth and sporulation of submerged cultures of the fungus *Beauveria bassiana* in various media. J. Invert. Pathol., 8:395-400, 1966.
19. Tedders, W.L. - In vitro inhibition of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarrhizium anisopliae* by six fungicides used in Pecan culture. Environ. Entomol., 10:346-349, 1981.
20. Tonet, G.L. & Reis, E.M. - Patogenicidade de *Beauveria bassiana* em insetos-pragas da soja. Pesq. Agropec. Bras., 14:89-95, 1979.

INFLUÊNCIA DE FATORES DE NITROGÊNIO NO DESENVOLVIMENTO DE DUAS LINHAGENS DE *ASPERGILLUS NIDULANS*

Geraldo Sérgio Oliva da Fonseca Netto
 & Yoko Bomura Rosato

Deptº de Genética e Evolução
 Instituto de Biologia UNICAMP
 13081 Campinas SP, Brasil

Resumo

Influência de duas fontes de nitrogênio, nitrato e amônia, no crescimento vegetativo, conidiação e produção de cleistotécios em duas linhagens de *Aspergillus nidulans*. As duas fontes de nitrogênio foram utilizadas em concentrações molares de $10^{-1}M$ à $10^{-4}M$. O crescimento vegetativo, medido pela biomassa em peso seco foi maior à concentração de $10^{-1}M$ de amônia, sugerindo-se portanto, esta fonte de nitrogênio como micelio gênica. A conidiação foi também maior com amônia, mas com uma menor demanda de nitrogênio, sendo o valor máximo atingido à concentração de $10^{-2}M$. A produção de cleistotécios apresentou respostas mais abruptas sendo mais sensível as variações na concentração. De forma geral as duas linhagens apresentaram respostas semelhantes nos diferentes meios de cultura.

Summary

Influence of nitrogen source on development of two strains of Aspergillus nidulans

Influence of two nitrogen sources, nitrate and ammonium, on the vegetative growth, conidiation and cleistothetiation in two strains of *Aspergillus nidulans*. The vegetative growth, measured as dry weight, was higher in the ammonium medium at $10^{-1}M$ concentration, as was the conidiation but at a lower concentration ($10^{-2}M$). The cleistothecia production showed sharper results indicating greater sensibility to variations in concentration. In general both strains showed similar results in the different culture media utilized.

Introdução

Aspergillus nidulans é um fungo filamentoso que apresenta várias características favoráveis para estudos de desenvolvimento e diferenciação. Cresce rapidamente em meios de cultura definidos, possui estruturas de diferenciação relativamente simples que se formam em momentos definidos e pode ser submetido à análise genética e bioquímica com facilidade. Dentre os aspectos da diferenciação a conidiação é a primeira e principal manifestação e esta tem sido analisada sob o aspecto genético (3, 9) e molecular (6, 14). Além do controle genético sabe-se que condições nutricionais são importantes para promover ou retardar o processo de diferenciação (2, 5) e entre os componentes analisados, mais frequentemente está a fonte de carbono.

O presente trabalho teve por finalidade verificar a influência da fonte de nitrogênio no crescimento vegetativo, conidiação e produção de cleistotécios em

duas linhagens diferindo apenas no locus "velvet" (*ve*). O fenótipo apresentado por estes mutantes já foi previamente descrito (7) e estão relacionados principalmente com a conidiação e produção de cleistotécios.

Material e Métodos

Linhagens - Foram utilizadas as linhagens R-21 (*yA2*, *pabaA6*, *veA+*) provenientes da Universidade de Leicester e WIN 12 (*yA2*; *pabaA6*; *ve-*), obtidas de S.P. Champe da Universidade de Rutgers, N.J. Ambas apresentam conídios amarelos, são deficientes para ácido p-aminobenzóico e diferem apenas com relação ao locus "velvet".

Meios de cultura - Foi utilizado o meio mínimo descrito por Cove (4) para todos os testes, com nitrato de sódio ou tartarato de amônia como fontes de nitrogênio nas concentrações de 10^{-1} à 10^{-6} M. Para manutenção das linhagens foi utilizado o meio mínimo adicionado de caseína, vitaminas e extrato de leveduras (4).

Produção de conídios - Foi quantificada de acordo com Yager & col. (16), usando-se placas de crescimento confluente com três dias de incubação. Amostras de área circular de 0,9cm de diâmetro foram coletadas destas placas, homogeneizadas, filtradas e plaqueadas.

Produção de cleistotécios - Foram utilizadas placas de crescimento confluente com 14 dias de incubação. Secções circulares de 0,9cm de diâmetro foram retiradas, umedecidas com clorofórmio e os cleistotécios contados individualmente sob lupa Zweiss.

Crescimento vegetativo - Foi avaliado através de peso seco, crescendo-se as linhagens em meio de cultura líquido (30ml) com agitação (180rpm) durante 72 horas, 37°C. O inóculo foi preparado em "Tween 80" e a concentração final de conídios foi aproximadamente 10^6 conídios/ml. Após crescimento o micélio foi filtrado, lavado, colocado para secagem e pesado.

Resultados e Discussão

Apesar das diferenças apresentadas pelas linhagens *ve+* e *ve-* os resultados aqui obtidos mostram que a resposta das duas linhagens com nitrato ou amônia como fontes de nitrogênio é muito semelhante. Há um ponto ótimo coincidente para cada uma das fases: crescimento vegetativo, conidiação e produção de cleistotécios (Tabela 1).

O crescimento vegetativo é superior na linhagem WIN12; os maiores valores de peso seco são atingidos à concentração de 10^{-1} M de nitrato ou amônia para ambas as linhagens. Os valores vão decrescendo à medida que a concentração de nitrogênio disponível vai diminuindo, efeito semelhante ao provocado pela glucose como fonte de carbono (5). O maior crescimento observado com amônia pode estar relacionado com aumento geral na síntese de proteínas, devido à maior utilização de amônia, observado em linhagens auxotróficas para biotina (12). Neste caso teríamos que admitir que a auxotrofia para ácido p-aminobenzóico confere uma alteração na permeabilidade celular, o que não foi testado no presente caso. Meios de cultura contendo amônia em substituição a nitrato também têm sido sugeridos como miceliogênicos em *Neurospora* (15), prevenindo a conidiação. Em outros casos não provoca nenhum efeito no crescimento e frutificação (10) ou é considerado indutor de mudanças morfogenéticas (13). No presente caso, a conidiação é também superior com amônia, mas com uma demanda menor. Estes resultados podem ser devidos à maior taxa de produção de conidióforos que é maior com amônia do que com nitrato (11). O tipo de sal de amônia utilizado parece ser extremamente importante porque radicais do tipo cloreto por exemplo, produzem resultados danosos tanto para o crescimento vegetativo como conidiação, devido provavelmente ao baixo pH que se forma (dados não apresentados). A produção de cleistotécios, por outro lado, parece ser mais sensível às variações na concentração de nitrogênio sendo produzidos apenas em

Tabela 1 - Efeito de NO_3 e NH_4 em diferentes fases do desenvolvimento.

Símbolos: * = mg de peso seco/20ml de meio. Média de 3 repetições;
 ** = N° de conídios/Seção de 0.9cm diâmetro. Média de 3 repetições;
 *** = N° de cleistotécios/Seção de 0.9cm diâmetro. Média de 3 repetições

Concentração/ linhagens	Fase do desenvolvimento					
	Crescimento vegetativo*		Conidição**		Cleistoteciação***	
	WIN12	R-21	WIN 12	R-21	WIN12	R-21
NO_3 / 10^{-1}M	119.6	108.9	2.2×10^{11}	4.0×10^{10}	659.0	297.4
	10^{-2}M	102.2	6.7×10^{10}	3.4×10^{11}	890.7	327.3
	10^{-3}M	24.6	1.5×10^9	2.3×10^8	0.5	0.3
	10^{-4}M	7.4	6.3×10^7	5.3×10^7	1.4	0.3
NH_4 / 10^{-1}M	191.3	149.1	3.7×10^6	2.7×10^6	0.2	0.0
	10^{-2}M	105.05	148.5	5.9×10^{12}	2.7×10^{12}	577.5
	10^{-3}M	46.9	33.6	7.6×10^{10}	5.1×10^{10}	0.7
	10^{-4}M	10.8	8.5	5.9×10^7	8.6×10^7	0.0

algumas concentrações. A linhagem R-21 apresentou cleistotécios de tamanho reduzido e distribuídos dentro da massa micelial de forma heterogênea tanto em meio de nitrato como de amônia, apresentando uma formação em meio de amônia. Por outro lado, a linhagem WIN12 (ve+) apresentou melhor formação de cleistotécios em meio de nitrato sendo observados cleistotécios maiores e distribuídos principalmente sobre a superfície. A produção e a viabilidade dos ascosporos não foi verificada, entretanto, o uso de oxalato de amônia em substituição a nitrato tem sido considerado como favorecendo a produção de ascosporos (1, 8).

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq (Proc. 40.0233/82) pelo auxílio financeiro concedido.

Referências Bibliográficas

1. Acha, I.J. & Villanueva, J.R. - A selective medium for the formation of ascospores by *Aspergillus nidulans*. Nature (London), 189:328, 1961.
2. Anderson, J.G. & Smith, J.E. - The production of conidiophore and conidia by newly germinated conidia of *Aspergillus niger*. J. Gen. Microbiol., 69:185-197, 1971.
3. Axelrod, D.E.; Gealt, M. & Pastushock, M. - Gene control of developmental competence in *Aspergillus nidulans*. Develop. Biol., 34:9-15, 1973.
4. Cove, D.J. - The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. Bioch. Bioph. Acta, 113:51-56, 1966.
5. Crebelli, R. & Bandiera, M. - Short cycle conidiation in *Aspergillus nidulans*. Biol. Rev., 54:291-327, 1983.
6. Gwynem, D.J.; Miller, B.L.; Miller, K.Y. & Timberlake, W.E. - Structure and regulated expression of the *SpoCl* gene cluster from *Aspergillus nidulans*. J. Mol. Biol., 180:91-109, 1984.
7. Kafer, E. - Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*. Genetics, 52:217-232, 1958.
8. Leal, J.A. & Villanueva, J.R. - An improved selective medium for the formation of ascospores by *Aspergillus nidulans*. Nature (London), 193-1106, 1962.

9. Martinelli, S.D. & Clutterbuck, A.J. - A quantitative survey of conidiation mutants of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.*, 69:261-268, 1971.
10. Niederpruem, D.J. & Welles, J.G.H. - Cytodifferentiation and morphogenesis in *Schizophyllum communae*. *Bacteriol. Rev.*, 33:505-535, 1969.
11. Pastushock, M. & Axelrod, D.E. - Effect of glucose, ammonium and maintenance media on the time of conidiophore initiation by surface colonies of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.*, 94:221-224, 1976.
12. Rao, K.K. & Modi, V.V. - Effect of ammonium ions on the growth of *Aspergillus nidulans*. *Experientia*, 26:590-591, 1970.
13. Schindler, J. & Sussman, M. - Ammonia determines the choice of morphogenetic pathways in *Dictyostellium discoideum*. *J. Mol. Biol.*, 116:161-169, 1977.
14. Timberlake, W.E. & Barnard, E. - Organization of a gene cluster expressed specifically in the asexual spores of *Aspergillus nidulans*. *Cell*, 26:29-37, 1981.
15. Turian, G. - Synthetic conidiogenous media for *Neurospora crassa*. *Nature (London)*, 202:1240, 1964.
16. Yager, L.N.; Kurt, M.B. & Champe, S.P. - Temperature shift analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Develop. Biol.*, 93:92-103, 1982.

APLICAÇÃO DA RADIAÇÃO GAMA NA DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA MICROBIANA DE UM SOLO INCORPORADO COM VINHAÇA*

Marli Teixeira de Almeida Minhoní

Deptº de Defesa Fitossanitária
Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu
Campus de Botucatu
18600 Botucatu SP, Brasil

& Carlos Clemente Cerri

Seção de Fertilidade do Solo
Centro Nacional de Agricultura CENA
13400 Piracicaba SP, Brasil

Resumo

A dose de 25 KGy foi aplicada a solo incorporado com vinhaça, incubado em condições de laboratório, no escuro e a $25\pm2^{\circ}\text{C}$, por período de 3 meses. A umidade do solo foi mantida a 40, 60 e 80% da capacidade de retenção de água. A incorporação de vinhaça quadruplicou a biomassa microbiana do solo, a qual apresentou leitura somente após um certo grau de decomposição do resíduo incorporado. A radiação gama, como agente biocida utilizado, parece ter afetado algumas propriedades do solo.

Summary

Gamma radiation application for microbial biomass determination in a soil incorporated with distillery wastewater

Gamma radiation at 25 KGy was applied to a soil amended with distillery wastewater, for microbial biomass determination. In the laboratory conditions soils samples were incubated at $25\pm2^{\circ}\text{C}$, under dark conditions, for period of three months. Soil humidity was maintained at 40, 60 and 80% of water hold capacity. Residue incorporation quadruples the microbial biomass which was determinated only after a certain degree of decomposition of incorporated residue. Gamma radiation, as biocidal agent seems to have affected some soil properties.

Introdução

Quando um resíduo orgânico é adicionado ao solo, os microrganismos ali presentes têm a sua população aumentada (1, 10). O que pode ser medido direta ou indiretamente. Os métodos diretos gerais incluem a contagem total de microrganismos ao microscópio óptico, a contagem de células viáveis e as lâminas de Rossy-Cholodny (9). Entre os indiretos, cita-se o cálculo da biomassa microbiana, baseado na evolução de CO_2 do solo (8). É um método recente, que está se tornando conhecido e aplicado por alguns pesquisadores, muito embora a evolução de CO_2 do solo nem sempre se correlacione com o número de microrganismos ou com a intensidade dos processos bioquímicos do solo (5).

* Parte do trabalho de tese apresentada pelo primeiro autor, ESALQ/USP, junho de 1983. Suporte financeiro CNEN e CNPq.

O método está fundamentado no aumento de velocidade de decomposição do carbono orgânico, em decorrência de tratamentos biocidas e, embora existam várias teorias que poderiam explicar tal aumento, Jenkinson (6) concluiu ser devido, na sua maior parte, à decomposição de organismos mortos pelo agente biocida e que assim, poderia ser usado como uma medida aproximada da biomassa microbiana do solo.

A técnica em si, consiste nos seguintes passos: a) o solo é dividido em dois grupos de iguais repetições; b) um grupo é submetido ao agente biocida, inoculado com amostra de solo natural e incubado; e c) o outro grupo é apenas incubado.

O cálculo para a biomassa microbiana é dado pela relação $B = (X-Y)/K$, onde: B = biomassa, em g C/g solo; X = carbono evoluído do solo tratado com o agente biocida; Y = carbono evoluído do solo não tratado.

O fator K representa a fração de carbono da biomassa morta que é decomposta para CO_2 , durante 10 dias de incubação, considerando-se que nem todo carbono é mineralizado para CO_2 , parte dele não será atacado e parte será incorporado nos microrganismos responsáveis pelo aumento de evolução de CO_2 . Ademais, este varia com a espécie microbiana, pH e aeração do solo (6).

Porém, Jenkinson (7) comenta que os resultados para a leitura da biomassa microbiana não são muitos confiantes para solos que receberam grandes adições de matéria orgânica prontamente decomponível.

Neste contexto, Sparling & col., em 1981, citados por Martens (11), encontraram estimativas anormais e até mesmo negativas para a biomassa microbiana quando feitas em solos recentemente adicionados com matéria orgânica.

A vinhaça, resíduo em estado coloidal rico em carboidratos, é rotineiramente aplicado ao solo canavieiro. Sendo assim, o presente trabalho tem por objetivos estudar uma variante do método proposto por Jenkinson & Powlson (8) a um solo incorporado com vinhaça, utilizando-se a radiação gama como agente biocida, e discutir alguns aspectos metodológicos possivelmente envolvidos no processo.

Material e Métodos

A amostra de solo corresponde aos primeiros 20cm de profundidade de um latossolo vermelho-amarelo fase-arenosa, da região de Piracicaba (SP). Utilizou-se a fração peneirada a 2,00mm, caracterizada com pH 4,9, 0,73% de carbono orgânico, 0,10% de nitrogênio e 21,1% de argila.

A vinhaça incorporada ao solo foi proveniente de caldo misto, com as seguintes características:

O/Brix.....	8,75	C/N.....	21,89
C (%).....	12,70	Fe ($\mu\text{g}/\text{mL}$).....	1.931,60
N (%).....	0,58	Cu ($\mu\text{g}/\text{mL}$).....	5,63
K (kg/m^3)....	3,43	Mn ($\mu\text{g}/\text{mL}$).....	116,20
P (kg/m^3)....	2,85	Zn ($\mu\text{g}/\text{mL}$).....	76,20
Ca (kg/m^3)...	6,62	B ($\mu\text{g}/\text{mL}$).....	1,30
Mg (kg/m^3)...	3,98	Na ($\mu\text{g}/\text{mL}$).....	401,50
S (kg/m^3)....	0,52	Al ($\mu\text{g}/\text{mL}$).....	100,00
DQO ($\mu\text{g O}_2/\text{l}$)....	25.400,00		

Para determinação da biomassa microbiana, partiu-se de 40g de solo seco a 105°C TFSA, colocado em frascos de vidro de 140ml e pipetou-se 15ml de vinhaça; dose correspondente à aplicação, em campo, de 200m³/ha.

As umidades foram corrigidas para 40, 60 e 80% da capacidade de retenção de água (c.r.a.), em estufa a 45°C, com circulação de ar forçada.

Em virtude da elevada relação C/N do resíduo (22/1), fez-se uma complementação nitrogenada equivalente a 38kg N/ha, cada frasco recebendo 23,6mg de sulfato de amônio.

Como testemunhas, foram preparados frascos incorporados com 15ml de água, ao invés de vinhaça, com umidade corrigida para 60% da c.r.a.

A incubação inicial das parcelas deu-se em condições de laboratório, mantendo-se os frascos abertos, em ambiente escuro e a 25±2°C.

Para quantificar a biomassa microbiana, adotou-se uma variação do método proposto por Jenkinson & Powlson (8). Nos tratamentos com vinhaça, quatro frascos eram submetidos à irradiação com raios gama, seguida de inoculação com uma amostra (em mg) de solo natural e incubados; outros quatro frascos eram apenas incubados nas mesmas condições.

Para os frascos testemunhas, trabalhou-se com apenas duas repetições, ou seja, dois frascos foram irradiados e dois não.

A dose de irradiação gama correspondeu a 25 KGy, com Irradiador de Cobalto-60 tipo Gammabeam 650, com uma atividade de $4,10^{14}$ Bq (no início do trabalho).

Cada frasco com solo foi colocado no interior de jarros de vidro (com capacidade de 3l) juntamente com 20ml NaOH 1N. Tampava-se hermeticamente e incubava-se novamente no escuro a 25±2°C.

Após 10 dias de incubação, precipitava-se a soda com solução aquosa saturada de cloreto de bário e titulava-se a soda livre com HCl 0,1N, usando-se três gotas de fenolf taleína como indicador. Determinava-se assim, a quantidade de carbono evoluída do solo usando-se a equação: $\text{mgC} = (\text{HCl branco} - \text{HCl parcela}) \cdot \frac{\text{NHCl}}{\text{NaOH}} \cdot 6$.

Em seguida, aplicava-se os dados assim obtidos, na equação da biomassa microbiana. Nesta equação, adotou-se o valor 0,41 para o constante K, de acordo com os dados de Anderson & Domsch (3).

A biomassa microbiana foi quantificada aos 0, 5, 11, 15, 33, 60 e 88 dias.

Resultados e Discussão

Para a testemunha, a biomassa microbiana manteve-se praticamente constante ($69\mu\text{gC/g solo seco}$) durante todo o período de incubação. Este resultado era esperado, uma vez que não foi adicionado material orgânico ao sistema.

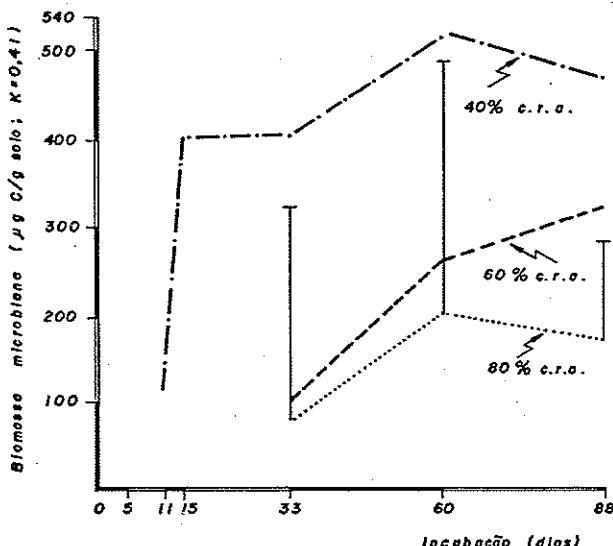
A Figura 1 apresenta os resultados obtidos na quantificação da biomassa microbiana para os tratamentos com vinhaça.

Nestes tratamentos, a biomassa aumentou com a incubação e esse aumento foi maior quanto mais seco o solo. Sob condições de excesso de umidade, o baixo nível de O_2 condiciona o metabolismo microbiano anaeróbico (14), onde a formação de massa celular por unidade de carbono oxidado é menor (1, 13).

Comparando-se os tratamentos com e sem vinhaça, mantidos a 60% da c.r.a., nota-se que a incorporação de vinhaça ao solo quadruplicou a biomassa microbiana.

Porém verifica-se que, nos tratamentos com vinhaça a 40 e 60 ou 80% da c.r.a., os resultados para biomassa microbiana iniciaram-se somente após 11 e 33 dias de incubação, respectivamente (Figura 1). Ou seja, não foram obtidas leituras nos tempos 0 e 5 dias e 0, 5, 11 e 15 dias para esses tratamentos, respectivamente,

Figura 1 - Biomassa microbiana ($\mu\text{gC/g solo}$) formada nos tratamentos com vinhaça (média de 4 repetições), em função do tempo e da umidade do solo, e DMS (teste Tukey a 1%) para cada tempo de incubação estatisticamente analisado. Símbolos: c.r.a. = capacidade de retenção de água



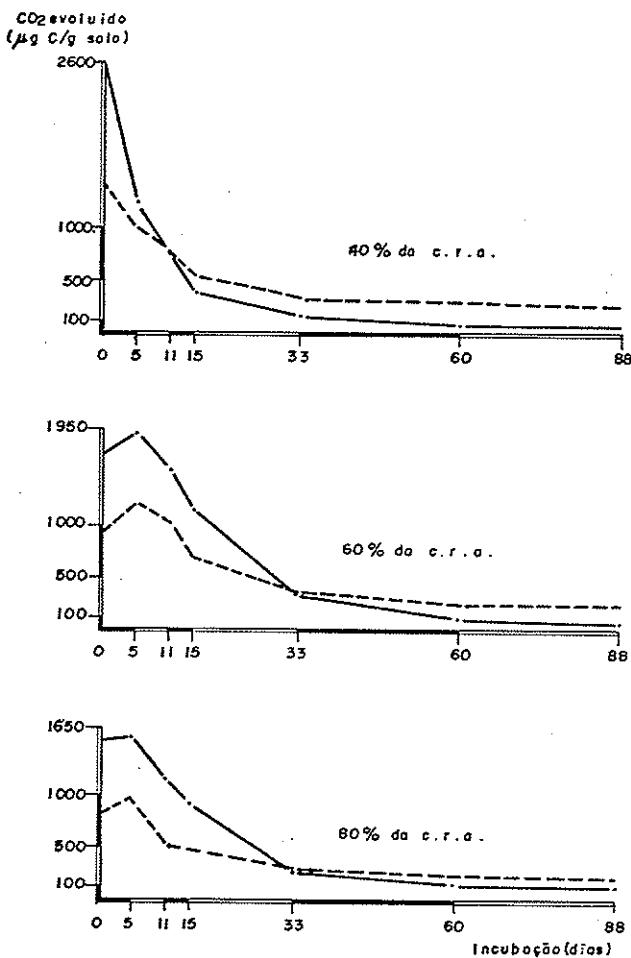
devido à inversão na evolução de CO_2 do solo, quando são examinados os resultados da evolução de carbono nos solos irradiado e não irradiado (Figura 2).

Nos períodos anteriormente citados, de ausência de leitura para a biomassa microbiana, os solos irradiados tiveram menor desprendimento de CO_2 que os solos não irradiados.

Embora pudessemos justificar o menor desprendimento de CO_2 devido a não formação de biomassa microbiana suficientemente grande para superar a sensibilidade do método; era de se esperar que as evoluções de carbono fossem, no mínimo, semelhantes para ambos os casos.

Com respeito à ausência de leitura de biomassa microbiana, convém ressaltar que Jenkinson & Powlson (8) limitam a metodologia de tal modo que não deve ser aplicada para solos que receberam elevadas doses de material orgânico prontamente decomponível.

Figura 2 - CO_2 evoluído ($\mu\text{g C/g solo}$) do solo irradiado (---) e não irradiado (—) dos tratamentos com vinhaça (média de 4 repetições). Símbolos: c.r.a. = capacidade de retenção de água



Neste aspecto, as leituras tornam-se válidas somente após um certo grau de decomposição do material, quando então, a evolução de CO₂ é mais vagarosa (11).

Ademais, pode-se inferir que, para o presente experimento, a dose de 25 KGy de radiação gama tenha alterado alguma função ou propriedade do solo com vinhaça, tal como a formação de substâncias tóxicas (12).

Mas, a ausência de leitura da biomassa microbiana pode ser também devida ao ataque preferencial da população de inóculo sobre o substrato vinhaça, ao invés da biomassa microbiana morta pelo agente biocida (1), assim como à incapacidade da população reinoculada nas parcelas fumigadas em degradar o substrato tão rapidamente quanto à das parcelas não fumigadas (11).

O NaOH utilizado foi suficiente para a captura do volume de CO₂ evoluído das parcelas, ou seja, não ocorreram perdas de CO₂. Por outro lado, contaminações do NaOH com CO₂ externo ao experimento também não ocorreram, tal como foi verificado através dos controles com jarros que receberam apenas o NaOH.

A radiação gama foi utilizada como agente biocida, em contraposição aos processos de autoclavagem e fumigação com clorofórmio adotados por Jenkinson & Powlson (8), por ser um processo que não altera quimicamente o solo (12) e ademais, para o presente experimento, a defumigação do solo não foi perfeita, especialmente para as parcelas mais úmidas.

O método de fumigação do solo com clorofórmio para se estimar a biomassa microbiana, fundamenta-se na diferença de evolução de CO₂ entre as parcelas fumigadas e as não fumigadas. Essa diferença na evolução de CO₂ é considerada como sendo devida à decomposição da biomassa inicial que foi morta pelo clorofórmio.

Muitas controvérsias surgiram quanto à esta metodologia, especialmente com relação ao fator K e assim, muitos autores adotam a respiração do solo como parâmetro para avaliar a biomassa microbiana do solo (15).

A determinação da biomassa microbiana dos solos é extremamente interessante, podendo ser utilizada em estudos de decomposição de materiais orgânicos, estudos de pesticidas nos solos, assim como avaliar o nível nutricional dos mesmos, considerando-se que a biomassa microbiana é reserva e fonte de elementos tais como o N, P e K, por exemplo (2, 11, 15).

Conclusões

A conclusão, nas condições do presente experimento e em função dos resultados obtidos, são de que a metodologia para a leitura da biomassa foi perfeitamente aplicável ao solo incorporado com vinhaça, porém, os resultados apareceram somente quando o resíduo já se apresentava com certo grau de decomposição; a radiação gama parece ter alterado alguma propriedade do solo incorporado com vinhaça.

Referências Bibliográficas

1. Alexander, M. - *Introduction to soil microbiology*. 4.ed. New York, John Wiley, 1967.
2. Anderson, J.P.E. & Domsch, K.H. - A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 10:215-221, 1978.
3. Anderson, J.P.E. & Domsch, K.H. - Mineralization of bacteria and fungi in chloroform-fumigated soils. *Soil Biol. Biochem.*, 10:207-213, 1978.
4. Cochrane, V.W. - *Physiology of fungi*. New York, John Wiley, 1958.
5. Imshenetskii, A.A. & Murzakov, B.G. - Determination of carbon dioxide evolved from soil of differing moisture. *Microbiology (Engl. Transl. Mikrobiologiya)*, 46:885-889, 1979.
6. Jenkinson, D.S. - Studies on the decomposition of plant material in soil. II - Partial sterilization of soil and the soil biomass. *J. Soil Sci.*, 17:280-302, 1966.
7. Jenkinson, D.S. - The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. IV - The decomposition of fumigated organisms in soil. *Soil. Biol. Biochem.*, 8:203-208, 1976.

8. Jenkinson, D.S. & Powlson, D.S. - The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. V - A method for measuring soil biomass. *Soil Biol. Biochem.*, 8:209-213, 1976.
9. Johnson, L.F.; Curl, E.A.; Bond, J.H. & Fribourg, H.A. - Methods for studying soil microflora-plant disease relationship. Minneapolis, Burgess Publishing, 1959.
10. Kiehl, E.J. - Efeitos da matéria orgânica sobre as propriedades do solo. *Anais do Simpósio sobre Fertilizantes Orgânicos*, São Paulo, IPT/FINEP/ESALQ, p.3-18, 1984.
11. Martens, R. - Limitations in the application of the fumigation technique for biomass estimations in amended soil. *Soil Biol. Biochem.*, 17:57-63, 1985.
12. McLaren, A.D. - Radiation as a technique in soil biology and biochemistry. *Soil Biol. Biochem.*, 1:63-73, 1969.
13. Parr, J.F. - Chemical and biological considerations for land application of agricultural land municipal wastes. In: - Parr, J.F. - *Organic materials as fertilizers*. FAO, p.251-277, 1975.
14. Ponnamperuma, F.N. - The chemistry of submerged soils. *Adv. Agronomy*, 24:29-96, 1972.
15. Smith, J.L.; McNeal, B.L. & Cheng, H.H. - Estimation of soil microbial biomass: an analysis of the respiratory response of soils. *Soil Biol. Biochem.*, 17:11-16, 1985.
16. Winsor, G.W. & Pollard, A.G. - Carbon-nitrogen relationship in soil. I - The immobilization of nitrogen in the presence of carbon compounds. *J. Sci. Food Agric.*, 7:139-141, 1956.

ISOLAMENTO DE YERSINIA SP. EM ALIMENTOS DIVERSOS

Mariza Landgraf

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

& Deise Pasetto Falcão

Deptº de Ciências Bio-Clinicas
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP
 Rua Expedicionários do Brasil, 1621
 14800 Araraquara SP, Brasil

Resumo

Yersinia sp. foi pesquisada em 138 amostras de alimentos, assim distribuídas: 30 amostras de leite cru, 33 de leite pasteurizado, 15 de carne moída, 15 de fígado de boi, 15 de fígado de suíno e 30 amostras de alface, todas coletadas ou adquiridas na região da cidade de Araraquara, Estado de São Paulo. Foram isoladas: *Y. enterocolitica* de diferentes sorotipos e *Y. intermedia* 5,27/Xz em 9,1% das amostras de leite pasteurizado; em 3,3% das de alface, *Y. intermedia* NAG/Xz; em 20% das de carne moída *Y. enterocolitica* (cellobiose, sacarose, sorbitol-, citrato+)/25/Xz e *Y. intermedia* de diversos sorotipos, e, em 13,3% das amostras de fígado bovino, *Y. intermedia* também de diferentes sorotipos. Não se isolou *Yersinia* sp. de leite cru e fígado suíno. Apesar de nenhuma das cepas isoladas pertencer a sorogrupo reconhecidamente patogênicos, a presença dessa bactéria nesses alimentos, mantidos sob refrigeração, deve ser vista com restrição, uma vez que cepas de sorotipos de *Y. enterocolitica* consideradas não patogênicas estão se adaptando ao homem.

Summary

Isolation of Yersinia spp. from foods

The presence of *Yersinia* spp. was examined in thirty-three samples of pasteurized milk, thirty samples of raw milk, fifteen samples of ground beef, fifteen samples of bovine fresh liver, fifteen samples of pork fresh liver, and thirty samples of lettuce. All samples were collected in the Araraquara city area, State of São Paulo, Brazil. Different types of *Y. enterocolitica*, and *Y. intermedia* 5,27/Xz were isolated from pasteurized milk samples (9,1%); *Y. intermedia* NAG/Xz was isolated from lettuce (3,3%) and *Y. enterocolitica* (cellobiose, sacharose, sorbitol-, citrate+)/25/Xz and *Y. intermedia* of different types were isolated from ground beef. No isolation was achieved from pork liver and raw milk. Although the isolated types of *Yersinia* spp. belong to non-pathogenic serological groups, their presence in refrigerated food, make us to believe that their pathogenic potential must be discussed since some serotypes of *Y. enterocolitica* and other species are adapting to man.

Introdução

Cepas de *Yersinia* sp. tem sido isoladas de materiais clínicos humanos e de animais, bem como, da água e de alimentos. Entre estes últimos destacam-se o leite cru e pasteurizado, sorvetes, bolos com e sem creme, carnes bovina e suína, e vegetais (3, 5, 11, 12, 20). No Brasil isolou-se o microrganismo de leite (5, 21), carne (21) e de amostras de águas de origens diversas (10).

Alguns surtos de gastrite humana por *Yersinia enterocolitica* tiveram como via de transmissão leite achocolatado (2), leite pasteurizado (17) e "tofu" (18).

Yersinia enterocolitica com os sorotipos 0:3, 0:8 e 0:9 é que está mais relacionada com doenças no homem. Os demais sorotipos de *Y. enterocolitica* e as espécies *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii* e *Y. intermedia*, são consideradas como oportunistas embora, recentemente, tenham sido relatados alguns casos de infecção humana por sorotipos considerados não patogênicos (8, 14).

O fato de se utilizar a temperatura de refrigeração como técnica de enriquecimento para *Yersinia*, torna o microrganismo um problema para a indústria de alimentos, pois seu crescimento em alimentos refrigerados além de ser um risco para a Saúde Pública poderá provocar a deterioração dos mesmos.

Neste estudo pretende-se verificar a incidência de bactérias do gênero *Yersinia* em amostras de alimentos diversos, na cidade de Araraquara, SP.

Material e Métodos

Obtenção das amostras - Foram analisadas 138 amostras de alimentos assim distribuídas: 30 amostras de leite cru coletadas diretamente do úbere de vacas, pertencentes a cinco produtores da região de Araraquara, durante os meses de junho e julho de 1983; 33 amostras de leite pasteurizado adquiridos em supermercados da cidade no mesmo período; 15 amostras de carne moída, 15 de fígado de boi, 15 de fígado suíno e 30 amostras de alface, sendo todas adquiridas em supermercados da cidade de Araraquara, no período de dezembro de 1983 a janeiro de 1984.

Técnica de enriquecimento - 1. Homogeneizavam-se 25ml ou 25g de amostra com 225ml de tampão de fosfatos, pH7,6 adicionado de 1% de sorbitol (Difco) e 0,15% de sais biliares nº 3 (Difco), com incubação a 4°C até 21 dias (19); 2. Homogeneizavam-se 25ml ou 25g em 225ml de caldo de soja tripticase (Difco) adicionado de novobiocina sódica (Upjohn) na concentração de 10µg/ml e sulfato de polimixina B (Pfizer) na concentração de 5UI/ml, com incubação a 18°C por 3 dias (15).

Isolamento e identificação - Após 7, 14, 21 dias do enriquecimento a frio e 3 dias do enriquecimento a 18°C, procediam-se a dois isolamentos diferentes:

1. Semeava-se diretamente uma alçada em ágar Mac Conkey (Difco); 2. uma alçada do caldo de enriquecimento era submetida ao tratamento com KOH (Merck) (1) e semeada em placas contendo ágar MacConkey. Nos dois processos de isolamento as placas eram incubadas a 25°C por 48 horas.

As colônias suspeitas de *Yersinia* sp. no meio seletivo eram transferidas para ágar tríplice açúcar ferro (Difco) e incubadas a 25°C por 48 horas. Após esse período, transferia-se para os meios de Mili, EPM (9) e citratos de Simmons que eram incubados a 37°C por 24 horas. As colônias com características de *Yersinia* sp. nesses meios eram então identificadas quanto ao biotipo, sorotípo e fagotípo (6).

Resultados

Y. enterocolitica de sorotipos diversos e *Y. intermedia* foram isoladas de leite pasteurizado, alface, carne moída e fígado bovino. Esses resultados são apresentados na Tabela 1.

As 30 amostras de leite cru e 15 de fígado de suíno apresentaram-se negativas para essa pesquisa.

Tabela 1 - Características das amostras de *Yersinia* sp. isoladas de alimentos diversos.

Símbolos: a. Ye Tipo = *Y. enterocolitica* - sorotipo/biotipo/fagotipo; b. Yi Tipo = *Y. intermedia* - sorotipo/fagotipo; c. NAG = Não aglutinável; d. (cel, sac, sor-, cit+) = (celobiose, sacarose, sorbose-, citrato+)

Alimentos	Nº de amostras analisadas	Nº de amostras positivas (%)	Nº da amostra	Ye Tipo ^a	Yi Tipo ^b
Leite pasteurizado	33	3 (9,1)	21	1/5/Xz	
			31/10 Kb	2/7,8/Xz	
			31	1/5/Xz	
			32		5,27/Xz
Alface	30	1 (3,3)	9		NAG ^c /Xz
Carne moída	15	3 (20,0)	3	(cel, sac, sor-, cit+)/25/Xz	
			3		25,35/Xz
			8		13,7/Xz
			7		27/Xz
Fígado bovino	15	2 (13,3)	13		14/Xz
			15		16,29/Xz

Discussão

Analizando-se os dados relativos à presença de *Yersinia* em leite pasteurizado, chama-se a atenção para o fato de terem sido encontradas, numa mesma amostra, duas cepas de *Y. enterocolitica*, uma do tipo 2/7,8/Xz e outra 1/5/Xz.

Os resultados obtidos com as amostras de leite pasteurizado são próximos aos de Eiroa & col. (5) que isolaram *Y. enterocolitica* em 12% das amostras analisadas. Por outro lado, diferem dos de Warnken (21) que isolou, principalmente, *Y. frederiksenii* desse alimento.

A ausência de *Yersinia* sp. em leite cru deve-se, provavelmente, a maneira como se procedeu à coleta, uma vez que a mesma era feita do úbere da vaca.

Outros autores, quer no Brasil quer no exterior, isolaram o microrganismo de leite cru, coletando-o à nível de usina leiteira (5, 11, 20, 21).

Em alface, foi verificada a presença de *Y. intermedia* não aglutinável. Este é o primeiro isolamento de *Yersinia* de vegetais no Brasil.

A maior incidência de *Yersinia* foi observada em carne bovina moída (20% de positividade). Isolou-se, de uma mesma amostra, uma cepa de *Y. enterocolitica* com características bioquímicas atípicas, não podendo, portanto, ser enquadrada num dos biotipos já caracterizados, sorotipo 0:12,25 fagotipo Xz, e, outra *Y. intermedia* 0:13,7 Xz.

A presença de *Yersinia* em vários tipos de carne tem sido relatada por diversos autores entre eles Fukushima (12) e Hanna & col. (13). No Brasil, Warnken (21) isolou cepas de *Yersinia* de diversos tipos de carne moída, miúdos de galinha e bovinos, mas também não relacionados com tipos responsáveis por doenças humanas.

Em fígado bovino foram encontradas duas cepas de *Y. intermedia* enquanto que as amostras de fígado de suíno apresentaram-se negativas. Este fato chamou a atenção uma vez que se sabe que o porco é considerado um reservatório. As diferentes espécies de *Yersinia* já foram constatadas em diversos tipos de carne de porco em vários países (4, 12, 16). No Brasil, *Y. enterocolitica* 4/3/VIII foi isolada de fezes de suínos com diarréia (7).

Apesar de não se ter verificado a presença de cepas pertencentes a sorogrupo reconhecidamente patogênicos, o fato de se ter isolado *Yersinia* de alimentos mantidos sob refrigeração, como os que aqui foram estudados, leva-nos a questionar sobre o possível potencial patogênico, visto que alguns sorotipos de *Yersinia*

enterocolitica estão se adaptando ao homem, o mesmo podendo ocorrer com as amostras de *Yersinia* atípicas (8, 14).

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com recursos da FAPESP 81/873-1 e CPE UNESP.

Referências Bibliográficas

1. Aulizio, C.C.G.; Mehlman, I.J. & Sanders, A.C. - Alkali method for rapid recovery of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from foods. *Appl. Environm. Microbiol.*, 39:135-140, 1980.
2. Black, R.E.; Jackson, R.J.; Tsai, T.; Medvesky, M.; Shayegani, M.; Feeley, J.C.; Mac Leod, K.I.E. & Wakelee, A.M. - Epidemic *Yersinia enterocolitica* infection due to contaminated chocolate milk. *N. Eng. J. Med.*, 298:76-79, 1978.
3. Delmas, C.L. & Vidon, D.J.M. - Isolation of *Yersinia enterocolitica* and related species from foods in France. *Appl. Environm. Microbiol.*, 50:767-771, 1985.
4. Doyle, M.P.; Hugdahl, M.B. & Taylor, J.L. - Isolation of *Yersinia enterocolitica* from porcine tongues. *Appl. Environm. Microbiol.*, 42:661-666, 1981.
5. Eiroa, M.N.U.; Cullen, B.T.; Falcão, D.P. & Leitão, M.F.F. - *Yersinia enterocolitica* e *Yersinia* atípica em leite cru e pasteurizado. *Col. ITAL*, 14:27-37, 1984.
6. Falcão, D.P. - *Yersinia enterocolitica*. In: - Trabulsi, L.R. - Atualização em microbiologia clínica: microbiologia das infecções intestinais. Rio de Janeiro, Alheneu, p.79-89, 1981.
7. Falcão, D.P. - Présence de *Yersinia enterocolitica* et *Yersinia pseudotuberculosis* en Amérique Latine. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 12:5-10, 1981.
8. Falcão, D.P.; Shimizu, M.T. & Trabulsi, L.R. - Kinetics of infection induced by *Yersinia*. *Curr. Microbiol.*, 11:303-308, 1984.
9. Fontes, C.F. - Proposição de dois novos meios de cultura e de um sistema simplificado para identificação de enterobactérias. São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1979. (Tese Mestrado).
10. Freitas, A.C.; Nunes, M.P.; Falcão, D.P. & Ricciardi, I.D. - Ocorrência de *Yersinia* sp. em redutos aquáticos naturais localizados na cidade do Rio de Janeiro. In: - Resumos 36ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, USP, São Paulo, p.734, 1984.
11. Franzin, L.; Fantino, P. & Vidotto, V. - Isolation of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia enterocolitica*-like organisms from raw milk in Italy. *Curr. Microbiol.*, 10:357-360, 1984.
12. Fukushima, H. - Direct isolation of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from meat. *Appl. Environm. Microbiol.*, 50:710-712, 1985.
13. Hanna, M.O.; Zink, D.L.; Carpenter, Z.L. & Vanderzant, C. - *Yersinia enterocolitica*-like organisms from vacuum packaged beef and lamb. *J. Food Sci.*, 41:1254-1256, 1976.
14. Karmali, M.A.; Toma, S.; Schiemann, D.A. & Ein, S.H. - Infection caused by *Yersinia enterocolitica* serotype 0:21. *J. Clin. Microbiol.*, 15:596-598, 1982.
15. Landgraf, M.; Cullen, B.T. & Falcão, D.P. - Desenvolvimento de processo rápido e sensível de enriquecimento de *Yersinia* em alimentos. In: - Programa/Resumos 9º Congresso Latinoamericano Microbiol., São Paulo, Julho, 25-29, p.154, 1983.
16. Schiemann, D.A. & Latvala, M. - Toxigenic *Yersinia enterocolitica* in retail pork products. *J. Food Prot.*, 42:38, 1979.
17. Tacket, C.O.; Narain, J.P.; Satlin, R.; Lofgren, J.P.; Kunigsberg, C.; Rendtorff, R.C.; Rausa, A.; Davis, B.R. & Cohen, M.L. - A multistate outbreak of infection caused by *Yersinia enterocolitica* transmitted by pasteurized milk. *J. Am. Med. Assoc.*, 251:483-486, 1984.

18. Tacket, C.O.; Ballard, J.; Harris, N.; Allard, J.; Nolan, C.; Quant, T. & Cohen, M.L. - An outbreak of *Yersinia enterocolitica* infection caused by contaminated "tofu" (soybean curd). Am. J. Epidemiol., 121:705-711, 1985.
19. United States Food and Drug Administration - Bacteriological analytical manual for foods. 6.ed. Arlington, Assoc. Off. Anal. Chemists., p.11.01-11.14, 1984.
20. Vidon, D.J.M. & Delmas, C.L. - Incidence of *Yersinia enterocolitica* in raw milk in Eastern France. Appl. Environm. Microbiol., 41:355-359, 1981.
21. Warnken, M.B. - Ocorrência de *Yersinia* sp. em leite e carnes comercializados no Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia UFRJ, 1985. (Tese Doutoramento).

CONDICÕES HIGIÉNICO-SANITÁRIAS DO CHARQUE COMERCIALIZADO EM SÃO PAULO, BRASIL

Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco

Mariza Landgraf

Massami Shimokomaki

& Carmem Helena Moreno de Azevedo

Deptº de Alimentos e Nutrição Experimental

Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP

Caixa Postal 30786

01051 São Paulo SP, Brasil

Resumo

Foram avaliadas as condições higiênico-sanitárias de 39 amostras de charque comercializado em São Paulo, através da quantificação das bactérias mesófilas aeróbias e facultativas, das bactérias halófilas, dos coliformes totais e fecais e dos fungos. Foi também investigada a presença de *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, de clostrídios sulfito-redutores e de *Bacillus cereus*. Os resultados indicaram ausência de *Salmonella* e de clostrídio sulfato-redutores em todas as amostras. *S. aureus* foi detectado em 15,4% das amostras, em contagens inferiores a 10^2 UFC/g. *B. cereus* foi detectado em números significativos em 4 amostras, com contagens entre 10^4 e 10^6 UFC/g. Somente uma das amostras acusou presença de coliformes. Os mesófilos variaram entre 10^3 e 10^7 UFC/g, sendo que em 92% dos casos o nível de contaminação foi superior a 10^4 UFC/g. Resultados bastante próximos a estes foram obtidos na enumeração de halófilos. Entre os fungos, verificou-se predominância de leveduras, que variaram entre 10^1 e 10^4 UFC/g.

Summary

Hygienic quality of charqui

Charqui is a typical Brazilian dehydrated salted meat, which has 45% of moisture and Aw of 0,73. The microbiological quality of 39 samples of charqui purchased in São Paulo city, Brazil, was assessed by quantification of mesophilic aerobes, halophilic bacteria, total and fecal coliforms, and molds. The presence of *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, sulfite-reducing clostridia and *Bacillus cereus* was also carried out. Results showed absence of *Salmonella* and of sulfite reducing clostridia in the samples tested. *S. aureus* was detected in 15,4% of samples, with 10^2 CFU/g as a maximum level of contamination. *B. cereus* was detected in four samples (10^4 - 10^6 CFU/g). Only one sample showed the presence of coliforms. The counts of mesophilic aerobes varied from 10^3 to 10^7 UFC/g, and in 92% of samples the contamination level was over 10^4 CFU/g. Similar results were obtained with halophilic bacteria. There was great predominance of yeasts in relation to molds, and counts varied from 10^1 to 10^4 CFU/g.

Introdução

O charque é um produto cárneo seco e salgado, bastante consumido em todo o

Brasil. Constituído principalmente de carne bovina, é produzido de maneira bastante artesanal. A carne é desossada, e na forma de mantas, é salgada, inicialmente em salmoura e posteriormente com sal grosso. As mantas são empilhadas em contato com o sal durante vários dias. Após a remoção do excesso de sal através da lavagem com água clorada, as mantas são estendidas em varais para secagem ao sol, durante 3 ou 4 dias. Durante a noite, são empilhadas e cobertas com lonas. Nesta fase desenvolvem-se o odor e sabor característicos deste alimento (11). Obtem-se, assim, um produto cárneo que, segundo os Regulamentos do Ministério da Agricultura (RIISPOA), não deve conter mais de 45% de umidade na porção muscular, nem mais de 15% de resíduo mineral fixo, tolerando-se até 5% de variação (2). Posteriormente, o charque é embalado em sacos de aniação e distribuído ao comércio. Algumas charqueadas vêm empregando a embalagem à vácuo como recurso para aumentar a vida útil deste produto (11).

O alto teor de sal do charque, da ordem de 15%, bem como o alto teor lipídico da matéria-prima empregada na produção deste alimento, tornam-no um meio altamente desfavorável à multiplicação da maioria das espécies bacterianas. Entretanto, o uso de matéria-prima de qualidade microbiológica inadequada, bem como condições insatisfatórias de higiene durante e após o processamento, podem resultar num produto de elevada carga microbiana. Entre estes microrganismos adquirem importância os patogênicos, que apesar de não se multiplicarem, podem estar presentes em quantidades elevadas, e os microrganismos halófilos, tolerantes à 15% de sal. Estes microrganismos halófilos causam a deterioração do charque tendo particular importância os *Micrococci* (4), responsáveis por fermentações mucilaginosas cinzentas, acompanhadas de odores desagradáveis, e outras espécies que apresentam intensa atividade lipolítica, provocando a rancificação do charque (Franco, dados não publicados). *Halobacterium salinarum*, anteriormente conhecido por *H. cutirubrum* (3), é também um halófilo altamente prejudicial ao charque. Este microrganismo, um halófilo estrito, é causador do temível "vermelhão", que é uma deterioração caracterizada pelo surgimento de um induto vermelho, de odor repugnante característico (14).

A inexistência de padrões microbiológicos para o charque bem como o pouco conhecimento da qualidade microbiológica deste alimento levaram ao presente trabalho. Estudou-se o grau de contaminação do charque vendido em São Paulo com microrganismos mesófilos, halófilos, coliformes e fungos. Paralelamente, foi estudada a incidência de algumas bactérias patogênicas, como *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens*.

Material e Métodos

Obtenção e preparo das amostras de charque - 39 amostras de charque a granel, à venda em diferentes pontos de comercialização na cidade de São Paulo, Brasil, foram estudadas. 25g de cada amostra foram homogeneizados com 225ml de água tamponada estéril pH 7,2 (5), em liquidificador previamente esterilizado, preparando-se, em seguida, diluições decimais até 10^{-5} , utilizando-se o mesmo tampão. Para quantificação de bactérias halófilas, 25g de amostra foram homogeneizadas em tampão para diluição de halófilas seg. Barross (1), sendo também preparadas diluições decimais até 10^{-5} .

Contagens bacterianas - Bactérias mesófilas aeróbias e facultativas, coliformes totais e fecais, bolores e leveduras e clostrídios sulfito-redutores foram enumerados através da técnica de semeadura em profundidade, empregando-se aliquotas de 1ml de cada diluição, e utilizando-se os seguintes meios de cultura: ágar padrão para contagem (incubação a 35°C por 48h), ágar batata dextrose acidificado com ácido tartárico a pH 3,5 (incubação a 25°C durante 5 dias) e ágar sulfito polimixina sulfadiazina (incubação a 44°C durante 48h), respectivamente. Para a contagem de clostrídios efetuou-se a incubação em anaerobiose, utilizando-se o sistema Gaspak. *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* foram enumerados por técnica de semeadura em superfície empregando-se aliquotas de 0,1ml de cada diluição, e utilizando-se os meios de cultura Agar Baird Parker (incubação a 35°C

por 48h) e ágar vermelho fenol gema de ovo polimixina (incubação a 30°C por 48h), respectivamente.

Colônias suspeitas de *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* e de *Bacillus cereus* foram identificadas pelos testes bioquímicos propostos pelo ICMSP (5). A pesquisa de *Salmonella* foi feita em 25g do produto adicionados a 225ml de caldo lactosado, incubado a 35°C durante 24h, com posterior passagem para caldo tetratrationato e caldo selenito cistina incubados a 35°C durante 24h. O isolamento de colônias foi feito em ágar SS e ágar verde brilhante. Colônias suspeitas foram identificadas através dos testes bioquímicos de Enterokit C (Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda.), também utilizado para identificação dos coliformes. A enumeração de bactérias halófilas foi feita em ágar padrão para contagem acrescido de 15% de NaCl, com incubação a 20-25°C durante 4 dias, segundo APHA (1). Foram usados meios de cultura Difco e Merck.

Resultados

Nenhuma das amostras de charque revelou presença de *Salmonella* e contaminação com clostrídios sulfito-redutores. *S. aureus* foi isolado de apenas 6 amostras (15,4%), sempre com contagens entre 10^2 e 10^3 UFC/g. *B. cereus* foi isolado com frequência, porém sempre em contagens da ordem de 10^2 - 10^3 UFC/g, exceção feita a 2 amostras que apresentaram contagens da ordem de 10^4 UFC/g e a 2 com contagens em torno de 10^6 UFC/g. Coliformes, do gênero *Citrobacter*, foram detectados em apenas uma das amostras.

As contagens de bactérias mesófilas aeróbias e facultativas, de halófilas, bem como de fungos podem ser vistas nas Tabelas 1 e 2.

Discussão

A disponibilidade de água, que controla a multiplicação de microrganismos nos alimentos, é medida em termos de "atividade de água" (Aa), que, em um sistema em equilíbrio tem relação com a umidade relativa do alimento (17). A Aa de um alimento influencia não só a multiplicação e atividade metabólica de microrganismos, como também sua sobrevivência e resistência a agentes diversos. À medida que a Aa diminui, menor é o número de espécies bacterianas capazes de sobreviver ou se multiplicar (6). Vários recursos tecnológicos podem ser utilizados para a redução de Aa de alimentos. No caso do charque, efetua-se a desidratação da carne através da adição de sal e posterior secagem ao sol. Obtém-se, assim, um alimento de umidade intermediária, com valores de Aa da ordem de 0,73 (Shimokomaki, dados não publicados). Esta Aa é suficientemente baixa para comprometer a multiplicação e mesmo a sobrevivência das espécies bacterianas responsáveis por toxinfecções alimentares, inclusive de *S. aureus*, que tolera Aa de até 0,86 para sua multiplicação (6). Deste modo, os resultados relativos à baixa incidência ou mesmo ausência de patógenos na maioria das amostras de charque era, de certa forma, esperado.

É pouco provável que as contagens elevadas de *B. cereus*, detectadas em algumas amostras sejam consequência de sua proliferação, para a qual se faz necessária Aa mínima da ordem de 0,95 (13). Sua presença, assim como a de *S. aureus*, reflete condições inadequadas de higiene após o processamento, isto é, durante o armazenamento e a comercialização do charque. Por ser o *S. aureus* um microrganismo tolerante ao sal e por ser um patógeno frequentemente encontrado em manipuladores de alimentos (8) é também possível que a contaminação detectada tenha se originado durante o processamento, às vezes realizado em condições higiênicas bastante precárias. Além disso, o emprego de matérias-primas de qualidade microbiológica duvidosa pode ser a causa desta contaminação (16). Nestes casos, permanece a possibilidade de enterotoxinas terem sido produzidas durante as primeiras fases do processamento, quando a Aa limita para a sua produção ainda não foi atingida. Tais enterotoxinas não foram investigadas neste estudo, por isso não podemos garantir que o charque estudado não pudesse oferecer risco à saúde da população consumidora,

apesar da incidência pouco significativa dos demais patógenos.

O baixo teor de umidade do charque deve ter sido a causa da incidência praticamente nula de coliformes, sabidamente sensíveis aos teores de sal comuns neste alimento (3). Neste aspecto, estes resultados discordam dos encontrados no Rio de Janeiro (7), onde foram detectados coliformes na quase totalidade de amostras de charque investigadas, através da técnica dos tubos múltiplos. A diversidade de metodologia laboratorial pode ser uma das causas das discrepâncias, o que não exclui a possibilidade de existir uma acentuada diferença na qualidade microbiológica do charque comercializado nas duas cidades.

Em relação à quantificação de bactérias mesófilas aeróbias ou facultativas, observou-se variação bastante acentuada, desde $2,8 \times 10^3$ UFC/g até $1,4 \times 10^7$ UFC/g. Em 92% das amostras, o nível de contaminação foi superior a 104 UFC/g. Estes níveis são mais elevados que os detectados pelo Serviço de Inspeção Federal em amostras de charque coletadas diretamente nos estabelecimentos produtores (16). Acredita-se que o aumento seja consequência do excesso de manipulação do produto durante a comercialização, e do armazenamento inadequado. No entanto, outros produtos

semelhantes ao charque consumidos em outros países, como o "biltong" da África, carregam níveis de contaminação bastante próximos aos aqui detectados (12).

Os níveis de contaminação por bactérias halófilas foram bastante semelhantes aos de mesófilos. Verificou-se que 86% das amostras também apresentam contagens superiores a 10^4 UFC/g, permitindo considerar a possibilidade da flora bacteriana mesófila detectada ser tolerante a 15% de sal. Este fato teria consequências graves no que diz respeito à vida útil deste alimento, já que o sal presente não impediria sua multiplicação. Embora halófilos cromogênicos não tenham sido detectados neste levantamento, grande parte daqueles encontrados apresentaram atividade lipolítica (dados não publicados). A origem das bactérias halófilas é, certamente, o sal empregado na sua produção. Altos índices de contaminação do sal produzido em Araruama e Cabo Frio, principais fornecedores de sal do país, já foram detectados (9). 83% das amostras testadas continham bactérias dos gêneros *Staphylococcus* (inclusive *S. aureus*), *Micrococcus*, *Planococcus* e *Bacillus*. Além disso, Schneider e Niven (15) demonstraram a presença de halófilos cromogênicos em 86% das amostras de sal estudadas.

Entre os fungos, verificou-se absoluta predominância de leveduras, em níveis entre 50 e 4×10^4 UFC/g, como possível consequência da tecnologia de produção do charque. Estas leveduras estariam relacionadas com o processo fermentativo, responsável pelo odor e sabor característicos deste alimento (10). No entanto, há poucos dados a este respeito, havendo a possibilidade de bactérias lácticas estarem também envolvidas (10).

Tabela 1 - Amplitude de variação das contagens microbianas de charque.

Símbolos: *em UFC/g = Unidade formadora de colônia por grama

Microrganismos	Mínimo*	Máximo*
Mesófilos aeróbios e facultativos	$2,8 \times 10^3$	$1,4 \times 10^7$
Halófilos	$8,0 \times 10^1$	$7,3 \times 10^6$
Fungos	$5,0 \times 10^1$	$4,0 \times 10^4$

Tabela 2 - Níveis de contaminação microbiana de charque.

Símbolos: *em UFC/g = Unidades formadoras de colônias por grama

Nível de contaminação*	Mesófilos Nº de amostras	% amostras	Microrganismos			Fungos Nº de amostras	% amostras
			halófilos Nº de amostras	% amostras	Fungos Nº de amostras		
0 - 10^2	-	-	-	-	4	13,8	
10^2 - 10^3	-	-	-	-	8	27,6	
10^3 - 10^4	2	5,1	5	13,5	12	41,4	
10^4 - 10^5	9	23,1	9	24,3	5	17,2	
10^5 - 10^6	19	48,7	12	32,4	-	-	
10^6 - 10^7	8	20,5	11	29,8	-	-	
10^7 - 10^8	1	2,6	-	-	-	-	
Total	39	100	37	100	29	- 100	

Os resultados apontam para a necessidade de melhoria nas condições higiênicas de produção do charque e mais acentuadamente, na comercialização do produto. Recente avanço, neste sentido, foi obtido com o emprego da embalagem a vácuo, o que, entretanto, é uma solução apenas parcial porque, além de encarecer o produto, resulta em um charque com propriedades organolépticas diferentes do charque tradicional, o que nem sempre é aceito pelo consumidor.

Agradecimentos

À FINEP, pelo auxílio financeiro (Projeto FINEP/PADCT nº 4284 082 100).

Referências Bibliográficas

1. Barross, J.A. & Matches, J.R. - Halophilic microorganisms. In: - Speck, M.L. - Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 2.ed. Washington, American Public Health Association, p.160-169, 1984.
2. Brasil. Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal - Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Rio de Janeiro, Decretos nº 30691 (29.03.1952) e 1255 (25.06.1962).
3. Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E. - Bergey's manual of determinative bacteriology. 8.ed. Baltimore, Williams and Wilkins, 1974.
4. Gutheil, N.C. - Micrococcii relacionadas com fermentações mucilaginosas cinzentas e com a rancificação, na indústria do charque. Anais da Associação Brasileira de Química, p.7-11, 1958.
5. International Commission on Microbiological Specifications for Foods - ICMSF - Microorganisms in foods. 1 - Their significance and methods of enumeration. 2.ed. Toronto, University of Toronto Press, 1978.
6. Leistner, L. & Rodel, W. - The stability of intermediate moisture foods with respect to microorganisms. In: - Davies, R.; Birch, G.G. & Parker, K.J. - Intermediate moisture foods. London, Applied Science Publishers, p.120-137, 1976.
7. Maia, R.M. & Jurgensen, C.A. - Coliformes e enterococos em charque. Síntese Merck, 9:13-19, 1985.
8. Nielsen, E.F. - *Staphylococcus aureus* no vestíbulo nasal, garganta e mãos de manipuladores de alimentos em cozinhas comerciais: produção de enterotoxina estafilocócica e fagotipagem a partir de cepas isoladas. São Paulo, Fac. Ciências Farmacêuticas USP, 1985. (Tese de Doutorado).
9. Oliveira, L.A.T. & Franco, R.M. - Incidência de bactérias facultativas no sal produzido no Estado do Rio de Janeiro. Higiene Alimentar, 3:177-182, 1984.
10. Oliveira, L.A.T. - Contribuição ao estudo da flora microbiana do charque. Rio de Janeiro, Faculdade de Veterinária U.F.F., 1980. (Tese de Mestrado).
11. Picchi, V. & Cia, G. - Fabricação do charque. Boletim do CTC, 5:11-30, 1980.
12. Prior, B.A. - Role of microorganisms in biltong flavour development. J. Appl. Bacteriol., 56:41-45, 1984.
13. Raevuori, M. & Genigeorgis, C. - Effect of pH and sodium chloride on growth of *Bacillus cereus* in laboratory media and certain foods. Appl. Microbiol., 29:68-73, 1975.
14. Schneider, I.S. & Niven, C.F. - Estudo da alteração denominada "vermelhão" no charque: isolamento e identificação de um halófilo vermelho *Halobacterium cutirubrum*. Arq. Bras. Nut., 14:59-76, 1978.
15. Schneider, I.S. - Ocorrência de halófilos vermelhos em sal e reprodução do "vermelhão" em charque, pele salgada de bovino e peixe salgado. Rev. Fac. Med. Vet. (S. Paulo), 6:441-448, 1960.
16. Serafini, A.B. - Padrões microbiológicos para alimentos: histórico, situação atual e perspectivas na área de agricultura. Higiene Alimentar, 3:152-162, 1984.
17. Suggett, A. - Significance of water, hydration and aqueous systems in intermediate moisture foods. In: - Davies, R.; Birch, G.G. & Parker, K.V. - Intermediate moisture foods. London, Applied Science Publishers, p.66-74, 1976.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ENTEROBACTERIAS EN LECHUGAS (LACTUCA SATIVA) CULTIVADAS EN LA CIUDAD DE VALDIVIA, CHILE

Luigi Ciampi Panno

Susana Ojeda A.

& Viviana Osorio Pinto

Instituto Producción y Sanidad Vegetal

Facultad de Ciencias Agrarias

Universidad Austral de Chile

Casilla 567

Valdivia Chile

Resumen

Entre los meses de marzo y julio de 1983 se realizó un estudio, cuya finalidad fue analizar la flora bacteriana entérica en 200 muestras de lechugas (*Lactuca sativa*), provenientes de cuatro diferentes puntos de expendio y producción de la ciudad de Valdivia. Para la detección de enterobacterias, las muestras fueron procesadas utilizando el método de preenriquecimiento en caldo lactosado y aislamiento en agar Endo. Para la detección de *Salmonella* spp. se preenriqueció en caldo lactosado, sembrando posteriormente en medio de Rappaport, modificado por Lobos y en agar selectivo *Salmonella* - *Shigella*. Para la identificación, fueron seleccionadas a partir de agar endo y agar S-S, alrededor de 500 cepas, las cuales se redujeron a 191 en base a cuatro aspectos: Tinción de Gram, Prueba de la Oxidasa, reducción de nitratos a nitritos y fermentación de la glucosa. Los resultados obtenidos demuestran que de las 200 muestras de lechugas examinadas, el 63% de ellas (126) presentaron *Enterobacter aerogenes* (33,5%), *Erwinia herbicola* (15,7%), *Hafnia alvei* (11,5%) y *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (9,4%).

Summary

Isolation and identification of enteric bacteria from lettuce (Lactuca sativa) cultivated in the town of Valdivia, Chile

Between March and July 1983 a study was conducted in order to determine faecal contamination of lettuces (*Lactuca sativa*) available for human consumption, in the town of Valdivia, Chile. A total of 200 samples were purchased from both local farms and a street-market, and examined for enteric bacterial flora using a pre-enrichment technique in Lactose Broth and subsequent plating on Endo agar. For the isolation of members of the *Salmonella* group, enriched samples were cultured in Lactose Broth and subcultures on Rappaport Medium, modified by Lobo, and using *Salmonella-Shigella* Agar as a selective plating medium. Five-hundred randomly selected colonies were picked up from Endo Agar and S-S Agar plates and further identified by Gram stain, oxidase test, reduction of nitrate to nitrite, and glucose fermentation. The results indicated that from 200 samples analyzed, 63% (126) presented contamination with enteric bacilli. Among these, the most important species were *Enterobacter aerogenes* (33,5%) *Erwinia*

herbicola (15,7%), *Hafnia alvei* (11,5%) and *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (9,4%).

Introducción

Las enterobacterias de acuerdo a su capacidad para producir enfermedades entéricas, a través de la ingestión de agua o alimentos contaminados, se han dividido en dos grupos: patógenos entéricos clásicos y no patógenos. Históricamente se han considerado como patógenos a especies de *Salmonella* y *Shigella*, pero a fines de la década del 40, se constató también la existencia de cepas de *Escherichia coli*, capaces de producir alteración en el tracto digestivo (2).

Las especies del género *Salmonella*, pueden producir dos cuadros patológicos: gastroenteritis de curso autolimitado y, fiebres entéricas que corresponden a un cuadro de septicemia clíctica (*S. typhi* y *S. paratyphi*). En cambio, las especies de *Shigella* son los agentes causales de la llamada disentería bacilar (6).

Las cepas de *E. coli*, causantes de diarrea en el hombre, se clasifican en tres grupos: *E. coli* enteropatógena, productora de diarrea en lactantes; *E. coli* enterotoxigenica, responsable de cuadros diarréicos en niños y adultos en climas cálidos y, *E. coli* enteroinvasora, capaz de provocar un síndrome disenteriforme. Otros representantes de la familia Enterobacteriaceae, tales como *Yersinia enterocolitica* y algunas cepas de *Klebsiella pneumoniae*, también pueden causar diarrea en el hombre (9).

Las investigaciones realizadas por Lobos y colaboradores (13) sobre la contaminación de las aguas con materia fecal indican que ésta se produce por la evacuación de las aguas servidas a las vías fluviales, las cuales a menudo se utilizan para el riego de hortalizas destinadas al consumo humano. Dichas aguas, no sólo reciben las excretas de origen humano, sino también de animales de predios agrícolas circundantes, y que generalmente, no son sometidas a tratamiento previo para disminuir su alta carga microbiana. Schoebitz (16) analizó la flora microbiana de aguas superficiales del río Valdivia y la identificación de los diversos grupos microbianos mostró un predominio del género *Bacillus*, entre las bacterias Gram positivas; mientras que en los Gram negativos se aisló en mayor porcentaje las pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae. En un estudio posterior, Schoebitz y Montes (17) obtuvieron del río Valdivia especies del género *Salmonella*, siendo *S. typhimurium*, *S. paratyphi* B y *S. panama*, los serotipos encontrados con mayor frecuencia.

A pesar de que existe cierta información sobre la situación bacteriológica del río Valdivia, se desconoce la flora bacteriana en hortalizas de alto consumo, como son las lechugas (*Lactuca sativa*). El objetivo del presente estudio, fue aportar antecedentes sobre la flora microbiana entérica presente en lechugas cultivadas y expendidas en la ciudad de Valdivia.

Material y Métodos

1. Origen y recolección de las muestras - En Valdivia, entre los meses de marzo a julio de 1983, se recolectaron un total de 200 lechugas; del tipo varietal "Crespa" (*Lactuca sativa* var *intybacea*) y 100 del tipo "Arrepollada oleosa" (*Lactuca sativa* var *capitata*).

Del total, el 50% fue adquirido en puestos de venta del mercado fluvial y las restantes directamente de las chacras de cultivo, ubicadas en los sectores Collico, Las Animas y Regional, de la ciudad de Valdivia.

Las muestras fueron transportadas en bolsas de papel estériles, desde el lugar de expendio al laboratorio, analizándose dentro de un período de máximo de 30 minutos.

2. Análisis bacteriológico - Aproximadamente 25 gramos de cada lechuga (dos hojas interiores y una exterior), se suspendieron en 225ml de caldo lactosado al 1,5%, como medio de preenriquecimiento, el cual se agitó durante tres minutos, para

posteriormente ser incubado durante cuatro horas a 37°C. Luego se traspasó dos ml de este cultivo a medio de Rappaport, modificado por Lobos (12), como enriquecimiento para la búsqueda de *Salmonella*, incubándose en un baño termorregulado a 41,5°C, por 48 horas. Una alícuota de este caldo se sembró en agar S-S para el aislamiento de especies de *Salmonella* y/o *Shigella*. Las colonias sospechosas aisladas de este agar, fueron repicadas en agar peptona al 2% hasta la obtención de cultivos puros. El aislamiento de otras especies de enterobacterias, se realizó en agar endo (Difco), a partir de la suspensión obtenida en caldo lactosado al 1,5%. Las colonias desarrolladas, fueron repicadas en agar peptona al 2% para obtener cultivos puros. A la totalidad de las cepas así obtenidas, se les realizó como pruebas de orientación, tinción de Gram, test de oxidasa, fermentación de glucosa y reducción de nitratos. Aquellas que resultaron ser bacilos Gram negativos, oxidasa negativo, glucosa positiva y nitrato positivo, fueron conservadas en agar peptona al 0,75% a 4°C, hasta su identificación bioquímica, la cual se realizó en base a las pautas de Buchanan y Gibbons (4) y Krieg y Holt (11).

Resultados

De un total de 200 lechugas analizadas en este trabajo, 126 presentaron bacilos entéricos en su superficie, lo que corresponde a un 63%. Se detectó un mayor porcentaje de contaminación en aquellas muestras provenientes del mercado fluvial (71%), mientras que la lechugas adquiridas en las chacras de cultivo arrojaron un 55%. Las muestras con un mayor porcentaje resultaron ser las del tipo "Crespa" (70%), siendo este inferior en las "Arrepolladas oleosas" (56%).

La Tabla 1 presenta las especies de enterobacterias aisladas. Se obtuvieron 191 cepas pertenecientes a 9 géneros y un grupo sin identificar (11 cepas). En términos generales, se observa claramente el predominio de los géneros *Enterobacter* (41,4%) y *Erwinia* (20,9%) por sobre el resto, siendo *Serratia* sp. el microorganismo menos frecuente (1,6%). Entre las especies se distingue a *Enterobacter aerogenes* por su alto porcentaje de aislamiento (33,5%), aunque también debemos hacer notar *Erwinia herbicola* (15,7%) y *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (9,4%). Del total de cepas estudiadas, 11 no pudieron ser identificadas, lo que correspondió a un 5,8%.

Es importante hacer notar ciertas diferencias en cifras globales y presentadas en la Tabla 1. La mayor cantidad de cepas de enterobacterias (114) fueron detectadas

Tabla 1 - Especies de enterobacterias aisladas según el tipo varietal de lechuga (*Lactuca sativa*) y de acuerdo a la procedencia de las muestras analizadas

Espécie de enterobacteria	Tipo varietal				Procedencia				Total	
	Crespa		Arrepollada oleosa		Mercado fluvial		Chacras de cultivo			
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%		
<i>Enterobacter aerogenes</i>	39	34,2	25	32,5	36	33,0	28	34,2	64 33,5	
<i>Erwinia herbicola</i>	23	20,2	7	9,1	13	11,9	17	20,7	30 15,7	
<i>Hafnia alvei</i>	14	12,3	8	10,4	11	10,1	11	13,4	22 11,5	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	12	10,6	6	7,8	9	8,3	9	11,0	18 9,4	
<i>Enterobacter cloacae</i>	9	7,9	6	7,8	9	8,3	6	7,3	15 7,9	
<i>Citrobacter diversus</i>	3	2,6	7	9,1	10	9,2	0	0	10 5,2	
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	4	3,5	6	7,8	8	7,3	2	2,4	10 5,2	
<i>Citrobacter freundii</i>	6	5,2	2	2,6	4	3,7	4	4,9	8 4,2	
<i>Serratia marcescens</i>	1	0,9	2	2,6	2	1,8	1	1,2	3 1,6	
Sin identificar	3	2,6	8	10,3	7	6,4	4	4,9	11 5,8	
Total	114	100,0	77	100,0	109	100,0	82	100,0	191 100,0	

en lechugas tipo "Crespa". Por el contrario, la variedad "Arrepollada oleosa" solamente entregó 77 cepas, lo que corresponde a un 59,7 y 40,3% respectivamente. Por otra parte, en cuanto a la procedencia de las enterobacterias, el mayor porcentaje (57,1%) corresponden a cepas provenientes del mercado fluvial, contra 82 cepas (42,9%) aisladas de chacras de cultivo.

En relación a las especies en particular, se aprecia que *E. aerogenes* es la cepa predominante tanto en chacras de cultivo y mercado fluvial como en relación al tipo varietal de lechuga. Otras especies tales como *E. herbicola* tiene una importante presencia en lechugas "Crespa" provenientes de chacras de cultivo. En relación a *H. alvei* fueron aisladas 22 cepas, 14 de las cuales provenían de lechugas "Crespas", procedentes, tanto del mercado fluvial como de chacras de cultivo.

La Tabla 1 también ilustra en forma porcentual las especies de enterobacteria aisladas sin especificar su procedencia ni la característica varietal. Se puede apreciar que el 78% de las cepas corresponden a 5 especies: *E. aerogenes* (33,5%) *E. herbicola* (15,7%), *H. alvei* (11,5%), *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (9,4%) y *E. cloacae* (7,9%).

Discusión

Las superficies externas de los vegetales se contaminan a partir de diferentes fuentes, entre las cuales destacan el suelo, agua, materia fecal y aire. Los microorganismos contaminantes se añaden a la flora natural de las hortalizas (7) y esta contaminación puede producirse en cualquier etapas de desarrollo del cultivo, como en la cosecha, el transporte o durante la comercialización (15).

De acuerdo a los resultados obtenidos, la más alta contaminación fue detectada en muestras provenientes del mercado fluvial, donde las hortalizas son comercializadas después de su recolección. A este respecto Frazier (7) señala que casi siempre después de la cosecha se producen las condiciones favorables para la proliferación de la de la flora normal y microorganismos contaminantes. Este aumento se produce tan pronto como las hortalizas son puestas en cajas, bolsas, cestos u otros medios de transporte, quedando expuestas a ser invadidas por microorganismos que pasan de unas a otras, por la manipulación o por la presencia de bacterias en los recipientes utilizados. Durante este proceso aumentan los traumatismos en los vegetales, lo que los hace más susceptibles a la alteración facilitando el desarrollo microbiano y la transmisión de microorganismos de productos dañados a aquellos sanos.

La mayor contaminación por bacilos entéricos detectada en lechugas que se expenden en el mercado fluvial, podría estar explicada por la práctica común de mojar las hortalizas con agua del río para mantener la turgencia del producto. Este proceso otorga a los vegetales un aspecto de frescura temporal y retrasa su deterioro aportanto condiciones de humedad apropiadas tanto para el vegetal como para el desarrollo de los microorganismos ya presentes en las hortalizas (15).

En la ciudad de Valdivia, el riego artificial de hortalizas generalmente se hace innecesario, debido a sus condiciones climáticas, de abundantes precipitaciones y excesiva humedad. Parte de las muestras analizadas en este trabajo, provenientes de las chacras de cultivo, no están sujetas a contaminación por riego con aguas servidas.

En ninguna de las tres chacras, de las cuales se obtuvo 100 de las muestras analizadas, se constató la aplicación de abono orgánico u otro tipo de práctica, que podría explicar la mayor contaminación de las hortalizas. Sin embargo, la existencia de aves de corral y animales domésticos podría ser responsables de contaminación bacteriana, puesto que en plumas, cuero, patas (pezuñas), pelo y excrementos es común encontrar especies del grupo coliforme (1). Estos microorganismos pueden ser depositados en el suelo y ser transmitidos a las hortalizas en cultivo (10).

La lechuga del tipo "Crespa" se caracteriza por su cabeza firme, de gran tamaño, hojas rugosas y textura fácil de quebrar; en cambio, la del tipo "Arrepollada oleosa", se distingue por su cabeza pequeña y suelta con hojas anchas oleosas y de textura suave (14, 19). La particular rugosidad de sus hojas en las muestras del

tipo "Crespa", permite retener con mayor facilidad los microorganismos contaminantes en su superficie, además el alto contenido de humedad de su cabeza (1), proporciona un medio más apto para la sobrevivencia de ellos (20).

El género predominante resultó ser *Enterobacter*, el que es indicado como uno de los miembros del grupo coliforme (5, 17). Está ampliamente distribuido en la naturaleza, pudiendo estar presente en agua, suelo y granos (10), distinguiéndose fuentes más específicas que incluyen piel del hombre, especialmente interdigital y cuero de animales (3). Este género posee 5 especies (11) dos de las cuales fueron aisladas a partir de las muestras analizadas, destacándose *E. aerogenes* con el más alto porcentaje de aislamiento. Esta especie puede encontrarse en el tracto intestinal de hombres y animales, pero se le asocia normalmente con plantas (7), siendo una de las especies más comúnmente aislada en verduras de consumo crudo (1). La segunda especie del género, *E. cloacae*, aunque aislada en menor porcentaje, podría tener mayor relevancia desde un punto de vista clínico, como posible agente productor de cuadros diarreicos.

El otro género de la familia Enterobacteriaceae que mostró un importante porcentaje de aislamiento es *Erwinia*, el cual characteristicamente está asociado con plantas, siendo las bacterias más importantes que intervienen en la producción de alteraciones en frutas y verduras (10). El grupo *Carotovora* posee una fuerte capacidad pectolítica, que le permite producir una extensa maceración del tejido vegetal, conocida como "pudrición blanda", lo que provoca grandes pérdidas en la época de cosecha y posterior almacenamiento (18). Considerando el hábitat del género *Erwinia*, su presencia en hortalizas de consumo resultaría sin importancia para la salud del hombre.

Los géneros *Hafnia*, *Klebsiella* y *Citrobacter* fueron también encontrados en las muestras analizadas, presentando moderados porcentajes de aislamiento. Están distribuidos en agua, suelo, aire y polvo, fuentes a partir de las cuales resulta fácil la contaminación de hortalizas. Es común también aislar estos géneros a partir del tracto intestinal de hombres y animales (10). Existen estudios que informan sobre un posible rol de estos microorganismos en la producción de gastroenteritis: sin embargo no hay evidencias concretas de su enteropatogenicidad (1).

Al género *Serratia*, en la actualidad se le reconoce 6 especies (11), la única detectada resultó ser *S. marcescens*, con escaso porcentaje de aislamiento. Tiene amplia distribución en la naturaleza, habiendo sido aislada de vegetales (10) pero se le involucra especialmente con infecciones nosocomiales, pudiendo ingresar a un hospital através de verduras contaminadas (8).

Es importante destacar que entre las especies aisladas no se detectó la presencia de *E. coli* ni de patógenos como *Salmonella* y *Shigella*, a diferencia de lechugas cultivadas en otras regiones del país (4).

E. coli, es considerada por los microbiólogos, indicadora de contaminación fecal de los alimentos, debido a que su principal habitat es el tracto intestinal de hombres y animales se sangre caliente (1). Se podría afirmar, que las lechugas analizadas en este estudio no evidenciaron contaminación fecal. Sin embargo, la presencia de varias especies de enterobacterias evidencia que existen fuentes contaminantes que constituirían riesgo para la salud humana.

Referencias Bibliográficas

1. Banwart, G.J. - Basic food microbiology. Westport, The Avi Publishing, 1981.
2. Brenner, D.J. - Introduction to the family Enterobacteriaceae. In: - Starr, M.; Stolp, H.; Trüper, H.; Balows, A. & Schlegel, H., eds. - The prokaryotes. New York, Springer-Verlag, p.1105-1127, 1981.
3. Brenner, D.J. - The genus *Enterobacter*. In: - Starr, M.; Stolp, H.; Trüper, H.; Balows, A. & Schlegel, H., eds. - The prokaryotes. New York, Springer-Verlag, p.1173-1180, 1981.
4. Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E. - Bergey's manual of determinative bacteriology. 8.ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1974.

5. Castillo, G. & Cordano, A.M. - Enterobacteriaceae en una corriente fluvial. Rev. Lat. Amer. Microbiol., 17:213-219, 1975.
6. F.A.O. - Food and Agricultural Organization - Estudio FAO de Alimentación y nutrición: manuales para el control de calidad de los alimentos (4): análisis microbiológico. Roma, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1981.
7. Frazier, W.C. - Microbiología de los alimentos. Zaragoza, Editorial Acribia, 1972.
8. Grimont, A.D. - The genus *Serratia*. In: - Starr, M.; Stolp, H.; Trüper, H.; Balows, A. & Schlegel, H., eds. - The prokaryotes. New York, Springer Verlag, p.1187-1203, 1981.
9. Jawetz, E.; Melnick, J. & Adelberg, E. - Manual de microbiología médica. México, Editorial El Manual Moderno, 1979.
10. Jay, J.M. - Microbiología de los alimentos. Zaragoza, Editorial Acribia, 1973.
11. Krieg, R.N. & Holt, J.S.G. - Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore, Williams & Wilkins, v.1, 1984.
12. Lobos, H.; Brandt, H. & Quijada, M. - El medio de Rappaport modificado para el enriquecimiento en la búsqueda de *Salmonella*. Bol. Inst. Bact. Chile, 16:25-32, 1974.
13. Lobos, H.; García, J.; Aguilar, C.; Greve, E.; Olivares, A.; Bustos, V.; Valenzuela, M.; Zapata, L. & Romero, H. - Estudio bacteriológico comparativo de lechugas (*Lactuca sativa*) provenientes de los alrededores de Santiago y región costera. Bol. Instit. Bact. Chile, 18:33-37, 1976.
14. Ryder, E.J. - Leafy salad vegetables. Westport, The Avi Publishing, 1979.
15. Caff, G.; Urbina, A. & Mery, J. - Contaminación de repollo regados con aguas servidas. Ag. Técnica, 39:59-62, 1979.
16. Schoebitz, R. - Flora microbiana en aguas superficiales del río Valdivia, Chile. Zbl. Vet. Med. B., 30:775-784, 1983.
17. Schoebitz, R. & Montes, L. - Indicadores de contaminación bacteriológica y presencia de *Salmonella* en aguas del río Valdivia. III Simposio sobre contaminación ambiental orientado al recurso agua. INIA (Santiago), p.118-121, 1984.
18. Starr, M.P. - The genus *Erwinia*. In: - Starr, M.; Stolp, H.; Trüper, H.; Balows, A. & Schlegel, H., eds. - The prokaryotes. New York, Springer-Verlag, p.1260-1271, 1981.
19. United States Department of Agriculture - Agriculture handbook, nº 221, 1972.
20. Willem, R.; Lloyd, F. & Ragotzkie, R.A. - Sewage works: literature review on the occurrence and survival of enteric, pathogenic and organisms in soil, water, sewage and sludges, and on vegetation. N. Jersey Ag. Ex. Sta., 22:1261-1280, 1950.

INFORMAÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA SBM

Arai, T., ed. - *Filamentous microorganisms*. Tokyo, Japan Scientific Societies Press, 443p., 1985. US\$ 50.00.

Trata-se de uma coletânea dos grandes temas apresentados no Simpósio Internacional de Quimiobiodinâmica, realizado em comemoração ao 10º aniversário do Instituto de Quimiobiodinâmica da Universidade de Chiba, Japão (setembro, 1983). Filogênese dos fungos de importância médica; Actinomycetes de significância biomédica; fungos em alimentos e micotoxinas; mecanismo das infecções fúngicas e quimioterapia antifúngica (aspectos básicos e clínicos), constituem a temática desta publicação que retrata trechos da fronteira dos conhecimentos relativos aos fungos filamentosos e Actinomycetes de importância em medicina.

Apesar da repetitividade de alguns temas abordados com frequência em congressos internacionais, a grande maioria dos trabalhos apresentados é referente a pesquisas efetuadas no Japão e, principalmente, no mencionado Instituto. Este fato confere à obra, duplo aspecto comemorativo pois além da efemeride, propaga aos quatro ventos a progressiva participação dos cientistas japoneses nos mais variados setores da ciência e da tecnologia internacional.

Recomenda-se sua leitura aos cultores da micologia médica, não só pela atualidade e profundidade de seus temas como também pelo imperativo de se conhecer trabalhos de cientistas cujos nomes, por ora são pouco conhecidos, entre nós. Hotchi, Yamaguchi, Nogawa, Arai, Osumi, Hata e tantos outros mais que, certamente, mercê da aplicação e tenacidade japonesa, tornar-se-ão familiares a seus colegas ocidentais, em curto prazo.

Adhemar Purchio
Dept^o de Microbiologia ICB/USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
Cidade Universitária USP
05508 São Paulo SP

Biotecnologia, 1(2):1-11, Jun. 1986. US\$185/12 números.

Recebemos o volume 1, número 2, de junho de 1986, do boletim mensal chamado Biotecnologia, editado em Madrid, em língua espanhola.

As notícias são breves e referem-se preferencialmente aos aspectos econômicos, legais e técnicos da biotecnologia. Ao final de cada notícia, há uma referência postal a fim de que os leitores interessados nas mesmas peçam maiores esclarecimentos. Além disso, Biotecnologia, dispõe de um banco de dados e um serviço de busca de informações e patentes que pode ser contratado, mesmo que o assunto não tenha sido divulgado pelo boletim. Não fica claro se somente os assinantes podem utilizar-se deste serviço ou se o mesmo é oferecido a qualquer interessado.

A abrangência de Biotecnologia é grande e neste número, algumas das notícias versam sobre: genes bacterianos para proteção de plantas; produção de goma xantana; detecção de aflatoxinas através de monoclonais; plásticos produzidos por bactérias; purificação de urânio com taninos; nova vacina contra brucelose; patente de interferon para a Biogen; calcitonina recombinante; produção industrial de *Streptococcus lactis* e produção de *Rhizobium*.

As notícias da área econômica indicam para o segundo semestre de 1986, que continuarão em ascendência as ações das empresas de biotecnologia. É fornecida uma estimativa, para os próximos dez anos, da participação da biotecnologia nos setores farmacêutico, químico e agrícola.

No final do boletim são apresentadas as novas patentes e neste mês de junho foram, segundo a Biotecnologia, 86 incluindo processos, meios de cultura, plasmídios, técnicas, metodologias, etc.

Se este boletim atingir os objetivos propostos será de grande utilidade pois propiciará a disseminação rápida sobre os novos acontecimentos da biotecnologia.

Para maiores esclarecimentos, enviar correspondências para Biotecnologia, Apartado Postal 20147, Madrid 28080, Espanha.

Flávio Alterthum
Deptº de Microbiologia ICB/USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
Cidade Universitária USP
05508 São Paulo SP

DNA: a journal of molecular biology, 3(5):347-419, 1984. Ed. Mary Ann Liebert, US\$ 175.00/6 issues.

Revista especializada na publicação de artigos sobre a estrutura, expressão e evolução de genes de eucariotos e procariotos, bem como sobre a natureza físico-química do DNA. Para efeito desta resenha examinamos o volume 3, número 3 (Outubro de 1984). Os artigos, todos dentro do escopo anunciado da revista, poderiam ser encontrados em EMBO Journal, Gene ou Cell. Duas notas técnicas, que aparecem na seção "Laboratory Methods", são a típica informação tecnológica que faz o gênero de revistas como Gene Analysis Techniques. Assim sendo, e supondo que a amostra examinada seja representativa do material publicado por DNA, conclui-se que esta revista está competindo em nicho já ocupado por outros títulos de maior tradição e penetração.

Carlos Alberto Moreira-Filho
Deptº de Imunologia ICB/USP
Caixa Postal 4365
01051 São Paulo SP

Marshall, K.C., ed. - Advances in microbial ecology. 8.ed. New York, Plenum Press, 1985.

Recente volume da série Advances in Microbial Ecology que apresenta as pesquisas mais atualizadas sobre o papel dos microrganismos em ecossistemas naturais e artificiais.

O volume em apreço consta de seis capítulos. No capítulo 1, são abordadas interações microbianas entre bactérias oxidantes do enxofre, onde são discutidos vários exemplos de interações entre estes microrganismos, os principais grupos envolvidos e o papel de várias espécies no ciclo do enxofre.

No capítulo 2 são discutidas as vantagens e limitações da análise de regressão não-linear na determinação de parâmetros cinéticos nos estudos da ecologia de microrganismos.

O capítulo 3 apresenta informação atualizada e de grande interesse sobre a ecologia microbiana do trato gastro-intestinal. A diversidade das espécies ali presentes, fatores que interferem na mesma; a colonização das superfícies do trato gastro-intestinal, resistência à mesma; exemplos sobre alterações no equilíbrio da microbiota, causas e consequências; são alguns dos itens discutidos.

Uma das principais preocupações do autor é apontar as áreas onde maiores conhecimentos e pesquisas se fazem necessárias.

Uma série de resultados obtidos pelo autor e seu grupo são apresentados e discutidos.

No capítulo 4 são discutidos com propriedade várias limitações ecológicas na fixação de nitrogênio em ecossistemas. Os fatores abióticos como: pH, temperatura, umidade, salinidade e alcalinidade, bem como emprego de fungicidas e seus efeitos são abordados.

O capítulo 5 enfoca os aspectos ecológicos de metais pesados, principalmente sobre as comunidades microbianas. Aspectos genéticos da transferência de tolerância

a certos metais são discutidos e os efeitos dos metais pesados em processos mediados por microrganismos bem como efeitos destes poluentes em várias interações também são assuntos incluídos no texto.

O capítulo 6 apresenta a ecologia da degradação microbiana da celulose, discutindo a estrutura do composto, organismos celulolíticos e suas propriedades, sistemas de enzima celulase e interação dos microrganismos no solo em ambientes aeróbicos e anaeróbicos.

A plêiade de autores que contribuiram para esta edição por si só justifica a consulta à mesma pelos estudiosos da ecologia de microrganismos, microbiologia ambiental e áreas afins.

Maria Therezinha Martins
Deptº de Microbiologia ICB/USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
Cidade Universitária USP
05508 São Paulo SP

Revista Mexicana de Micología, 1:1-560, 1985.

Comemorando o seu vigésimo aniversário, a Sociedade Mexicana de Micologia lança a sua nova revista oficial - a Revista Mexicana de Micologia - que substitui o Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología, publicado até o volume 19, 1984.

Segundo o editorial apresentado, a mudança do nome foi ocasionada pelo estágio de maturidade alcançado pela Sociedade e ainda pelo aumento do número de trabalhos recebidos para publicação.

O primeiro volume, editado em 1985, possui 560 páginas e contém 31 artigos originais, todos assinados por micólogos mexicanos, o que demonstra a pujança da micologia do México. Predominam trabalhos sobre basidiomicetos, porém, constam também artigos sobre ascomicetos, deuteromicetos, líquens, zigomicetos e mixomicetos, abrangendo áreas de pesquisa como as de inventário, fitopatologia, taxonomia, micologia médica, cultivo, etc. O nível dos trabalhos é bom.

Além dos artigos citados o volume examinado contém revisões bibliográficas (book reviews), noticiário de interesse da Sociedade, diretório dos membros e, finalmente, instruções aos colaboradores. Estas informam que a revista aceita contribuições originais no campo da micologia, não constando qualquer outra restrição. Os artigos em quatro vias, submetidos para publicação até 30 de maio, poderão ser publicados no volume do ano em curso, cuja data de publicação é 31 de dezembro. A periodicidade da revista é anual.

Os artigos recebidos são analisados pelo Comitê Editorial da Sociedade Mexicana de Micologia, assessorado por um Conselho Consultivo formado por seis membros, identificados no início deste primeiro volume. As línguas admitidas são espanhol e inglês.

A revista possui o formato de 16,8 x 23,0cm e texto impresso em uma única coluna. Os artigos apresentam sumário em inglês e espanhol. As ilustrações são, geralmente, em preto e branco. As fotomicrografias presentes parecem um tanto quanto prejudicadas principalmente pelo tipo de papel utilizado.

O acabamento da revista inclui costura e colagem dos cadernos, os quais são montados em capa de cor verde, (1/1), flexível.

Cumprimentamos, nesta oportunidade, a Sociedade Mexicana de Micologia pela iniciativa e desejamos longa vida ao novo periódico.

Adauto Ivo Milanez
Seção de Micologia e Líquenologia
Instituto de Botânica
Caixa Postal 4005
01051 São Paulo SP

Trabulsi, L.R., ed. - Microbiologia. São Paulo, Atheneu, 1986. Cr\$ 300,00.

O ensino de microbiologia a nossos estudantes da área biomédica (medicina, biologia, biomédicas, enfermagem etc.) há tempo se ressente de um livro atual, compacto, didático e sobretudo informativo, como o que acabamos de receber da Editora Atheneu, sob o título "Microbiologia", editado pelo Prof. Dr. Luiz R. Trabulsi, titular de Microbiologia da Escola Paulista de Medicina, de São Paulo.

Nos últimos anos, pela tendência de se ministrar na graduação cursos de microbiologia que duram, via de regra, não mais do que 3 meses úteis, incluindo-se, na maioria dos casos, também a imunologia, compêndios superdimensionados e traduzidos de outras línguas para o português, ao invés de colaborar no relacionamento didático aluno-professor, têm-se constituído em sério entrave. Tais livros, quando adotados como texto, exigem do aluno um dispêndio exagerado de tempo que acaba comprometendo o aprendizado não só da microbiologia, como de outras disciplinas de seu currículo, que enfrentam problemas semelhantes, em sua maioria.

Por outro lado, na sua totalidade, em tais traduções, não são permitidas alterações substanciais o que confere a estes livros-texto um aspecto ultrapassado e/ou deficiente, em informações atualizadas, sobrecregando docentes e confundindo alunos.

O livro "Microbiologia" com a experiência de seu Editor, co-editores e eméritos colaboradores se caracteriza por uma abordagem organizada e homogênea dos diferentes aspectos básicos e aplicados da microbiologia. Sem se estender em demasia, o livro traz informações bastante recentes em todos os seus tópicos, o que permite aos docentes e alunos, num prazo exíguo, cumprirem a difícil tarefa, respectivamente, de ensinarem e estudarem a microbiologia com profundidade e eficiência.

Áreas muito específicas da microbiologia, irrelevantes para um curso de graduação, foram propositalmente omitidas ou apenas comentadas superficialmente, permitindo, se assim o desejarem, a docentes e alunos encontrarem uma orientação para o desenvolvimento deste conteúdo.

É evidente, que devido à experiência dos pesquisadores responsáveis pela redação dos diferentes capítulos, em algumas áreas, apenas para exemplificar, tais como genética bacteriana, mecanismos de patogenicidade microbiana, ação dos antimicrobianos e resistência a drogas, a leitura dos mesmos, quando comparada com a de outros livros-texto, pode sugerir um maior número de informações, no que tange a sua atualização. Todavia, esta, pela dosagem certa do conhecimento a ser transmitido é antes de mais nada a grande e relevante vantagem do livro "Microbiologia". As mesmas considerações se aplicam a bacteriologia especial e a bacteriologia clínica com relação às quais, os editores tiveram a feliz iniciativa de as colocarem em capítulos separados, o que é raro em outros livros semelhantes. Conduta idêntica foi adotada, com as mesmas vantagens já apontadas, para a virologia (geral, especial e clínica) e micologia (geral, especial e clínica).

Por tudo que foi aqui dito, que ainda é pouco pela agradável sensação de alívio de estar diante de um livro-texto ideal para o ensino da microbiologia, nos sentimos à vontade para afirmar que finalmente encontrou-se a "dose ótima". São perfeitamente aceitáveis um erro tipográfico, aqui ou acolá (principalmente por tratar-se de uma 1ª edição), sem qualquer interferência no entendimento do texto.

Estão de parabéns o Editor, co-editores, seus colaboradores e a Livraria Atheneu, por terem todos trabalhado com afinco e resolução na elaboração do "Microbiologia" que, sem dúvida, a partir de agora, pode ser considerado como indispensável para um ensino racional, eficiente e consciente da microbiologia brasileira à nível de graduação.

Antonio F. Pestana de Castro
Deptº de Microbiologia
Instituto de Biologia UNICAMP
Cidade Universitária "Barão Geraldo"
13081 Campinas SP

UNDP/WORLD BANK/WHO - Tropical disease research: Seventh programme report, 1 January 1983 - 31 December 1984. 10 - Biological control of vectors. Geneva, WHO, p.10/3-10/16, 1985.

O Programa Especial de Pesquisas e Treinamento em Doenças Tropicais (TDR) que faz parte das pesquisas em desenvolvimento apoiadas pelo Programa de Desenvolvimento das Nações Unidas (UNDP), Banco Mundial (WB) e Organização Mundial de Saúde (WHO) incluiu no "Tropical Disease Research - Seventh Programme Report" em seu capítulo 10 os resultados das pesquisas referente ao período de 01.01.83 a 31.12.84 sobre Controle Biológico de Vetores.

O programa abrange 5 estágios que vai desde estudos básicos em laboratório até à aplicação no campo. Os estágios são os seguintes:

1. Identificação, caracterização, efetividade contra alvos selecionados, e avaliação preliminar das possibilidades de cultivo;
2. Testes iniciais de riscos para mamíferos e avaliação da atividade contra organismos que não são considerados alvos;
3. Experimentos preliminares de campo sobre eficiência em condições naturais;
4. Testes de segurança em mamíferos, efeitos sobre organismos não alvos e formulação;
5. Produção, desenvolvimento de fábricas piloto e industrial, e aplicação no campo em cooperação com os epidemiologistas locais (Box 10.2).

As doenças selecionadas para o estudo são malária, esquistossomose, filariose, tripanossomíase (doenças de Chagas e do sono), leishmaniose e hanseníase, sendo esta última não transmitida por vetores; os agentes para controle biológico dos vetores são vírus, bactérias, invertebrados predadores, competidores biológicos e peixes.

Desses agentes, os que se apresentaram mais promissores no combate dos vetores foram as bactérias larvícidas, os peixes larvívoros e os fungos.

Entre as bactérias, o *Bacillus sphaericus*, um microrganismo que tem capacidade de reciclar-se mesmo em águas poluídas, tem se mostrado eficaz em alguns países, como agentes de combate aos vetores *Anopheles* e *Culex* (Box 10.1). Outra bactéria altamente eficaz é o *B. thuringiensis*, notadamente a linhagem *B.t. H-14*, descoberta em Israel em 1976 e que desde 1982 tem se mostrado muito eficiente, no controle de várias espécies de mosquitos vetores em Cuba, Índia, Somália, Sri Lanka e União Soviética.

Entre os peixes salientam-se como mais promissores os gêneros *Aphanius*, *Aplocheilus*, *Poecilia* e *Tilapia* (Box 10.2).

Entre os fungos os mais promitentes são *Lagenidium giganteum*, um representante da classe Oomycetes e *Coelomomyces* sp. da classe Chytridiomycetes (Box 10.2). No caso dos fungos entomopatogênicos *Metarrhizium* sp. e *Beauveria* sp., ambos da classe Deuteromycetes, apesar de terem sido estudados intensivamente, apresentaram pouco potencial em relação ao controle biológico de vetores de doenças tropicais. Contudo no Brasil, esses dois fungos são cogitados para serem empregados em controle biológico das cigarrinhas da cana-de-açúcar e das pastagens, e, apesar dos estudos feitos com essa finalidade se constituirem fatos isolados, as possibilidades de sucesso são alvíssareiras.

O trabalho se complementa com 95 referências bibliográficas de 1982 a 1984, como subsídios para os pesquisadores de doenças infecciosas que afligem os países tropicais.

Elza Áurea de Luna Alves Lima
Laboratório de Controle Biológico
EMBRAPA/CENARGEN
Caixa Postal 102372
70000 Brasília DF

USP. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Bibliografia brasileira de medicina veterinária e zootecnia: 1970-1975/1976-1977. São Paulo, 1(8), 1979; 2(5), 1979.

Trata-se de uma coletânea de trabalhos na área de saúde animal, que congrega além

dos periódicos brasileiros indexados, boletins técnicos informativos de várias instituições e faculdade brasileiras, bem como os noticiários de empresas radicadas no país.

Por se tratar de uma obra de abrangência na área veterinária, destina-se não só ao clínico como a pesquisadores e professores ligados a área de saúde animal nas diferentes especialidades.

Os periódicos contêm referências dos trabalhos publicados no Brasil, e o sumário dos mesmos, nas seguintes áreas: microbiologia, parasitologia, anatomia, fisiologia, bioquímica, imunologia, farmacologia e terapêutica, patologia geral e regional, hematologia, Cirurgia, nutrição, reprodução, toxicologia, Inspeção e tecnologia de alimentos, higiene e saúde pública, zootecnia e equipamentos, serviço de veterinária e educação, economia agropecuária.

Esta obra criteriosamente compilada pela biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, segue a estruturação básica do Veterinary Bulletin, contendo um índice de assunto e um índice de autores, tornando-se fácil para o leitor a consulta de trabalhos nesta área.

É um artigo indispensável para o pesquisador brasileiro na área de saúde animal, por tornar fácil o acesso à trabalhos brasileiros publicados em periódicos e boletins não indexados.

Edison Luiz Durigon
Deptº de Microbiologia ICB/USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
Cidade Universitária USP
05508 São Paulo SP

USP. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia: Comunicações científicas, 8(2):99-263, 1984.

A revista que tem por finalidade prescipua publicar revisões e informações técnico-científicas, dedicou totalmente esse volume à III Semana de Medicina Veterinária, que se realizou em São Paulo, no período de 11 a 15 de junho de 1984, como parte das comemorações do Cinquentenário da Universidade de São Paulo. Além da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia participaram, também, como entidades promotoras o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Conselho Regional de Medicina Veterinária em São Paulo, Departamento de Controle de Zoonoses e Vigilância Sanitária da Secretaria de Higiene e Saúde do Município de São Paulo, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Instituto Interamericano de Cooperação Agrária, Ministério da Agricultura, Organização Panamericana da Saúde e Sociedade Paulista de Medicina Veterinária.

O referido evento constou de uma seção solene de abertura, I Encontro Nacional de Ensino de Saúde Pública Veterinária e Curso sobre "Aspectos clínicos e terapêuticos das principais doenças parasitárias de cães e gatos".

Na solenidade de abertura, o Prof. Dr. Antonio Guimarães Ferri discorreu sobre o tema "A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e seu Cinquentenário na Universidade de São Paulo".

O I Encontro Nacional de Ensino de Saúde Pública Veterinária contou com a participação de representantes de 15 Faculdades de Medicina Veterinária do país e de profissionais especialistas de diferentes instituições, nacionais e estrangeiras, que através de seções plenárias, grupos de trabalho e conferências apreciaram e analisaram diversos aspectos de ensino de saúde pública veterinária no país e propuseram linhas de ação destinadas ao desenvolvimento integrado da docência nesta especialidade. Através de ciclos de debates analisaram diferentes aspectos referentes a teníase humana-cisticercose e brucelose humana e animal, visando estabelecer uma sistematização das ações sanitárias para o controle destas zoonoses em nosso país.

O curso Aspectos clínicos e terapêuticos das principais doenças parasitárias de

cães e gatos teve como objetivo oferecer conhecimentos atualizados acerca das principais parasitoses destas duas espécies animais em seus aspectos clínicos e terapêuticos, sendo destinado a profissionais e acadêmicos de medicina veterinária.

Destarte, a III Semana de Medicina Veterinária abordou alguns temas de grande interesse nacional, procurando soluções adequadas, visando colaborar com as autoridades que atuam na área de saúde pública.

José Antonio Jerez
Deptº de Microbiologia ICB/USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
Cidade Universitária USP
05508 São Paulo SP

Veterinary Immunology and Immunopathology: an international journal, 8(4):301-400, 1985.

Recebemos para comentar o volume 8, nº 4 da revista Immunology and Immunopathology, que é publicada mensalmente. Trata-se da 1ª revista internacional especializada na divulgação de trabalhos específicos de Imunologia aplicada aos animais domésticos, aos animais de laboratório e a outras espécies animais úteis e relacionadas ao homem. Dentro desse escopo, a revista publica, materiais relacionados a imunologia básica, especialmente aqueles que dizem respeito ao sistema imune dos animais; imunologia dos tumores animais; experimentos com transplantes; imunoquímica, envolvendo estudos sobre as classes e subclasses de imunoglobulinas de animais, complemento etc; novas técnicas de imundiagnóstico em medicina veterinária, envolvendo aspectos, tais como os da imunologia da gravidez e da transferência passiva da imunidade; imunologia comparada; imunogenética, incluindo pesquisa de grupos sanguíneos; propriedades biológicas de imunoglobulinas, imunologia clínica nos animais; imunoprofilaxia; imunologia e imunopatologia de doenças infecciosas e parasitárias que possam contribuir para o conhecimento do sistema imune.

Além de interessar àqueles que estão trabalhando nos relevantes aspectos da ciência veterinária, a revista, devido a natureza comparativa de muitos dos artigos publicados neste campo específico, é de valor extraordinário para aqueles que militam no campo da imunologia e da imunopatologia médica.

Os artigos a serem publicados nesta revista deverão ser enviados para: Editor Secretariat, Veterinary Immunology and Immunopathology, P.O. Box 330, 1000 AH, Amsterdam, The Netherlands, ou no caso dos colaboradores da América do Norte, para o Editor Chefe: Dr. Richard E. Halliwell, University of Florida, College of Veterinary Medicine, Box J-126, JHM HC, Gainesville, FL. 32610, USA.

Aramis Augusto Pinto
Deptº de Microbiologia
Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias de Jaboticabal UNESP
Campus de Jaboticabal
14870 Jaboticabal SP

Impresso em offset



Avenida Beira Rio, 64
Vila das Mercês São Paulo
Fone: 514-0233
CEP 04288

com filmes fornecidos pelo editor