

Revista de Microbiologia



SBM

Sociedade
Brasileira de
Microbiologia

São Paulo — Brasil

Volume 20 Número 2 Abr.-Jun. 1989

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 milímetro ($m\mu$) 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 milímetro ($m\mu$); e Angstroms (\AA ; $10^{-10}m$). Partes por milhão (ppm) devem ser expressas como microrganismos por milímetros ($\mu g/ml$) ou microlitros por litro ($\mu l/litro/litro$). 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 "Bergery's Manual of Determinative Bacteriology" (8^a ed., 1974) obedecida. Se o Autor divergir dessa nomenclatura, seu julgamento será respeitado, mas a classificação correspondente ao Manual de Bergery deverá ser mencionada entre parênteses, à primeira vez em que o nome figurar no texto e no resumo.

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

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

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

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

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

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

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

Citações de livros devem ter a seguinte ordem: autor(es), título, edição, local, editores e data. Exemplo:
Miller, S. E. — A textbook of clinical pathology. 6th ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1960.

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

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

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

PROGRAMA DE APOIO A PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

MCT



CNPq



finep

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 Araújo e João Salvador Furtado

Diretor Executivo Walderez Gambale
Instituto de Ciências Biomédicas USP
Deptº de Microbiologia
Av. Prof. Lineu Prestes, 1.374
Cidade Universitária USP
05508 São Paulo - SP

Diretores Associados	Bacteriologia	Maria Therezinha Martins
	Micologia	Claudete Rodrigues Paula
	Virologia	Maria Lúcia Racz

Assistente de Diretoria Maria Helena Colón Silva (SBM)

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 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.

Datilografia Deborah Maria da Conceição (SBM)

Impressão PRODICAFI Gráfica e Editora Ltda.

Sociedade Brasileira de Microbiologia

Diretoria	Presidente Maria Therezinha Martins Inst. de Ciências Biomédicas - USP Deptº de Microbiologia Av. Prof. Lineu Prestes, 1.374 05508 - São Paulo - SP	Vice-Presidente Walderez Gambale Inst. de Ciências Biomédicas - USP Deptº de Microbiologia Av. Prof. Lineu Prestes, 1.374 05508 - São Paulo - SP
	Secretária Geral Lúcia Martins Teixeira Inst. de Microbiologia - UFRJ Centro de Ciências da Saúde - Bl.1 Ilha do Fundão 21944 - Rio de Janeiro - RJ	Tesoureiro Leonardo Perego Jr. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP Conjunto das Químicas Cidade Universitária 05508 - São Paulo - SP
Coordenadores de Programas da SBM	Microbiologia de Alimentos (Sebastião Timóteo Iaria - ICB/USP-SP); Microbiologia Clínica (Sergio E. Longo Fracalanza - UFRJ-RJ); Microbiologia Industrial (Leonardo Perego Jr. - FCF/USP-SP); Microbiologia Ambiental (Maria Therezinha Martins - ICB/USP-SP); Micologia (Benedito Corrêa - ICB/USP-SP); Leveduras (Claudete Rodrigues Paula - ICB/USP-SP); Microbiologia do Solo (Ely Nahas - UNESP-Jaboticabal-SP); Micotoxinas (Mirna Sabino - IAL-SP); Infecções Hospitalares (Carlos Emílio Levy - FMRP).	
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.	
Endereço	Av. Prof. Lineu Prestes, 1.374 05508 - São Paulo - SP Brasil Fone: (011) 813-9647 TELEX 11 35085	

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 20 ABRIL-JUNHO 1989 NÚMERO 2
REV. MICROBIOL. (S. PAULO), 20(2)

CONTEÚDO-CONTENTS	PAG.
Borges, M. de F.; Brandão, S.C.C.; & Pinheiro, A.J.R. Efeito bactericida do peróxido de hidrogênio sobre <i>Salmonella</i> em leite destinado a fabricação de queijos Bactericidal effect of hydrogen peroxide on <i>Salmonella</i> in milk employed to cheese manufacture	145
Queiroz, J.H. de; & Maugeri Filho, F. Otimização da produção de dextra-a-sacarase de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> à partir de melâço como fonte de carbono Optimization of the production of dextranucrase from <i>Leuconostoc mesenteroides</i> using molasses as carbon source	150
Costa, A.L. da; & Levy, C.E. Caracterização do <i>Staphylococcus aureus</i> e do <i>Staphylococcus epidermidis</i> : estudo comparativo entre os testes convencionais e o teste da termonuclease Characterization of <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Staphylococcus epidermidis</i> : comparative study using the conventional tests and the thermostable nuclease test	157
Salvador, S.L. de S.; Baracchini, O.; Ito, I.Y.; & Verri, R.A. Ocorrência de <i>Staphylococcus aureus</i> na saliva, orofaringe e fossas nasais de indivíduos saudáveis Occurrence of <i>Staphylococcus aureus</i> in saliva, throat and nose in healthy individuals	165
Noletto, A.L.S.; & Tibana, A. Sensibilidade a antimicrobianos de <i>Yersinia</i> spp isoladas de alimentos na cidade no Rio de Janeiro Antimicrobial susceptibility of <i>Yersinia</i> spp isolated from foods in Rio de Janeiro	170
Magalhães, M.; & Magalhães, V. Atividade in vitro do Lomefloxacin comparada a do norfloxacin, gentamicina e cefotaxima In vitro activity of Lomefloxacin compared of that Norfloxacin, Gentamicin, and Cefotaxime	174
Merquior, V.L.C.; & Benchetrit, L.C. Efeito de concentrações submínimas inibitórias de penicilina sobre hialuronidase e hemolisina de estreptococos do grupo B Effect of subminimal inhibitory concentrations of penicillin on group B streptococcal hyaluronidase and hemolysin	178
Simionato, M.R.L.; Zelante, F.; & Cunha, R.A. Análise fenética aplicada na elucidação da posição taxonômica de cepas orais de <i>S. sanguis</i> I, <i>S. sanguis</i> II e <i>S. mitis</i> Phenetical study applied in the elucidation of the taxonomical position of oral strains of <i>S. sanguis</i> I, <i>S. sanguis</i> II and <i>S. mitis</i>	184
Simionato, M.R.L.; & Zelante, F. Análise fisiológica de cepas orais de <i>Streptococcus sanguis</i> I, <i>Streptococcus sanguis</i> II e <i>Streptococcus mitis</i> Physiological analysis of oral strains of <i>Streptococcus sanguis</i> I, <i>Streptococcus sanguis</i> II and <i>Streptococcus mitis</i>	190

Lerayer, A.L.S.; & Chopin, M.-C. Perfil de plasmídios e resistência a bacteriófagos em estreptococos lácticos mesófilos Plasmid profiles and bacteriophage resistance of mesophilic lactic streptococci	197
Fulgueira, C.L.; & Bracalenti, B.J.C. de Método rápido y económico para detectar Aflatoxinas y Zearalenona en alimentos para animales Rapid and economic method to detect Aflatoxins and Zearalenone in animal feed	210
Fulgueira, C.; Borghi, A.L.; & Bracalenti, B.J.C. de Inhibición de <i>Aspergillus parasiticus</i> NRRL 2999 por una cepa de <i>Streptomyces</i> sp Inhibition of <i>Aspergillus parasiticus</i> NRRL 2999 for a strain of <i>Streptomyces</i> sp	215
Machado, J.O.; Ferreira, M.E.; Nakazawa, E.K.; Nahas, E.; & Malheiros, E.B. Efeito de inóculo de fungos micorrízicos vesículo arbusculares provenientes de diferentes plantas doadoras sobre o milho Effect of inocula of vesicular arbuscular Mycorrhiza obtained from distinct plantas on corn	223
Silva, M. do R.R.; Silva, S. de P. e; Moraes, D. de F. C.D.; Fernandes, O. de F.L. "Tinea capitis" por <i>Trichophyton verrucosum</i> - Relato de um caso "Tinea capitis" by <i>Trichophyton verrucosum</i> -Case reported	229
Nalin, D.A.; & Kiyan, C. Cultivo de <i>A. niger</i> e <i>A. oryzae</i> em vinhaça de madeira para a produção de biomassa Cultivation of <i>A. niger</i> and <i>A. oryzae</i> on wood vinasse for biomass production	233
Ferraz, A.; Durán, N. Efeito de várias condições no crescimento de <i>Chrysonilia sitophila</i> "TFB 27441" Effect of various conditions on the <i>Chrysonilia sitophila</i> "TFB 27441" growth	240
Goldman, G.H.; Fungaro, M.H.P.; Cereda, M.P.; & Azevedo, J.L. de Resíduos de mandioca induzem uma alta produção de enzimas celulolíticas Cassava residues induce high production of cellulolytic enzymes	246
Cury, A.E.; & Miche, M.P. Atividade de derivados imidazólicos contra espécies de <i>Candida</i> isoladas de pacientes com câncer Imidazole antibiotics activities against <i>Candida</i> species recovered from cancer patients	249
Jerez, J.A.; Candeias, J.A.N.; Durigon, E.L.; & Rács, M.L. Tipos eletroforéticos, de rotavírus bovino Electrophoretic types of bovine rotaviruses	254
Informação Técnico-Científica SBM	258

EFEITO BACTERICIDA DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO SOBRE SALMONELLA EM LEITE DESTINADO A FABRICAÇÃO DE QUEIJOS

Maria de Fátima Borges

Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e
Fruticultura - EMBRAPA
Caixa Postal 007
44380 Cruz das Almas BA, Brasil

Sebastião Cesar Cardoso Brandão
& Adão José Rezende Pinheiro

Deptº de Tecnologia de Alimentos
Universidade Federal de Viçosa
Campus Universitário
36570 Viçosa MG, Brasil

Resumo

O estudo envolveu a ação bactericida do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) sobre *Salmonella typhimurium*, *S. typhi* e *S. dublin*, inoculadas individualmente em leite esterilizado. Os tratamentos foram constituídos pela adição de 0, 200, 400 e 600 ppm de H_2O_2 , a 54°C e 0, 800, 1000, 1200 e 1400 ppm do germicida, a 32°C, durante uma hora de exposição. Após a decomposição do H_2O_2 , pela adição de catalase, procedeu-se a contagem de microrganismos remanescentes nas amostras. Nestas, verificou-se que a atividade bactericida do H_2O_2 foi intensificada com o aumento da sua concentração e temperatura do leite. Na temperatura de 54°C, a destruição de *S. typhimurium* e *S. dublin* ocorreu com adição de 400 ppm de H_2O_2 , e de *S. typhi* com 600 ppm do mesmo. A destruição a 32° C, ocorreu com 1200 ppm de H_2O_2 , em igual tempo de exposição, para as três espécies relacionadas.

Introdução

O alto valor nutritivo e energético do leite, em estado facilmente assimilável, favorece tanto o crescimento de microrganismos desejáveis, a exemplo das bactérias láticas, como os indesejáveis, nos quais se incluem as bactérias do gênero *Salmonella*. Estas causam febres entéricas (febre tifóide) e gastroenterite e representam um problema à saúde pública no mundo todo (5, 14, 19).

A salmonelose veiculada por leite tem sido observada principalmente, em lugares onde a população tem hábito de tomar leite cru. Nos países desenvolvidos, tal hábito é atribuído ao avanço tecnológico da produção, que dispensa pasteurização do leite, e nos subdesenvolvidos ao insuficiente

número de estabelecimentos que assegurem a qualidade sanitária do leite (7, 19). No Brasil é prática comum o consumo de leite "in natura", principalmente na fabricação de queijos, e não há qualquer resultado de pesquisa sobre casos de salmonelose com a ingestão destes alimentos, o que sugere a realização de estudos sobre a ocorrência de *Salmonella* no leite cru. A legislação brasileira exige, no entanto, a pasteurização do leite tanto para consumo na forma fluida como na fabricação de produtos lácticos (4). Essa prática assegura a sanidade do leite, porém interfere na maturação e características sensoriais do queijo (17, 22).

Uma alternativa de destruição dos patógenos no leite destinado a fabricação de queijos, pode ser o emprego de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este tem elevado poder

bactericida, é de fácil aplicação e não apresenta toxidez residual após remoção com catalase (6, 7, 11, 17). Sua ação bactericida varia de acordo com as características do leite como temperatura, pH, estabilidade química e níveis de catalase; além do número e tipo de microrganismos presentes, do tempo de tratamento e concentração do H₂O₂ (1, 12, 13, 23). Seu mecanismo de ação ainda não está completamente elucidado. Acredita-se estar envolvido com a oxidação de grupos sulfidrílicos das proteínas microbianas. O H₂O₂ convertido à radicais hidroxila, altamente reativos, por íons metálicos, podem degradar DNA (2), proteínas, polissacarídios e lipídios (3). O H₂O₂ tem sido recomendado por alguns pesquisadores (10, 17), em substituição a pasteurização, nas concentrações que variam de 200 a 600 ppm. Eles relatam que esses níveis não interferem na atividade de importantes enzimas do leite e microrganismos da fermentação láctica, essenciais na fabricação de queijos. Outros pesquisadores revelam que essas concentrações de H₂O₂ não destroem todos os patógenos do leite, entre eles o grupo *Salmonella* (7, 13, 18). Cook (7) e Satta, citado por Luck (13) observaram a completa destruição de *Salmonella* no leite, em concentrações bem superiores, que variam de 800 a 2000 ppm. Considerando essencial a qualidade sanitária do leite destinado a fabricação de queijos, objetivou-se com o presente trabalho estudar o efeito bactericida do H₂O₂ sobre as bactérias do gênero *Salmonella*.

Material e Métodos

Neste estudo pretendeu-se utilizar leite contaminado por bactérias do gênero *Salmonella*. Estabeleceu-se, no entanto, que a não detecção desse tipo de contaminação nas amostras de leite, provenientes de usina de laticínios da Universidade Federal de Viçosa (UFV), MG, resultaria na inoculação de espécies dessa bactéria em leite esterilizado.

Avaliação populacional de *Salmonella* em leite proveniente da bacia leiteira de Viçosa - MG - Foram amostradas um total de 26 latões do leite recolhido, diariamente, na plataforma de recepção

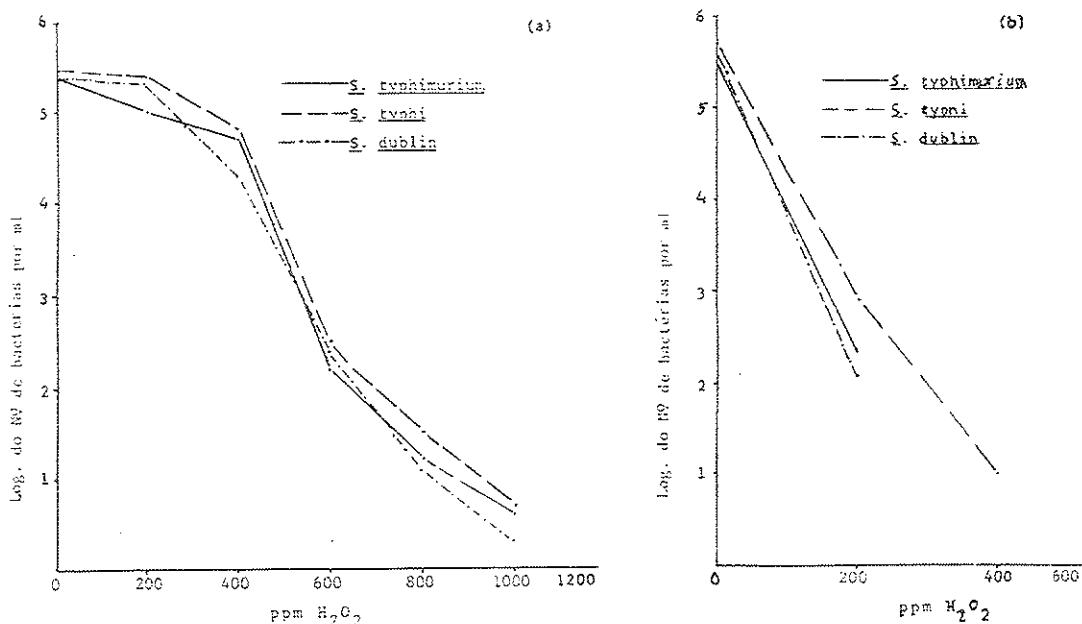
da usina de laticínios da UFV. Essas amostras foram definidas pela raiz quadrada do número de latões de leite provenientes dos 170 produtores daquela bacia leiteira.

As amostras, tomadas ao acaso, foram conduzidas ao laboratório e submetidas às análises para detecção de *Salmonella*. Estas foram feitas segundo técnica preconizada pela International Dairy Federation (9) e constituiram no enriquecimento em meios seletivos; no plaqueamento em meio sólido diferencial; na confirmação sorológica das colônias típicas com antissoro polivalente, flagelar e sonático, de *Salmonella* (Difco).

Efeito bactericida do H₂O₂ sobre *Salmonella* em leite - As amostras foram constituídas por leite em pó desnatado reconstituído. Foram colocadas aliquotas de 200ml desse leite em erlenmeyers com capacidade de 500ml, esterilizadas por 10 minutos a 121°C, resfriadas e, em seguida, inoculadas com as espécies de *S. typhi*, *S. typhimurium* e *S. dublin* (fornecidas pelo Departamento de Bacteriologia da Fundação Oswaldo Cruz - Rio de Janeiro), com populações em torno de 2 x 10⁵ cél./ml. Após a inoculação, incubou-se os erlenmeyers em banho-maria a 36 ± 1°C por 20 minutos, para estabilizar as amostras. Em seguida elas foram tratadas com H₂O₂ comercial (produzido pela Farmatália Carlo Erba, densidade 1,122) padronizado.

Os tratamentos foram constituídos pela adição de 0, 800, 1000, 1200 e 1400 ppm de H₂O₂ às amostras incubadas a 32°C, com 60 minutos de exposição; e pela adição de 0, 200, 400 e 600 ppm H₂O₂ às amostras incubadas a 54°C, com igual período de exposição. Após esse período, as últimas amostras foram, então equilibradas a temperatura de 32 °C e tratadas, juntamente com as demais amostras, com catalase comercial (estéril), obtida de fígado bovino (Sigma Chemical Company, USA). Essa foi adicionada em quantidades pré-estabelecidas, de acordo com sua atividade, para decompor o H₂O₂ residual das amostras em 20 minutos. Essa decomposição foi confirmada pela reação de amido-iodeto de potássio (13). Logo depois, quantificou-se as populações de *Salmonella* nas amostras, empregando-se a técnica de semeadura em profundidade "Pour Plate" (9, 15) em placas de Petri

Figura 1 - Valores das populações de *Salmonella* em leite esterilizado, após tratamento com H_2O_2 , por 60 min., 32°C (a) e 54°C (b).



com ágar verde brilhante vermelho de fenol, e paralelamente efetuou-se um controle, inoculando-se 3 alíquotas de 1ml de leite de cada tratamento, em tubos com caldo nutritivo.

Após incubação, a $36 \pm 1^\circ C$, por 24 horas procedeu-se a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) nas placas de Petri, e determinou-se a presença ou ausência de células injuriadas pela turvação ou não do meio contido nos tubos.

Resultados e Discussão

Avaliação populacional de *Salmonella* no leite proveniente da bacia leiteira de Viçosa - MG - Não foram detectadas bactérias do gênero *Salmonella* no leite proveniente da bacia leiteira de Viçosa. O não isolamento dessas bactérias pode ser atribuído, principalmente, à baixa incidência delas, além da presença de substâncias antimicrobianas produzidas por determinados grupos de bactérias do leite. Ao não isolamento de *Salmonella* em produtos lácticos, Raimundo (16) atribuiu a baixa incidência da mesma no leite,

utilizando como matéria prima. Silva (20) considerou, ainda, pequena a sensibilidade do método de isolamento dessa bactéria. A respeito do método de isolamento adotado, convém salientar que existem várias etapas bastante complexas e que podem afetar a sensibilidade do mesmo. Em produtos lácticos, Reiter & Col., citados pela IDF (8) observaram, também, uma redução na população de *Staphylococcus aureus* e atribuiram-na à presença de substâncias de atividade antimicrobiana produzidas por bactérias lácticas.

Embora não se tenha detectado a presença de *Salmonella* no leite analisado, sugerem-se levantamentos detalhados para assegurar sobretudo a saúde pública, uma vez que, vários pesquisadores (5, 19) isolaram essas bactérias em leite e derivados, envolvidos em surtos de toxo-infecções alimentares, em outros países.

Efeito bactericida do H_2O_2 sobre *Salmonella* em leite - A ação bactericida do H_2O_2 sobre as bactérias do gênero *Salmonella* foi intensificada à medida que aumentou a temperatura do meio e a concentração do agente bactericida (Figura 1a, b).

Verificou-se que a aplicação de 200 ppm de H_2O_2 a 32°C, reduziu 28% e a 54°C mais de 99% das populações das três espécies de *Salmonella*. Essas reduções mais intensas na temperatura mais alta podem ser atribuídas, principalmente, a uma maior atividade germicida, do produto além da inativação da catalase presente no leite. Amim e Olson (1) relataram que o H_2O_2 tem uma atividade máxima em torno de 50°C.

Em concentrações acima de 200 ppm de H_2O_2 aplicado a 54°C, as populações de *S. typhimurium* e *S. dublin* foram reduzidas em forma semelhante e mais intensamente que as *S. typhi*. Essas diferenças entre espécies mostram que o H_2O_2 é mais eficaz sobre algumas espécies. Segundo alguns autores (7, 13, 23) outros fatores como concentração e tempo de exposição do germicida, temperatura, pH, estabilidade química, carga microbiana e níveis de catalase do leite, também interferem na atividade de H_2O_2 .

As populações de *S. typhimurium* e *S. dublin* foram eliminadas, na totalidade, após adição de 1200 ppm de H_2O_2 , a 32°C (Figura 1a) e 400 ppm a 54°C (Figura 1b), com uma hora de exposição. Em estudos semelhantes, Cook (7) e Roundy (17) verificaram a destruição de *S. typhimurium*, após aplicação de 500 ppm de H_2O_2 , a 30°C, por 5 horas; e de 600 ppm desse agente, a 54°C, por um minuto. A respeito da destruição de *S. dublin* em leite, não há referência na literatura consultada.

A eliminação das populações de *S. typhi* com o emprego de 600 ppm de H_2O_2 , a 54°C (Figura 1b), mostra uma maior resistência delas a ação do germicida comparado com as outras espécies testadas. Na temperatura de 32°C essa maior resistência de *S. typhi* não foi observada (Figura 1a). Em temperatura entre 17 e 32°C, Cook (7) e Monaci, citado por Luck (13) observaram, no entanto, a eliminação de *S. typhi* no leite, após aplicação de 2000 ppm de H_2O_2 , por 8-9 horas; e de 1000-1200 ppm durante 4-5 horas.

As concentrações de H_2O_2 capazes de destruir, por completo, as referidas espécies de *Salmonella* no leite (Figura 1a, b) foram confirmadas pela ausência de crescimento de células injuriadas, que pudesse ter resistido

aos tratamentos com essas concentrações e que não se multiplicaram no ágar verde brilhante vermelho de fenol, por este ser um meio seletivo. Tais concentrações podem ser consideradas altas em relação às recomendadas (200-600 ppm) para tratamento do leite destinado a elaboração de queijos. Velloso (21) constatou que o tratamento de leite com concentrações acima de 200 ppm de H_2O_2 , interfere na metodologia de fabricação do queijo de Minas padronizado e altera as características sensoriais do mesmo. Contudo, outros autores (10, 17) asseguram que a aplicação de até 600 ppm de H_2O_2 ao leite não altera a qualidade do queijo.

Considerando que o H_2O_2 é de fácil e remoção, sem produzir resíduos tóxicos no leite e que a aplicação de 600 ppm, a 54°C, durante uma hora, destruiu a *S. typhi*, *S. typhimurium* e *S. dublin* no leite (Figura 1b) e que a Inspeção Industrial e Sanitária do Ministério da Agricultura (4) não permite o uso desse germicida no leite consumido na forma fluída, sugere-se o uso desse processo de sanitização no leite destinado a elaboração de queijos. Esse processo a 32°C (Figura 1a) é no entanto tecnicamente inviável em razão das altas doses de H_2O_2 necessárias para destruir as espécies de *Salmonella* testadas.

Summary

Bactericidal effect of hydrogen peroxide on *Salmonella* in milk employed to cheese manufacture

The present study was realized to test the bactericidal activity of H_2O_2 on *Salmonella typhimurium*, *S. typhi* and *S. dublin* individually inoculated in sterilized milk. The treatments included the addition of 0, 200, 400 and 600 ppm of H_2O_2 at 54°C and 0, 800, 1000, 1200 and 1400 ppm of H_2O_2 at 32°C. Incubation time was 1 hour. After de composition of the H_2O_2 by addition of catalase the remaining microrganisms were counted. It was found that the bactericidal activity of H_2O_2 was intensified by the increase of its concentration and the milk temperature. At 54°C concentrations of 400 ppm of H_2O_2 killed *S. typhimurium* and *S. dublin* while at the same temperature *S. typhi* needed of 600 ppm of H_2O_2 to be eliminated. When the incubation temperature was 32°C all

those species were killed with concentrations of H₂O₂ at 1200 ppm.

Referências Bibliográficas

1. Amim, V.M. & Olson, N.F. - Effect of temperature on stability of hydrogen peroxide in milk. *J. Dairy Sci.*, 50:1336-1338, 1967.
2. Ananthaswamy, H.N. & Elisenstrark, A. - Repair of hydrogen peroxide induced single-strand breaks in *Escherichia coli* deoxyribonucleic acid. *J. Bacterial.*, 130:187-191, 1977.
3. Berglin, E.H.; Edlund, M.B.K.; Nyberg, G.K. & Carlson, J. - Potentiality by L-cysteine of the bactericidal effect of hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J. Bacterial.*, 152:81-82, 1982.
4. Brasil, Ministério da Agricultura. Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. (Aprovado pelo decreto nº 30.691, de 29/03/52, alterado pelo decreto nº 1.255, de 25/06/62. Brasília, 1980. 166p.
5. Chalker, R.B. & Blaser, M.J. - A review of human salmonellosis: Magnitude of *Salmonella* infection in the United States. *Rev. Infect. Dis.*, 10:111-124, 1988.
6. Collins, E.B. - Preservatives in dairy products. *J. Dairy Sci.*, 54:148-152, 1971.
7. Cook, D.J. - Hydrogen peroxide and word's dairy. *The milk industry*, 53:37-41, 1963.
8. International Dairy Federation (IDF). Behavior of pathogens in cheese. Brussels, Belgium, 1980. 23p. (Bulletin Int. Dairy Fed., 122).
9. International Dairy Federation (IDF). Milk and milk products - detection of *Salmonella*. Brussels, 1980. 8p. (IDF Standard, 93).
10. Kosikowski, F.V. - Cheese and fermented milk foods. 2 ed., Ann. Arbor, Michigan, Edwards Brothers. 1977. 711p.
11. Kosikowski, F.V. & Fox, P.F. - Low heat, hydrogen and bactofugation treatments of milk to control califorms in Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.*, 51:1019-1022, 1968.
12. Lal, J.; Khan, B.L. & Kulshrestha, D.C. - Effect of levels of hydrogen peroxide on survival of bacteria in milk. *Asian Journal of Dairy Research*, 4:1-6, 1985.
13. Luck, H. - The use of hydrogen peroxide in milk and dairy products. In: *Milk Hygiene*. Geneva, FAO/OMS, 1962. p.423-447.
14. Marth, L.H. - Salmonellosis associated with milk products. A review. *J. Dairy Sci.*, 52:283-315, 1969.
15. Marth, E.E. - Standard methods for the examination of dairy products. 14 ed. Washington, APHA, 1978. 416p.
16. Raimundo, S.M.C. - Levantamento de microrganismos de interesse em Saúde Pública em alguns produtos de laticínio comercializado no Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1981. 132p. (Tese M.S.).
17. Roundy, Z.O. - Treatment of milk for cheese with hydrogen peroxide. *J. Dairy Sci.*, 41:1460-1465, 1958.
18. Sadileck, J. & Stepanek, M. - The influence of peroxide - catalase treatment of milk and some pathogens: In: *International Dairy Congress*, 16, s.1. 1963. Proceedings... s.1. s.ed. 1963 (Secção, 10).
19. Sharp, J.C.M.; Paterson, G.M.; Forbes, G.I. - Milk-born salmonellosis in Scotland. *J. Infect.*, 2:339-340, 1980.
20. Silva, C.A.M. - Avaliação da qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal. Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro/Instituto de Microbiologia, 1981. 72p. (Tese, M.S.).
21. Velloso, C.R.V. - Ocorrências de brucelas no leite e seu comportamento durante o processamento e cura de queijo Minas Padronizado e Mussarela. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa/Imprensa Universitária, 1985. 124p. (Tese, M.S.).
22. Ventura, R.F. & Rusing, O. - Efetor de vapor-sistema de pasteurização de leite destinado à fabricação de queijos. *Revista do ILCT*, 38:3-16, 1983.
23. Vieira, M.C. - Conservação de soro de queijo Minas com peróxido de hidrogênio. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa/Imprensa Universitária, 1984. 66p. (Tese, M.S.).

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE DEXTRANA-SACARASE DE *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES* À PARTIR DE MELAÇO COMO FONTE DE CARBONO

José Humberto de Queiroz
& Francisco Maugeri Filho

Faculdade de Engenharia de
Alimentos/UNICAMP
13081 Campinas SP, Brasil

Resumo

A produção de dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* B-512F foi realizada em meios de fermentação contendo melaço e água de maceração de milho, como fontes de carbono e nutrientes. Os resultados obtidos não foram muito diferentes daqueles obtidos com um meio bem mais rico. O melhor procedimento em fermentação foi a batelada alimentada com controle do pH. A produtividade foi 13% superior ao resultado obtido com meio rico.

Introdução

A dextrana-sacarase (E.C. 2.4.1.5) é uma enzima produzida extracelularmente por uma grande variedade de microrganismos, principalmente os dos gêneros *Streptococcus* e *Leuconostoc* (19), que tem a propriedade de sintetizar a dextrana a partir da sacarose. A dextrana é um polissacarídeo formado por unidades D-glucopiranósil, com tipos de ligações que variam segundo o microrganismo produtor. A dextrana produzida por *L. mesenteroides* B-512F, industrialmente o microrganismo mais utilizado, apresenta somente 2 tipos de ligações: $\alpha(1,6)$ e $\alpha(1,3)$ (12). O polímero é formado por uma cadeia principal com ligações $\alpha(1,6)$, com ramificações em $\alpha(1,3)$. O tamanho das moléculas pode variar dependendo da temperatura, concentração de sacarose e presença de outros açúcares durante a reação de síntese (16,17). A dextrana nativa apresenta em média um peso molecular entre 40 e 50 milhões de daltons, nas condições industriais atualmente utilizadas. As propriedades deste polímero são bastante específicas, principalmente no que tange ao comportamento reológico (em concentrações até 5% comporta-se como fluido newtoniano (17)) e a capacidade de complexar íons metálicos (18).

Estas propriedades fazem com que a dextrana encontre grande aplicabilidade em diferentes ramos da atividade industrial: expensor de plasma sanguíneo, anti-coagulante (dextrana-sulfato), medicamentos para tratamento de anemias (dextrana-ferro) e descalcificação (dextrana-cálcio), redes moleculares usadas em separação e purificação de compostos, lama de extração em poços de petróleo, entre outros (1, 9, 11, 18). A produção de dextrana é feita tradicionalmente durante o crescimento de *L. mesenteroides* em meio de cultura contendo sacarose e enriquecido com outros nutrientes (4). As condições de cultura estabelecidas por alguns pesquisadores (4, 5, 6) alcançaram bons rendimentos e têm servido de base para a produção industrial. Nestas condições a dextrana possui alto peso molecular e tem que sofrer hidrólise controlada para certos usos consagrados. Outra forma de produção é fazer a enzima dextrana-sacarase, purificada ou em forma de extrato enzimático bruto, agir "in vitro", sintetizando a dextrana a partir de uma solução de sacarose. Este último processo possui uma série de vantagens em relação ao primeiro, pois possibilita o controle e otimização mais rigorosa, tanto na obtenção da enzima por *L. mesenteroides*, quanto na produção da dextrana. O peso molecular do produto

pode desta forma ser controlado não necessitando hidrólise posterior, além do fato de um maior rendimento ser obtido (6, 7). A dextrana-sacarase é produzida tradicionalmente por fermentação em batelada alimentada, com controle de pH a 6,7, temperatura 28°C, aeração de 0,5VVM, em meio extremamente rico (8, 2, 14), obtendo-se uma atividade final de até 14,1UI/ml (2, 14). Alguns autores (3, 20) estudaram a utilização de meios mais pobres, usando água de maceração de milho como fonte de vitaminas e nitrogênio, não obtendo no entanto resultados encorajadores.

A dextrana-sacarase é uma enzima induzida, ou seja, só produzida na presença de um indutor, no caso sacarose. Não se conhece até o presente instante, outro composto que possa substituir a sacarose convenientemente. Devido a este fato é imprescindível a colocação deste açúcar no meio de cultura, que servirá, além do papel de indutor da enzima, como fonte de carbono e energia para o microrganismo. É importante frizar que é igualmente imprescindível a presença de nitrogênio amônico no meio, sem o que a produção da enzima não ocorre. É este fato, aliado à necessidade da presença de sacarose, que sobrecarrega os custos de produção, pois normalmente é usado extrato de levedura para suprir esta necessidade (13).

Este trabalho visa dar uma contribuição a produção de dextrana-sacarase, a partir de matéria-prima de baixo custo, melaço e água de maceração de milho, como fonte de carbono, vitaminas e nitrogênio. Desconhece-se na literatura trabalhos que tenham sido feitos com melaço como fonte de sacarose, possivelmente devido a presença de açúcares invertidos que poderiam influir na produção da enzima.

Material e Métodos

Microrganismo - *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512-F, mantido em estoque a -20°C em solução de glicerol a 10%.

Meio de cultura - O meio padrão

utilizado por Lopes (8) foi: sacarose, 40g/l; extrato de levedura, 20g/l; fosfato de potássio dibásico, 20g/l; sulfato de magnésio, 0,2g/l; cloreto de sódio, 0,01g/l; sulfato ferroso, 0,01g/l; sulfato de manganês, 0,01g/l e cloreto de cálcio, 0,02g/l. O meio alternativo contendo melaço e água de maceração de milho (AMM) foi conseguido depois de uma série de ensaios de otimização do meio de cultura (15). O meio é o seguinte: melaço a 80 BRIX, 50g/l (32g/l de ART); AMM, 10g/l e fosfato de potássio dibásico, 20g/l.

Condições de cultura - Foram utilizadas as condições ótimas de produção da enzima (1): pH 6,7, temperatura a 27°C e aeração a 0,5VVM, em batelada simples e alimentada.

Fermentadores - Foi usado um fermentador mini-ferm da New Brunswick de 1 litro de capacidade. A temperatura foi controlada por um banho termostatizado de circulação externa e o pH controlado pela injeção de NaOH 1N, através de um controlador automático de pH.

Atividade enzimática - Aplicou-se o método descrito por Lopes (8). A atividade é expressa em UDS, onde 1 UDS corresponde a quantidade de enzima que libera 0,52mg de frutose em uma hora.

Açúcares redutores totais (ART) - Centrifugou-se 10ml da amostra de meio de cultura a 10000 RPM, a 5°C. Tomou-se 1ml, do sobrenadante, promovendo-se em seguida a hidrólise ácida da sacarose contida no meio. Para tanto, adicionou-se 1ml de HCl 2N e levou-se a ebulição por 5 minutos.

Após a hidrólise determinou-se o teor de açúcares redutores pelo método do ácido dinitro-salicílico (10).

Crescimento celular - O crescimento foi estimado indiretamente pela medida de absorbância do meio de cultura a 650nm.

Batelada com alimentação exponencial - A alimentação exponencial foi obtida através do artifício de se misturar 400ml de uma solução de sacarose a 500g/l ou 400ml de uma solução de melaço contendo 500g/l de açúcares redutores totais, com 100ml de NaOH 5N, tendo-se, desta forma, uma solução final contendo NaOH 1N e 400g/l de açúcar. Esta solução

foi injetada ao meio de cultura, através de uma bomba peristáltica comandada por um controlador de pH, como descrito acima. Portanto, quando a bomba era acionada pelo controlador, adicionava, além da soda, também o açúcar. Verificou-se que o consumo desta solução era exponencial durante o crescimento exponencial do microrganismo.

Batelada com alimentação linear - A vazão da bomba foi fixada de forma a injetar aproximadamente 18g/hr de açúcar no caso do meio padrão e aproximadamente 16g/hr no caso do meio alternativo. A diferença entre os dois foi resultante de problemas de precisão da bomba.

Medida do volume injetado - Foi obtido através da pesagem contínua do frasco contendo a solução a ser alimentada, com o auxílio de uma balança semi-analítica, e dividindo-se o peso obtido (consumido) pela densidade da solução.

Volume de meio no fermentador - O volume inicial de meio foi sempre 700ml. Durante a batelada alimentada exponencialmente o volume no final da fermentação chegou a aproximadamente 860ml e na batelada alimentada linearmente 1000ml.

Cálculos de rendimento e produtividade
 - Para os cálculos de rendimento foram considerados a atividade enzimática total no fermentador (UDS/ml X volume de meio) e o açúcar total disponível (açúcar inicial e açúcar alimentado). No caso da produtividade, dividiu-se a atividade máxima obtida (UDS/ml) pelo tempo correspondente de fermentação.

Resultados e Discussão

A fermentação em batelada simples de *L. mesentericis* é rápida, atingindo a fase estacionária após 7 a 8 horas de cultura. Nas Figuras 1 e 2 estão expressos estes resultados, com meio padrão (Figura 1) e meio alternativo (Figura 2). Verifica-se que a produção da enzima se dá durante o crescimento do microrganismo e cessa na fase estacionária. A atividade enzimática atingiu 40UDS/ml usando meio padrão e

35UDS/ml em meio alternativo, valores estes muito próximos, principalmente se se considerar que a concentração inicial de açúcares redutores é menor no meio alternativo.

No entanto, a produção de dextrana-sacarase é bem maior em batelada alimentada, com controle do pH. Estabeleceu-se primeiramente a batelada alimentada com alimentação exponencial.

Na Figura 3, com meio padrão, a atividade chegou a 68UDS/ml após aproximadamente 7 horas de fermentação, resultado este bem superior aos 40 UDS/ml obtidos em batelada simples. O decrescimo observado na atividade de dextrana-sacarase no final da fermentação é típico para esta enzima, devido sua baixa estabilidade nas condições de fermentação (27°C, pH 6,7) (8, 2). Por outro lado, a concentração final de substrato (ART) chega a aproximadamente 70g/l, mostrando uma perda considerável de açúcar. Já na Figura 4, verifica-se que o meio alternativo não foi tão eficiente neste tipo de fermentação. A atividade enzimática atingiu um máximo de 50 UDS/ml, após 10 horas de fermentação, ou seja, uma atividade menor num tempo maior, em comparação ao meio padrão, embora o resultado seja maior que o obtido em batelada simples. Da mesma forma que no caso anterior, a concentração residual de substrato no final da fermentação é muito alta (56g/l).

Na alimentação linear, ou seja, velocidade constante de adição de substrato ao longo da fermentação, foi observado um melhor comportamento da cultura, chegando-se a níveis mais altos de atividade enzimática para ambos os meios. Observa-se na Figura 5, com meio padrão, uma produção de dextrana-sacarase máxima após 12 horas de fermentação, com a atividade atingindo 96 UDS/ml. Da mesma forma, pode-se constatar na Figura 6, com o meio alternativo, que a atividade foi maior, 85 UDS/ml, igualmente após 12 horas de fermentação. Porém, nas 2 figuras verifica-se que o problema da alta concentração residual do substrato no final da fermentação ainda persiste. Comparando-se os dois resultados nota-se uma produção da enzima 13% inferior com o meio alternativo.

Como tentativa de diminuir a concentração de açúcar residual,

Figura 1 - Evolução da produção de dextrana-sacarase (UDS), concentrações de massa celular em unidades de absorbância (UA) e substrato (ART), durante o tempo de fermentação em meio padrão.

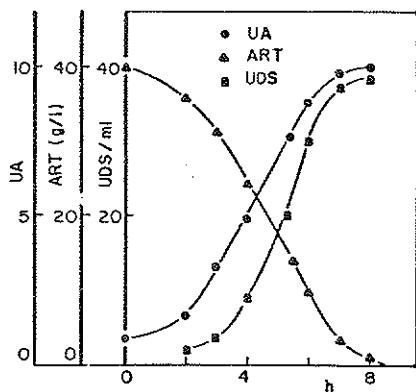


Figura 2 - Evolução da produção de dextrana-sacarase (UDS), concentrações de massa celular em unidades de absorbância (UA) e substrato (ART), durante o tempo de fermentação em meio alternativo.

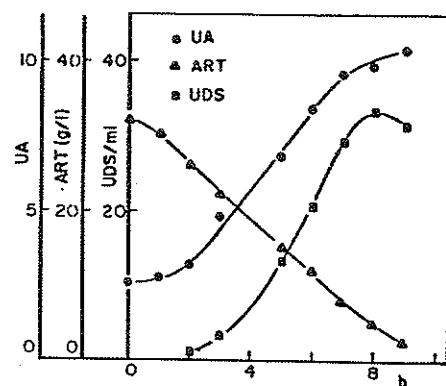


Figura 3 - Evolução da produção de dextrana-sacarase (UDS), concentrações de massa celular em unidades de absorbância (UA) e substrato (ART), durante o tempo de fermentação em meio padrão, em batelada alimentada exponencialmente.

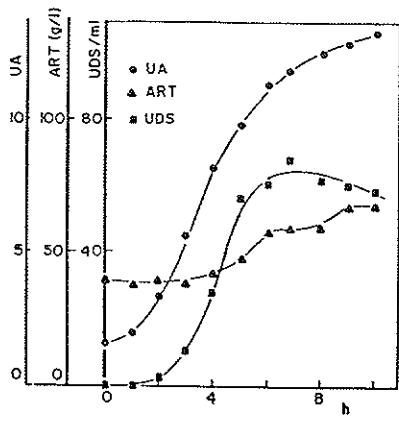
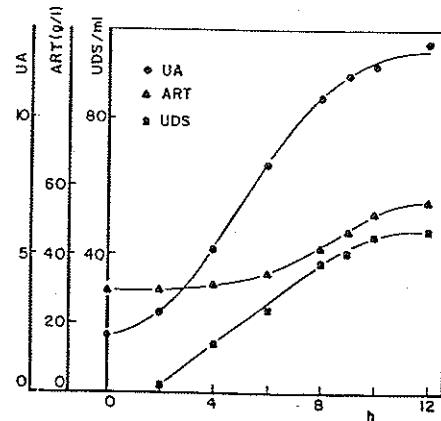


Figura 4 - Evolução da produção de dextrana-sacarase (UDS), concentrações de massa celular em unidades de absorbância (UA) e substrato (ART), durante o tempo de fermentação em meio alternativo, em batelada alimentada exponencialmente.



procedeu-se ao corte da alimentação e controle do pH após 6 horas de fermentação, no final da fase exponencial. Segundo Alsop (1), esta técnica favorece a produção de dextrana-sacarase, assim como diminui

a concentração residual do substrato.

A Figura 7 ilustra os resultados obtidos com meio alternativo. Nota-se que efetivamente houve um decrescimento de ART no final da fermentação, sendo que a atividade enzimática atingiu 68 UDS/ml.

Figura 5 - Evolução da produção de dextrana-sacarase (UDS), concentração de massa celular em unidades de absorbância (UA) e substrato (ART), durante o tempo de fermentação em meio padrão, em batelada alimentada linearmente.

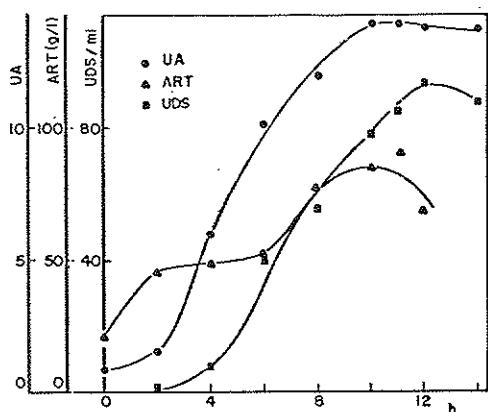


Figura 6 - Evolução da produção de dextrana-sacarase (UDS), concentrações de massa celular em unidades de absorbância (UA) e substrato (ART) durante o tempo de fermentação em meio alternativo, em batelada alimentada linearmente.

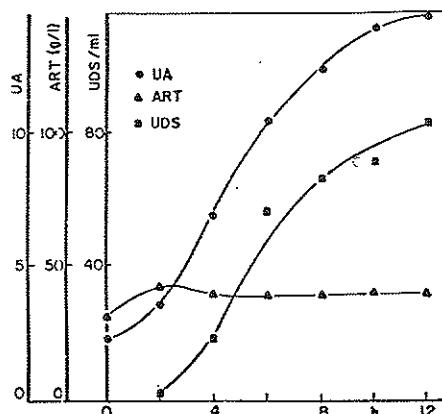
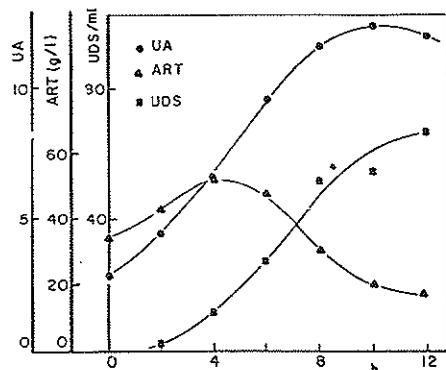


Figura 7 - Evolução da produção de dextrana-sacarase (UDS), concentrações de massa celular em unidades de absorbância (UA) e substrato (ART), com alimentação exponencial e controle pH até 6 horas de fermentação.



Este resultado é um pouco inferior ao resultado precedente, porém superior ao resultado obtido em batelada simples com meio padrão e alternativo.

Os resultados de rendimento e

produtividade de todos os experimentos estão reunidos na Tabela I..

Comparando-se os dados da Tabela, verifica-se que a maior produtividade obtida foi de 9,71 UDS/ml/hr em batelada exponencialmente, com um

Tabela 1 - Resultados finais de atividade dextrana-sacarase (UDS total), rendimento de obtenção da enzima, Y, e produtividade, Pr, nos diferentes ensaios com *L. mesenteroides*. Símbolos: I = Batelada simples; II = Batelada alimentada exponencialmente; III = Batelada alimentada linearmente; IV = Batelada alimentada com corte na alimentação após 6 horas de fermentação.

Meio Padrão				Meio Alternativo			
UDS ml $\times 10^{-3}$	UDS total (UDS/kg ART)	Y (UDS/kg ART)	Pr (UDS/ml/hr)	UDS ml	UDS total $\times 10^{-3}$	Y (UDS/kg ART)	Pr (UDS/ml/hr)
I 40 28		1,00	5,00	35	24,5	1,11	4,37
II 68 60,2		1,17	9,71	50	43	1,01	4,17
III 96 96		0,98	8,00	85	85	0,75	7,08
IV - -		-	-	68	54	1,23	5,67

rendimento de 1,17 UDS/Kg de ART, em meio padrão. No entanto, se considerar que o rendimento obtido na batelada alimentada com corte, 1,23 UDS/Kg de ART, o maior entre todos, e que a produtividade de 5,67 (UDS/ml/hr), foram ambos superiores aos resultados obtidos em batelada simples, pode-se afirmar que houve um avanço na produção de dextrana-sacarase. Primeiramente, porque o meio de cultura é muito mais econômico e, segundo, mesmo sendo um meio mais pobre nutricionalmente, obteve-se alto rendimento e boa produtividade. O uso do melâço e da água de maceração de milho mostrou-se ser, portanto, altamente satisfatório.

Em relação às diferentes tecnologias de fermentação empregadas, verificou-se que a batelada alimentada, seja com alimentação exponencial ou linear, mostrou-se, de uma forma geral, superior ao processo batelada simples. Houve um ganho em produtividade e, em alguns casos, de rendimento. No entanto, a batelada alimentada proporcionou altas concentrações de açúcar residual, o que prejudica o rendimento global do processo. Com o corte da alimentação e do controle do pH no final da fase exponencial de crescimento do microrganismo, evitou-se este problema, com uma vantagem adicional, a de que no final da fermentação a enzima está mais próxima de seu pH ótimo de estabilidade (pH 5,2). Desta forma, a desnaturação da enzima, nas horas finais da fermentação foi

praticamente inexistente. Teve-se uma produtividade 30% superior ao obtido com batelada simples em meio alternativo e 13% superior em relação a batelada simples em meio padrão.

Summary

Optimization of the production of dextranucrase from Leuconostoc mesenteroides using molasses as carbon source

The production of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-512F was studied using molasses and corn steep liquor in the fermentation media, as carbon and nutrient sources. The results were similar to those obtained using a richer medium. The best fermentation procedure was fed-batch with pH control. The result was 13% higher than that one obtained using the rich medium.

Agradecimentos

Agradecemos a FAPESP pelo suporte financeiro que tornou possível a realização deste trabalho.

Referência Bibliográfica

- Alsop, L. Industrial production of dextran. *Progress in Indust. Microbiol.*, 18:1-44, 1983.
- Auriol, D. Production et purification en continu de la dextrane-saccharase de

- Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F. Tese de Doctor Ingenieur número 144, INSA - Toulouse, 1985.
3. Hehre, E.J. - Studies on the enzymatic synthesis of dextran from sucrose. *J. Biol. Chem.*, 163:221-233, 1946.
4. Jeanes, A.R.; Wilham, C.A. & Miers, J.C. - Preparation and characterization of dextran from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B. *Biol. Chem.*, 176:603-615, 1948.
5. Jeanes, A.R. - Dextrans. In: Whistler, R.L. ed. - Methods in carbohydrate chemistry. Academic Press, N.Y., 5:118-132, 1965.
6. Jeanes, A.R. - Preparation of dextran from growing *Leuconostoc* cultures. Methods in carbohyd. Chem., 5:118-127, 1965.
7. Jeanes, A.R. - Extracellular microbial polysaccharides new hydrocolloides of interest to the food industry. *Food Technol.*, 28:34-40, 1974.
8. Lopes, A. - Production, purification et immobilization de la dextrane-saccharase de *Leuconostoc mesenteroides*. Tese de Doctor Ingenieur, número 26, INSA-Toulouse, França, 1979.
9. Maribona, J.L. & Bello, O.M. - La dextrana. Asociación de Técnicos Azucareros de Cuba - Boletim Oficial, 21:65-73, 1966.
10. Miller, G.L. - Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31:426-428, 1959.
11. Murphy, P.T. & Whistler, R.L. Dextrans. In: Whistler, R.L. & BeMiller, J.N. - Industrial Gums: Polysaccharides and their derivatives. N.Y., Academic Press, 1973.
12. Neely, W.B. - Dextran: structure and synthesis. *Adv. Carbohyd. Chem.*, 15:341-369, 1960.
13. Olmo, O.A. - Dextrana técnica. In: Montero, J.V.M. - La industria de los derivados de la caña de azúcar, La Habana, ICIDCA, 1983.
14. Paul, F.; Auriol, O.; Oriol, E. & Monsan, P. - Production and purification of dextran sucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Enzyme Eng.*, 7:267-270, 1984.
15. Queiroz, J.H. - Contribuição ao estudo da produção de dextrane-saccharase por *Leuconostoc mesenteroides*. Tese de Mestrado, número 14/87, Unicamp, Campinas, 1987.
16. Robyt, J.P. - Mechanism of action of dextran sucrase. Proc. Symp. mechanisms of saccharide polymerisation and depolymerisation - Miami Beach, Academic Press, 1980.
17. Sabatier, J.; Chopllin, L.; Monsan, P. & Paul, F. - The effect of synthesis temperature on the rheological properties of native dextran. *Biotech. Letters*, 8:425-430, 1986.
18. Sandford, P.A. & Baird, J. - Industrial utilization of polysaccharides. The polysaccharides, 2:412-490, 1983.
19. Sidebotham, R.L. - Dextrans. *Adv. Carbohyd. Chem. Biochem.*, 30:371-444, 1974.
20. Tsuchiya, H.M.; Koepsell, H.J.; Corman, J.; Bryant, G.; Bogart, M.O.; Feger, V.H. & Jackson, R.W. - The effect of certain cultural factors on production of dextran sucrase by *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Bacteriol.*, 64:521-527, 1952.

Recebido para publicação em 1/07/88

CARACTERIZAÇÃO DO STAPHYLOCOCCUS AUREUS E DO STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS: ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS TESTES CONVENCIONAIS E O TESTE DA TERMONUCLEASE

Ana Lúcia da Costa

Dept^o de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas
Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP
Av. do café s/nº
14049 Ribeirão Preto SP, Brasil

& Carlos Emílio Levy

Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas - Campus
Av. dos Bandeirantes, s/nº
14048 Ribeirão Preto SP, Brasil

Resumo

Para avaliar comparativamente os diferentes testes utilizados na caracterização dos estafilococos, foram testadas a especificidade e a sensibilidade da produção da hemólise, pigmento, coagulase, lecitinase, DNase, e TNase. Foram analisadas 136 cepas de *Staphylococcus* isoladas de materiais clínicos do H.C.F.M.B.P. - USP. Verificou-se, para as cepas não produtoras da enzima coagulase (teste em tubo), concordância de 100% para as provas de lecitinase, DNase, TNase e coagulase fixa; 94,3% para a produção de pigmento e 22,9% para a produção de hemólise e 22,9% para a produção de hemólise em agar sangue. Para identificação do *S. aureus* todos as provas apresentaram boa sensibilidade (acima de 93%), sendo que, só o teste da detecção da TNase, modificada por Menzies, revelou 100% de concordância com a coagulase extracelular. O teste da termonuclease pode ser considerado a primeira opção para a identificação dos estafilococos. Como primeira triagem, podem ser empregadas as provas da lecitinase e a avaliação da hemólise, observada até 36 horas depois da semeadura.

Introdução

Existem dificuldades taxonômicas na diferenciação dos cocos gram positivos que crescem em aerobiose, mas a bacteriologia dispõe de técnicas simples para reconhecer com segurança os *Staphylococcus*, que são os mais importantes desta família (13).

A família *Micrococcaceae* reune, três gêneros: *Planococcus*, *Micrococcus* e *Staphylococcus*, que são cocos gram positivos, catalase positivos (2).

O gênero *Planococcus* facilmente se diferencia por sua mobilidade, mas não é encontrado em infecções humanas (3).

O gênero *Micrococcus*, que também tem pouca importância clínica, comprehende

cocos imóveis que só fermentam a glicose em anaerobiose, diferenciando-se dos *Staphylococcus* que fermentam a glicose com produção de ácido em condições de aerobiose ou anaerobiose.

Atualmente o gênero *Staphylococcus* se compõe de vinte espécies (5), sendo que o *S. aureus* e o *S. epidermidis* são os que mais se associam às infecções humanas. Os *S. aureus* causam principalmente infecções da pele, do sub-cutâneo e mucosas, sendo também agente importante de bactérias, endocardites, osteomielites, meningites, adquiridas na comunidade ou como infecção hospitalar (6).

Os *S. epidermidis* aparecem recentemente como agentes de infecções

pós-operatórias (5).

O *S. saprophyticus* é diferenciado do *S. epidermidis* pelo teste da susceptibilidade à novobiocina, e está mais relacionado com infecções urinárias em mulheres jovens sexualmente ativas (5).

Segundo Kloos, a produção da enzima coagulase é um dos melhores critérios empregados na diferenciação entre o *S. aureus* (coagulase positivo) e o *S. epidermidis* (coagulase negativo) (5, 6).

Na prática laboratorial comumente é empregado o teste da coagulase em lâmina, que detecta a coagulase fixa, a coagulase ausente nos filtrados estafilocócicos (1, 8). Embora este teste seja de fácil execução e rápida leitura, sempre que for negativo, recomenda-se sua confirmação pelo teste em tubo, para detectar a coagulase livre ou extracelular, que oferece maior sensibilidade e especificidade (17), apesar do inconveniente de poder demorar até 24 horas para se obter o resultado.

A coagulase extracelular reage com o fator coagulase reativo do plasma para formar um complexo trombina-coagulase, que converte o fibrinogênio em fibrina, coagulando o plasma (9, 15, 17).

Algumas das demais provas que podem ser utilizadas para diferenciar o *S. aureus* e o *S. epidermidis* são:

Produção de hemólise em agar sangue - Algumas espécies de estafilococos produzem toxinas hemolíticas, sendo que quase todas as cepas de *S. aureus* mostram uma zona de hemólise rápida e forte, e quase todas as cepas de *S. epidermidis* não são hemolíticas, ou produzem uma pequena e demorada zona de hemólise ao redor da colônia em agar sangue de carneiro (5).

Produção de pigmento - Classicamente a pigmentação do *Staphylococcus* foi utilizada na identificação do *S. aureus* e *S. epidermidis*. O pigmento amarelo sugere a presença do *S. aureus* (áureo = ouro) e o pigmento branco sugere o *S. epidermidis* (6).

Produção da lecitinase - A lecitina, pela ação da enzima lipase lecitinase, libera ácidos graxos, que em pH alcalino e em agar hipersalinizado

forma um precipitado visível (4).

As cepas lecitinase positivas são as produtoras de zona de opalescência em torno da colônia ou ao longo da semeadura, e as lecitinase negativas, são as não produtoras da zona de opalescência.

Produção da DNase

A desoxirribonuclease (DNase) é uma enzima extracelular que quebra o DNA em pequenas unidades de compostos nucleotídeos. O teste detecta a habilidade dos microrganismos em quebrar este DNA presente no meio de cultura. O comprimento das sub-unidades formadas depende do tipo de DNase envolvida no processo hidrolítico (14).

A detecção desta enzima também é útil para a diferenciação de gêneros, por exemplo *Serratia* sp (DNase positiva) e *Enterobacter* sp (DNase negativa), ou diferenciação entre espécies: *S. aureus* (DNase positiva) e *S. epidermidis* (DNase negativa), tendo uma elevada concordância com a coagulase na identificação dos *Staphylococcus* (10, 12).

Em alguns trabalhos (8, 10, 12), foram observados resultados significativos tanto falso positivos (DNase positiva para *S. epidermidis*), quanto falso negativos (DNase negativa para *S. aureus*).

Teste da termonuclease - O teste da termonuclease (TNase), que detecta nuclease termoestáveis também é um método de elevada especificidade e sensibilidade para caracterizar os *S. aureus* e os *S. epidermidis* (15). No entanto, sua técnica só se tornou praticável na rotina laboratorial mais recentemente, revelando-se um método alternativo para o teste da coagulase livre (10).

Algumas cepas de *Staphylococcus* podem revelar falsos resultados no teste da termonuclease, mas a presença desta enzima é específica para o *S. aureus*, pois o tratamento térmico só inativa as nuclease produzidas pelo *S. epidermidis* e *Micrococcus* (12, 16).

Objetivo

Com a finalidade de avaliar comparativamente os diferentes testes utilizados para a caracterização do *S.*

aureus, procurando uma alternativa para substituir a prova da coagulase extracelular, nos propusemos:

Testar a sensibilidade e especificidade da produção da coagulase fixa, lecitinase, pigmento, hemólise, DNase e TNase, considerando a prova da coagulase extracelular como teste padrão.

Material e Métodos

Procedência das cepas - No período de setembro a dezembro de 1985 foram isoladas 136 (cento e trinta e seis) cepas de estafilococos no laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (H.C.F.M.R.P. - U.S.P.), procedentes de diversos materiais clínicos de pacientes hospitalizados ou atendidos em ambulatórios.

Estas cepas foram semeadas em tubos contendo ágar Müller - Hinton e conservadas em geladeira até a execução dos testes.

Provas de Identificação - A hemólise produzida pelos estafilococos foi observada em ágar sangue de carneiro a 5%, incubadas 24 horas a 37°C. A observação foi feita em microscópio esterioscópico, com um aumento de 40 vezes.

Foram consideradas hemolíticas as cepas produtoras de hemólise ampla ou moderada em culturas de até 72 horas. As cepas não hemolíticas são as que não apresentaram zona de hemólise ou que produziram um halo ou igual a 1mm em 72 horas (5).

A produção de pigmento foi observada nas culturas em ágar Muller - Hinton e ágar sangue de carneiro, após incubação a 37°C durante 24 horas, considerando-se sem pigmentação (pigmento branco), as culturas não produtoras de pigmento amarelo até o quarto dia em temperatura ambiente.

O teste da atividade lecitinásica foi realizado em agar hipersalinizado, adicionado de emulsão de gema de ovo, com um pH final entre 7,4 - 7,6 (11).

Para a detecção da enzima coagulase, trabalhamos com cepas de culturas recentes em ágar sangue de carneiro a 5%.

O teste em lâmina para a pesquisa da

coagulase fixa (C.F.) foi realizado emulsionando as cepas em plasma de coelho diluído (1:2) em solução fisiológica (0,85% NaCl). Para controle de cepas rugosas, também emulsionamos as cepas em solução fisiológica.

Para a detecção da coagulase extracelular (C.E.C.), as colônias de culturas recentes foram inoculadas em tubos de ensaio, contendo o plasma diluído e encubadas em banho-maria 37°C, com observação em intervalos de 2, 4, 6, 24 horas.

O ensaio utilizado para a pesquisa da desoxirribonuclease foi o DNase test agar (Merck), com o indicador azul de o-toluidina.

As cepas foram semeadas e encubadas a 37°C, durante 24 horas.

As cepas produtoras da enzima DNase, apresentaram um halo roséo ao redor da sementeira, indicando hidrólise do DNA.

O método proposto por Lachica & Col. (7), para a pesquisa da termonuclease (TNase), usando cultura em Brain Heart Infusion (BHI), nos dá um resultado em 24 horas. Foi empregado neste trabalho a técnica modificada por Menzies (10), que fornece o resultado em menor tempo.

Consiste a técnica em utilizar um tubo capilar para remover uma colônia da cultura em agar sangue. A colônia e o agar foram empurrados para o centro do tubo e as duas extremidades do tubo capilar foram fechadas em chama de bico de Bunsen. Cada tubo foi identificado com fita adesiva e submerso em banho-maria fervente durante 15 minutos.

As extremidades de cada tubo foram quebradas e a colônia e o agar foram empurrados, com agulha de sementeira, para uma placa de agar DNase Azul de toluidina - "O" (TB-DNase agar) para a pesquisa da termonuclease, que foi incubada a 37°C durante 4 (quatro) horas.

O agar Azul de toluidina "O" para a pesquisa da TNase foi preparado a partir de DNase test Agar (Merck), com a seguinte composição e técnica de preparo:

TRIS (hidroximetil amino metano)...	0,61g
Água destilada.....	100,0ml
Ajustar o pH 9,0 e adicionar:	
DNase test agar.....	0,63g
Cloreto de sódio.....	0,925g
Agar.....	0,775g
Solução de Cloreto de Cálcio anidro (0,11%).....	1,0ml
Ferver para a dissolução dos ingredientes	

e adicionar:

Solução de Azul de Toluidina - "O" a 1%.....0,92ml

Distribuir em placas de Petri (90mm) e riscar o verso da placa, identificando aproximadamente 30 espaços para a realização de 30 testes.

Depois de 2 a 4 horas de incubação, aparece nas cepas produtoras da enzima TNase, um halo roséo.

Uma característica importante do TB-DNase agar, é sua alta estabilidade, não sendo necessário esterilizá-lo mesmo quando é estocado a temperatura ambiente por um período de 4 (quatro) meses. Além disto, o TB-DNase agar estocado pode ser aquecido várias vezes para o preparo de novas placas, sem comprometimento do seu desempenho. A estabilidade deste meio de cultura pode ser atribuída à propriedade inibitória do azul de toluidina frente às bactérias gram positivas, especialmente as esporuladas, e à estabilidade do complexo "azul de toluidina-DNA" ao aquecimento.

Resultados

A identificação das 136 cepas de estafilococos isoladas, baseou-se na produção ou não de coagulase extracelular, que é um teste considerado como critério primário de diferenciação das espécies de *Staphylococcus* (1, 8).

Baseando neste critério encontramos 101 cepas de *S. aureus* (74,3%) e 35 cepas de *S. epidermidis* (25,7%), isolados nos materiais biológicos

conforme mostra a Tabela 1.

Os espécimes classificados em material cirúrgico compreendem as culturas isoladas em: fistula, ferida cirúrgica, catéter, prótese, secreção traqueal e líquido pleural.

Como tecido cutâneo e sub-cutâneo, foram classificados os microrganismos isolados em: pústula, abscesso, umbigo de récem-nascidos, impetigo e pele.

Mucosas, compreendem as cepas isoladas em: úlcera de córnea, escarro, amígdala, orofaringe e secreção conjuntival, nasal e dos órgãos genitais.

Os espécimes classificados em "outros", compreendem as culturas isoladas em: secreção de ouvido, osso, liquor, sangue, urina e secreções em geral.

Os resultados do teste da coagulase livre ou extracelular, comparados com as demais provas para a caracterização das duas espécies de estafilococos estão apresentados na Tabela 2.

O desempenho comparativo das 7 provas utilizadas para distinguir as espécies de *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis* pode ser observado na Tabela 3.

Discussão dos Resultados

O maior número de isolamentos de estafilococos, dos materiais biológicos analisados, encontramos nos espécimes provenientes das mucosas (44,1%) e tecidos cutâneo e sub-cutâneo (31,6%) (Tabela 1).

Em relação às espécies, o *S. aureus* foi mais isolado em mucosas e tecido cutâneo e sub-cutâneo, enquanto que o *S. epidermidis* predominou no material proveniente de mucosas.

Os resultados dos testes em tubo para

Tabela 1 - Distribuição de 136 cepas de estafilococos segundo a espécie e o material clínico

Especimes	<i>S. aureus</i> nº	<i>S. epidermidis</i> nº	Total	%
Mat. cirúrgico	11	3	14	10.3
Mucosas	40	20	60	44.1
Tec. cut. e sub-cutâneo	37	6	43	31.6
outros	13	6	19	14.0
Total	101	35	136	100.0

deteção da coagulase extracelular, e em lâmina para a detecção da coagulase fixa, revelaram concordância de 100% para as cepas não produtoras da enzima coagulase (nenhum falso positivo). Para as cepas produtoras da coagulase, o teste em lâmina revelou 2,0% de resultados falso negativos (Tabela 4).

As Tabelas 2, 3 e 4 mostram que para a identificação do *S. epidermidis* houve concordância de 100% para a negatividade das provas da coagulase extracelular e lecitinase, e para a identificação do *S. aureus* a concordância de positividade das provas de coagulase e lecitinase foi de 95%, sendo que a lecitinase apresentou 5% de resultados falso negativos. Das 5 (cinco) cepas de *S. aureus* não produtoras de lecitinase, 3 (três) também apresentaram zona de hemólise demorada e uma não produziu pigmento (Tabela 3).

Quanto à DNase não foram observados resultados falso positivos como citam alguns trabalhos (11, 16, 17), sendo sua especificidade de 100% em relação à coagulase extracelular (Tabelas 3 e 4). Sua sensibilidade foi de 93% e as cepas DNase negativas (falso negativas) não apresentaram falsos resultados para os demais testes (Tabelas 4 e 5).

A probabilidade de se identificar corretamente um estafilococo coagulase positivo utilizando qualquer uma das provas relacionadas, obtém-se através do seu porcentual de sensibilidade em relação à prova da coagulase extracelular (Tabela 5). Por outro lado, a especificidade destas provas traduz-se pela probabilidade de se identificar corretamente um estafilococo coagulase negativo.

A identificação do *S. aureus* pelo teste da TNase, modificado por Menzies (10), nos forneceu resultados dentro do tempo esperado, com no máximo 4 horas de incubação.

A Tabela 5 mostra 100% de especificidade e sensibilidade para o teste da TNase, não apresentando nenhum falso resultado (Tabela 4).

As outras duas provas de identificação das espécies de estafilococos, produção de hemólise em agar sangue e pigmentação das colônias, revelaram uma sensibilidade de 98% e 93% em relação às cepas coagulase positivas.

Tabela 2 - Comparação do teste de coagulase extracelular com os demais testes usados na identificação de 136 cepas de estafilococos.

Símbolos: + = Ampla zona de hemólise em 24 a 36 horas; (+) = Zona de hemólise demorada em 48 a 72 horas; - = Pequena zona de hemólise (< 1mm) ou ausência de hemólise em 72 horas.

	Coagulase extracelular	
	Positiva nº cepas	Negativa nº cepas
Lecitinase	+ 96 - 5	0 35
Dnase	+ 94 - 7	0 35
TNase	+ 101 - 0	0 35
Hemólise ⁺	+ 82 (+) 17 - 2	0 27 8
Pigmento	amarelo 94 branco 7	3 32
Coag. fixa	+ 99 - 2	0 35

As duas cepas de *S. aureus* não hemolíticas revelaram concordância total com as outras provas de identificação utilizadas (Tabela 3).

As cepas de *S. epidermidis*, mostram especificidade de 20% em relação à hemólise, sendo que normalmente este microrganismo não produz hemólise (Tabela 5). As 28 (vinte e oito) cepas hemolíticas apresentaram zona de hemólise demorada (Tabela 3).

Quando consideramos apenas a hemólise ampla (em 24 ou 36 horas), esta prova ofereceu 100% de concordância com a prova da coagulase. Após 36 horas esta prova apresentou resultados discordantes.

Os porcentuais de sensibilidade e especificidade da produção de pigmento foram considerados elevados.

Quando compararmos o teste da coagulase fixa com a coagulase extracelular, verificamos a discordância em duas amostras (Tabela 3). Estes resultados

Tabela 3 - Relação entre as diferentes provas de utilizadas para caracterizar as 136 cepas de estafilococos.

Símbolos: C.E.C. = Coagulase e extracelular; C.F. = Coagulase fixa; Lec. = Lecitinase; Pig. = Pigmento; Hem. = Hemólise; * + = Ampla zona de hemólise em 24 a 36 horas; (+) = Zona de hemólise demorada em 48 a 72 horas; - = Pequena zona de hemólise ($\leq 1\text{mm}$) ou ausência de hemólise em 72 horas.

Espécies	C.E.C.	C.F.	Lec.	Pig.	Hem.*	DNase	TNase	Total
<i>S. aureus</i>								
	+	+	+	+	+	+	+	68
	+	+	+	+	(+)	+	+	11
	+	+	+	+	+	-	+	7
	+	+	+	-	+	+	+	4
	+	+	-	+	(+)	+	+	3
	+	+	+	-	(+)	+	+	2
	+	-	+	+	+	+	+	1
	+	-	+	+	(+)	+	+	1
	+	+	-	+	+	+	+	1
	+	+	-	-	+	+	+	1
	+	+	+	+	-	+	+	2
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	+	(+)	-	-	3
	-	-	-	-	-	-	-	8
	-	-	-	-	-	(+)	-	24
								136

Tabela 4 - Falsos resultados obtidos nos testes usados na identificação das 136 cepas de estafilococos em relação à coagulase extracelular.

Símbolos: *(FN) = Porcentagem de resultados falso negativos; **(FP) = Porcentagem de resultados falso positivos.

	Coagulase extracelular	
	Positiva	Negativa
	% (FN)*	% (FP)**
Lecitinase	5,0	0,0
DNase	7,0	0,0
TNase	0,0	0,0
Hemólise	2,0	77,1
Pigmento	7,0	5,7
Coagulase fixa	2,0	0,0

falso negativos são confirmados pelas demais provas que foram todas concordantes com a prova da coagulase extracelular.

Tabela 5 - Sensibilidade e Especificidade dos testes empregados na diferenciação das espécies de estafilococos em relação à coagulase extracelular (em porcentagem).

	Sensibilidade	Especificidade
Lecitinase	95,0	100,0
DNase	93,0	100,0
TNase	100,0	100,0
Hemólise	98,0	22,9
Pigmento	93,0	94,3
Coagulase fixa	98,0	100,0

Conclusões

Baseando em nosso material concluímos:

- Pela rapidez, sensibilidade e especificidade, o teste de termonuclease, modificado por Menzies, pode ser considerado a primeira opção para a identificação dos estafilococos.
- A prova da lecitinase, juntamente

com a avaliação da hemólise observada até 36 horas (habitualmente as cepas hemolíticas são da espécie *aureus*), podem ser os métodos empregados como primeira triagem na identificação dos estafilococos, por serem de fácil execução, terem boa sensibilidade e especificidade e serem de baixo custo. Porém, todas as cepas lecitinase negativas deverão ser submetidas a outras provas, como por exemplo o teste da TNase.

3 - Quando realizados dois ou mais testes, como DNase - TNase, coagulase fixa e extracelular e lecitinase, deve-se considerar o(s) resultado(s) positivo(s).

Summary

Caracterization of Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis: comparative study using the conventional tests and the thermostable nuclease test

To estimate comparatively the different tests employed in the characterization of the genus *Staphylococcus*, the specificity and the sensibility of hemolysis, pigment, coagulase, lecitinase, deoxyribonuclease (DNase) and thermostable nuclease (TNase) production, were tested. One hundred thirty six clinical isolates from the "Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo", were analysed. Extracellular coagulase negative strains, were negative in 100% for lecitinase, DNase, TNase and fixed coagulase (slide technique); 94.3% for pigment production and 22.9% for the hemolysis production in blood agar. The tests used to identify the *S. aureus* have shown a sensibility of more than 94%, but only the TNase test, modified by Menzies, had a 100% concordance to the extracellular coagulase test. The thermostable nuclease test can be considered as the first option to the *Staphylococcus* identification, but for the first screen, lecitinase and hemolysis production can be employed.

Agradecimentos

Agradecemos ao H.C.F.M.R.P. - USP os

recursos materiais que viabilizaram o presente trabalho.

Referências Bibliográficas

- Barry, A.L. & Cols. - Identificação de *S. aureus* by simultaneous use of tube coagulase and thermonuclease tests. *Appl. Microbiol.*, 25:496-497, 1973.
- Buchanan, R.E. & Gibben, N.E. - Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8 ed. Baltimore, Williams and Wilkins Company, 184-186, 1977.
- Facklam, R.R. & Smith, P.B. - The Gram Positive Cocci. *Human Pathology*, 7(2):187-192, Mar 1976.
- Ito, I.Y. & Cols. - Emprego da Gema de Ovo no Isolamento de *S. aureus*. *An. Microbiology*, 16:189-192, 1969.
- Kloos, W.E. & Jorgensen, J.H. - Estafilococos. In: Lennette, E.H.; & Cols. *Manual de Microbiologia Clínica*. Trad. Aida Victoria. Wasserman. 4 ed. Buenos Aires, Editorial Panamericana, p.189-201, 1987.
- Kloos, W.E. & Smith, P.B. - *Staphylococcus* In: Lennette, E.H. & Cols. *Manual of Clinical Microbiology*. 3 ed. Washington, American Society of Microbiology, p.83-87, 1980.
- Lachica, R.V. & Cols. Metachromatic Agar Diffusion Methods for Detecting Staphylococcal Nuclease Activity. *Appl. Microbiol.*, 21:585-87, 1971.
- Lachica, R.V.F. & Cols. Nuclease Production and Lysostaphin Susceptibility of *Staphylococcus aureus* and other Catalase Positive Cocci. *Appl. Microbiol.*, 21(5):823-826, 1971.
- Mac Faddin, J.F. - Pruebas Bioquímicas Para La Identificación De Bacterias De Importancia Clínica. Trad. Irma Lorenzo. Buenos Aires, Panamericana, p.50-55, 1980.
- Menzies, R.E. - Comparison of coagulase, deoxyribonuclease (DNase), and heat - Stable Nuclease tests for Identification of *Staphylococcus*. *J. Clin. Path.*, 30:606-608, 1977.
- Papaevangelou, G. & Papavassilov, J. - Comparison of Desoxyribonuclease Activity to Some Other Criteria of *Staphylococcus* Pathogenicity. *Path. Microbiol.*, 30:59-63, 1967.
- Rossi Jr, I.O. & Cols. - Estudo Comparativo entre os testes da Coagulase e Termonuclease na Identificação de *Staphylococcus*. *Rev. Microbiol.*, 16(4):269-271.

- 13.Vernin, C.S. & Tanaka, A.M.U. - *Staphylococcus aureus* e as Estafilococcias Humanas. In: Veronese, R. Doenças Infecciosas e Parasitárias. 7 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.264-274, 1982.
- 14.Washington, J.A. - Laboratory Procedures in Clinical Microbiology. New York, Springer - Verlag New York Inc., 203, 1981.
- 15.Washington II, J.A. - Bacteriologia Médica. In: Tood, Sanford & Davidson. Diagnósticos Clínicos e Conduta Terapêutica por Exames Laboratoriais. 16 ed. Ed. Manole, 2:1722-24, 1983.
- Zierdt, C.D. & Golde, D.W. - 16.Deoxyribonuclease Positive *Staphylococcus epidermidis* strain. Appl. Microbiol., 20:54-57, 1980.
- 17.Zanon, O. & Cols. - Provas Diferenciais de *Staphylococcus*. Ar. Bras. Med., 58(64):373-375, 1984.

Recebido para publicação em 25/07/88

OCCORRÊNCIA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS NA SALIVA, OROFARINGE E FOSSAS NASAIS DE INDIVÍDUOS SADIOS

Sérgio Luiz de Souza Salvador
Octávio Baracchini
Izabel Yoko Ito

Deptº de Ciências da Saúde
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Ribeirão Preto - USP
Campus de Ribeirão Preto
14049 Ribeirão Preto SP, Brasil

& Regis Alonso Verri

Faculdade de Odontologia da Fundação
Educacional de Barretos
17780 Barretos SP, Brasil

Resumo

Staphylococcus aureus foi pesquisado na saliva, orofaringe e fossas nasais, de 318 indivíduos sadios, acadêmicos de Odontologia. A semeadura direta e após enriquecimento dos diferentes materiais, no meio ágar hipercloretado - gema de ovo permitiu evidenciar 266 (83,6%) portadores de *S. aureus*. Desses, 255 (95,9%) foram detectados pela semeadura direta, e os 11 restantes (4,1%) exclusivamente salivares, a partir da semeadura no meio de enriquecimento. Os portadores salivares (236, 74,2%), foram em maior número que os portadores orofaríngeanos (166, 52,2%) e nasais (124, 39,0%). Das 259 cepas submetidas à fagotipagem, 237 (91,5%) delas foram fagotipáveis e a maioria das cepas, independentemente da sua origem, acumularam-se nos grupos bacteriológicos I e III. A colonização dos três nichos no mesmo portador tende a ser feita por cepas pertencentes aos mesmos fagótipos.

Introdução

Na vasta literatura científica mundial acumulam-se publicações referentes à importância do *Staphylococcus aureus* na Patologia Médica, na Odontológica e na Veterinária. A espécie humana é particularmente sensível ao *S. aureus*, na qual esse microrganismo além de causar doenças, pode muitas vezes dar origem a infecções assintomáticas.

Ainda que possa colonizar diferentes regiões do organismo, há um consenso em que os maiores reservatórios do *S. aureus*, sejam respectivamente as fossas nasais e a orofaringe (18). Por outro lado, são vários os trabalhos que ressaltam as repercussões mórbidas decorrentes da presença do

estafilococo patogênico na cavidade bucal (1, 17, 21, 24, 25).

Albergando o microrganismo em locais de fácil acesso e disseminação, o portador de *S. aureus* pode constituir-se em problema quando em ambientes específicos como hospitais, maternidades, ambulatórios, indústrias de alimentos e consultórios odontológicos (4, 10, 22) tendo as estafilococcias adquirido características de doença profissional, sendo bastante comuns as infecções hospitalares causadas por esses microrganismos (9, 16).

A atividade clínica do cirurgião dentista requer uma grande proximidade física com o paciente, bem como, devido às suas condições de trabalho estarem relacionadas com inúmeros fômites e

instrumentos que podem atuar como veículos de difusão. Assim, inquéritos sobre portadores de *S. aureus* têm sido realizados, também, entre acadêmicos de Odontologia (2, 3, 7, 13, 15, 20).

Desse modo, o objetivo deste trabalho foi o de estimar a ocorrência de *S. aureus* na saliva, na orofaringe e nas fossas nasais de indivíduos saudáveis, estudantes de Odontologia, procurando-se ainda verificar a suscetibilidade das cepas obtidas aos fagos.

Material e Métodos

Amostras - A saliva e os materiais da orofaringe e das fossas nasais foram obtidos de 318 indivíduos saudáveis, os quais não haviam feito uso de antibióticos e/ou anti-sépticos bucais nos sete dias anteriores à coleta, alunos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP.

Cerca de 2,0ml de saliva não estimulada foi coletada em tubos de ensaio com pérolas de vidro, enquanto que os materiais da orofaringe e das fossas nasais foram obtidos pela fricção de zaragatoas, respectivamente, na região dos pilares amigdalianos e do vestíbulo nasal.

Isolamento - No tocante à saliva, após homogeneização, 0,1ml foi semeado diretamente em uma placa de ágar hiperclorotado-gema de ovo-ágar-Ni (12). À saliva remanescente foi adicionado, para enriquecimento, igual volume de caldo simples em concentração dupla, que após homogeneização foi incubado em aerobiose a 37°C por 24 horas e depois mantido à temperatura ambiente.

Os materiais provenientes da orofaringe e das fossas nasais foram semeados diretamente no ágar-Ni, pela técnica de esgotamento e as zaragatoas foram então introduzidas em tubos de caldo simples para o enriquecimento, a seguir incubados em aerobiose a 37°C por 24 horas, sendo posteriormente mantidos à temperatura ambiente. As placas de ágar-Ni foram incubadas em aerobiose a 37°C por 48 horas.

Naqueles materiais em que a semeadura direta não denotava crescimento ou presença de colônias suspeitas de serem estafilococos,

efetuou-se a semeadura dos materiais enriquecidos em ágar-Ni, incubando-os em aerobiose a 37°C por 48 horas.

Identificação - As colônias suspeitas, produtoras de halo de opalecência no meio de cultura acrescido de gema de ovo (lecitinase-positivas), assim como aquelas que apesar de não produzirem halo, apresentavam características macro-morfológicas compatíveis a estafilococos, foram submetidas à confirmação microscópica, após coloração de Gram.

A caracterização das cepas foi pela pesquisa de coagulase-conjugada, de acordo com a técnica de Cadness-Graves & Col. (6), modificada segundo Ito (11). A prova de lecitinase foi realizada pela técnica idealizada e descrita por Ito & Col. (12), empregando-se o meio de ágar-Ni.

A fagotipagem foi realizada no Laboratório de Estreptococos e Estafilococos, Secção de Fagotipagem do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da FMRP-USP, sendo a metodologia adotada a proposta por Blair & Williams (5).

Foram enviadas à fagotipagem somente as 259 cepas de *S. aureus*, isoladas à partir da semeadura direta, das quais, 207 eram provenientes de 69 indivíduos que albergavam o estafilococo concomitantemente na saliva, orofaringe e fossas nasais. As 52 cepas restantes eram provenientes de 26 indivíduos que apresentavam o microrganismo simultaneamente na saliva e fossas nasais.

As cepas foram expostas à ação fágica a 1xRTD "Routine Test Dilution" e, quando necessário, a 100xRTD (21). Os fagos utilizados foram os seguintes: Conjunto Básico Internacional; Grupo I - fagos 29, 52, 52A, 79 e 80; Grupo II - fagos 3A, 3C, 55 e 71; Grupo III - fagos 6, 42F, 47, 53, 54, 75, 77, 83A, 84 e 85; Não classificados - fagos 81, 94, 95 e 96. Além desses, foram também utilizados os fagos experimentais 86, 88, 89, 90, D-11, HK2 e o fago extra 187.

Resultados e Discussão

A constatação de 266 (83,6%) portadores de *S. aureus* dentre os 318 indivíduos examinados pode ser

Figura 1 - Representação gráfica da distribuição de *S. aureus* em 266 portadores de acordo com os nichos de isolamento.

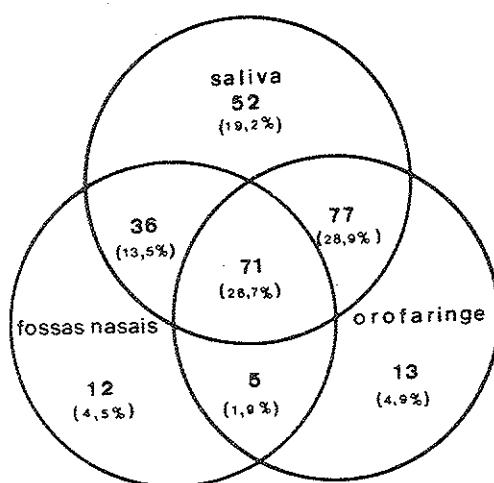
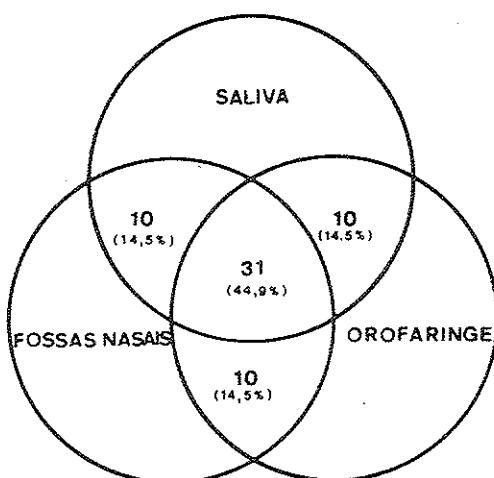


Figura 2 - Representação gráfica da distribuição das cepas de *S. aureus* isoladas da saliva, orofaringe e fossas nasais, de 69 portadores concomitantes, em relação à fagotipagem.



considerada bastante elevada, pois diversos autores têm relatado que os índices de portadores adultos não relacionados com ambientes hospitalares variam entre 30,0 a 60,0% (8, 13, 14, 15, 20).

A utilização de duas técnicas de semeadura direta no ágar Ni e a semeadura após o enriquecimento em caldo simples mostrou ser mais eficiente no isolamento do *S. aureus* do que apenas uma delas, uma vez que, dos 266 portadores, 255 (95,9%) foram detectados pela semeadura direta, enquanto que 11 (4,1%) exclusivamente salivares teriam sido omitidos se não fosse empregado o meio de enriquecimento.

O índice de portadores salivares 236 (74,2%) foi maior do que o de portadores orofaríngeos 166 (52,2%) e do que o de portadores nasais 124 (39,0%).

Em relação a saliva, os resultados obtidos são elevados frente aos da literatura (14, 15, 19, 23, 24, 25) e provavelmente se devem: ao processamento imediato das amostras, a utilização de pérolas de vidro, empregadas para homogeneização e melhor fluidificação da saliva, bem como ao meio de cultura empregado.

A distribuição dos portadores de *S. aureus* segundo os diferentes nichos

estudados, permite inferir a importância da saliva como reservatório desse microrganismo, uma vez que o número de casos positivos foi sempre maior nas amostras salivares (Figura 1). Estes achados, a exemplo daqueles obtidos por outros investigadores (14, 15, 19, 25), ressaltam a importância da área bucal, momente a saliva, como possível fonte de contágio e disseminação do *S. aureus*.

Considerando-se os índices de portadores orofaríngeos e nasais, os resultados ora obtidos, estão em conformidade com a maioria dos pesquisadores que relatam índices de portadores variando entre 30,0 e 60,0%.

A fagotipagem efetuada com 31 fagos, sendo 23 do conjunto básico, 7 do grupo experimental e 1 fago extra, nas concentrações de 1 x RTD e 100 x RTD possibilitou a tipagem de 237 (91,5%) das 259 cepas submetidas à essa prova (Tabela 1), o que demonstra a adequacidade do elenco de fagos, uma vez que o valor mínimo recomendado pelo Subcomitê Internacional de Fagotipagem é de 80,0%.

No tocante a distribuição das 237 cepas tipáveis, segundo a sua origem nos diferentes grupos bacteriófágicos apresentada na Tabela 2 nota-se a maioria das cepas foram lisadas por fagos do grupo I (24,1%), seguidos pelo grupo III (21,5%) e pelos fagos não

Tabela 1 - Resultados da fagotipagem de 259 cepas de *S. aureus*, de acordo com a origem das amostras.

Origem	Número de casos	Tipáveis		Não tipáveis		%
		Nº	%	Nº	%	
Saliva	95	87	91,6	8	8,4	
Orofaringe	69	64	92,8	5	7,2	
Fossas nasais	95	86	90,5	9	9,5	
Total	259	237	91,5	22	8,5	

Tabela 2 - Distribuição das 237 cepas tipáveis de *S. aureus*, isoladas de portadores sadios, segundo a origem, nos diferentes grupos bacteriofágicos.

Grupos bacteriofágicos	Saliva		Fossas nasais		Orofaringe		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Grupo I	21	8,9	20	8,4	16	6,8	57	24,1
Grupo II	10	4,2	10	4,2	6	2,6	26	11,0
Grupo III	19	8,0	19	8,0	13	5,5	51	21,5
Não classificados	16	6,7	13	5,5	12	5,1	41	17,3
Experimentais	11	4,6	14	5,9	9	3,8	34	14,3
Associações	10	4,2	10	4,2	8	3,4	28	11,8
Total	87	36,6	86	36,2	64	27,2	237	100,0

classificados (17,3%) isoladamente ou em associação com outros grupos. A maioria das cepas, independentemente da sua origem (saliva e/ou orofaringe e/ou fossas nasais), tendeu a acumular-se no grupos I e III.

Considerando os 69 indivíduos sadios que albergavam concomitantemente o *S. aureus* na saliva, orofaringe e fossas nasais (Figura 2), a fagotipagem permitiu constatar a identidade das cepas provenientes das três localizações em 31 (44,9%) portadores. Talvez em decorrência da contiguidade das duas áreas (bucal e nasal), verificou-se que a maioria das cepas isoladas dessas cavidades apresentavam o mesmo padrão bacteriofágico.

Summary

Occurrence of Staphylococcus aureus in saliva, throat and nose in healthy individuals

In order to verify the occurrence of

Staphylococcus aureus in saliva, throat and nose, 318 healthy individuals (dental students) were examined by cultural methods. The specimens were inoculated in a enriched medium and streaking directly on plates of High Sodium Chloride - Egg Yolk Agar. Two hundred-sixty six or 83.6 per cent of the individuals examined were found to be carriers. Two hundred-fifty five carriers (95.9%) were detected from the primary streaking while the remaining 11 (4.1%) cases were obtained exclusively from saliva carriers after the enrichment. The occurrence of 236 (74.2%) saliva carriers were higher than the throat 166 (52.2%) and the nose 124 (39.0%) carriers. From the 259 strains submitted to the bacteriophage typing, 237 (91.5%) were typed and most of them were shown to belong to the groups I and III, independently of their origin. The colonization of the three niches in the same carrier tend to done by strains belonging to the same phage pattern.

Referências Bibliográficas

1. Adekeye, E.O.; Brown, A.E. & Adekeye, J.O. Cervicofacial abscesses of unknown origin. A survey of eight-one cases. Oral Surg., 45:831-840, 1978.
2. Araujo, W.C. de & Zebral, A.A. Estudos sobre *Staphylococcus* II. Comportamento de um grupo de profissionais-alunos como portadores de estafilococo coagulase-positivo. An. Fac. Nac. Odont., 14:67-81, 1961.
3. Autio, K.L.; Rosen, S.; Reynolds, N.J. & Bright, J.S. Studies on cross-contamination in the dental clinic. J. Am. Dent. Assoc., 100:358-361, 1980.
4. Ayilffe, G.A.J.; Collins, B.J. & Lowbury, E.J.L. Ward floors and others surface as reservoirs of hospital infection. J. Hyg. (London), 65:515-536, 1967.
5. Blair, J.E. & Williams, R.E.O. Phage typing of *Staphylococcus aureus*. Bull. Wld. Hlth. Org., 24:771-784, 1961.
6. Cadness-Graves, B.; William, R.; Harper, G.G. & Miles, A.A. Slide test for coagulase-positive staphylococci. Lancet, 1:736-738, 1943.
7. Dametto, V.F. & Zelante, F. Observações sobre portadores de *Staphylococcus*

- aureus* entre estudantes de Odontologia. Rev. Fac. Odont. Univ. S.Paulo, 19:195-204, 1981.
8. Fantinato, V. & Zelante, F. Verificação da existência de portadores de *Staphylococcus aureus* entre estudantes de Odontologia. Rev. Fac. Odont. São José dos Campos, 6:1-11, 1977.
9. Hutzler, R.U. *Staphylococcus aureus* e bactérias gram-negativas em pacientes hospitalizados. São Paulo, Tese, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1971.
10. Ieria, S.T.; Furlanetto, S.M.P. & Campos, M.L.C. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico nas fossas nasais de manipuladores de alimentos em hospitais, São Paulo, 1976. Rev. Saúde Pública (São Paulo), 14:93-100, 1980.
11. Ito, I.Y. Caracterização e incidência de *Staphylococcus aureus* de cepas hospitalares. Ribeirão Preto, Tese, Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto, 1973.
12. Ito, I.Y.; Costa, A. & Baracchini, O. Emprego de gema de ovo no isolamento de *Staphylococcus aureus*. An. Microbiol., 16:189-192, 1969.
13. Knighton, H.T. Study of bacteriophage types and antibiotic resistance of staphylococci isolated from dental students and faculty members. J. dent. Res., 39:906-911, 1960.
14. Knighton, H.T. Relative constancy of specific bacteriophage patterns of staphylococci isolated from oral and nasal areas. J. dent. Res., 41:701-706, 1962.
15. Knighton, H.T. Coagulase-positive staphylococci in oral and nasal areas of dental students: a four-year study. J. dent. Res., 44:467-470, 1965.
16. Mendonça, C.P. Estudos sobre *Staphylococcus aureus* (portadores e infecções hospitalares) num hospital geral de Araraquara, S.P. 1964-1975. Araraquara, Tese, Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araraquara, 1976.
17. Moore, J.R. & Russell, C. Bacteriological investigation on dental abscesses. Dent. Practit., 22:390-392, 1972.
18. Organización Mundial de La Salud. Estreptotocias Y estafilococcias. Informe de un Comité de Expertos de la OMS. Genebra, 1968, 62p. (PMS. Serie de Informes Técnicos, 394).
19. Piochi, B.J.A. & Zelante, F. Contribuição para o estudo de *Staphylococcus* isolados da cavidade bucal. I. *Staphylococcus* isolados da saliva. Rev. Fac. Odont. São Paulo, 11:367-378, 1973.
20. Rocha Barros, V.M.; Marques, A.L.V. & Silva, O.P. Suscetibilidade a antibióticos e fagotipagem de *Staphylococcus aureus* isolados de portadores sadios. Rev. Fac. Odont. 21. Ribeirão Preto, 21:52-65, 1984.
- Solé-Vernin, C. Fagotipagem de *Staphylococcus aureus*. Rev. Bras. Ort. (Rio de Janeiro), 11:11-14, 1976.
22. Solé-Vernin, C. & Uthida-Tanaka, A prova de Moore conjugada ao antibiograma na identificação das amostras hospitalares e não hospitalares de *S. aureus*. O Hospital, 75:163-206, 1969.
23. Taplin, J. & Goldsworthy, N.E. A study of 225 strains of *Staphylococcus* isolated from the mouth. Austr. J. exp. Biol. med. Sci., 36:289-304, 1958.
24. Zelante, F.; Ashcar, H.; Piochi, B.J.A. & Alves, M.P. Observação sobre o padrão fágico de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas da boca e do nariz de indivíduos saudáveis. Rev. Saúde Pública (São Paulo), 17:123-129, 1983.
25. Zelante, F.; Ashcar, H.; Piochi, B.J.A.; Monson, C.A. & Cunha, P.S. *Staphylococcus aureus* na boca e no nariz de indivíduos saudáveis. Verificação de identidade entre as cepas isoladas. Rev. Saúde Pública (São Paulo), 16:92-96, 1982.

Recebido para publicação em 6/09/88

SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE *YERSINIA* spp ISOLADAS DE ALIMENTOS NA CIDADE DO RIO DE JANEIRO

Alba Lúcia Solino Noleto
& Anita Tibana

Dept^o de Microbiologia Médica
Instituto de Microbiologia da UFRJ
Centro de Ciências da Saúde
Bloco I - Ilha do Fundão
21941 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Resumo.

Cento e trinta e cinco culturas de *Yersinia* spp isoladas de alimentos foram testadas em relação a 17 agentes antimicrobianos pelo método de difusão simples em placa. Entre os antimicrobianos testados cloranfenicol, polimixina B, gentamicina, canamicina, tetraciclina, ácido nalidíxico e colistina foram os que apresentaram maior atividade inibitória sobre *Yersinia*. Todas as amostras de *Y. enterocolitica*, *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii* e *Y. kristensenii* produziram β-lactamase, detectada pelo método da cefalosporina cromogênica.

Introdução

Yersinia spp vêm sendo isoladas de diversos tipos de carne (1, 4, 5, 6, 11, 14, 16, 21) e de leite (7, 10, 15, 19, 20). Nos últimos anos, tivemos oportunidade de isolar *Yersinia* spp desses tipos de alimentos. A capacidade de multiplicação em temperatura de refrigeração das bactérias do gênero *Yersinia*, permite que os alimentos refrigerados sirvam de meio para proliferação desses microrganismos e como veículo de transmissão. Em relação às amostras isoladas de alimentos, os dados da literatura nacional são escassos ou mesmos nulos, quanto à sensibilidade das amostras aos antimicrobianos. Neste trabalho apresentamos o perfil de sensibilidade de 135 amostras isoladas de alimentos frente a 17 antimicrobianos.

Material e Métodos

Foram estudadas 37 amostras de *Yersinia* spp originárias de leite crua (*Y. enterocolitica* -1 0:5, *Y. enterocolitica* -2 0:10 (K1), *Y.*

intermedia 0:18; 0:7,8; 0:16; NAG-não aglutináveis com os soros disponíveis e *Y. frederiksenii* 0:22), quarenta e três amostras originárias de leite pasteurizado (*Y. enterocolitica* -1 0:5; 0:5, 27; 0:13,7; 0:7, 8; 0:16; *Y. intermedia* NAG; *Y. frederiksenii* NAG; 0:27; 0:25, 35). As 55 amostras isoladas a partir de carne bovina, suína e de galinha pertenciam a *Y. enterocolitica* 1-0:5; 0:4, 33, 0:16; 0:13,7; 0:14; 0:6,31; *Y. kristensenii* 0:11; NAG; 0:11,24; *Y. intermedia* 0:13,7; NAG, 0:17; 0:21; 0:29; (K1) e *Y. frederiksenii* 0:2a, 2b, 3.

A sensibilidade das amostras em relação a 17 antimicrobianos foi testada à 26° C em placas contendo o meio Mueller Hinton de acordo com a metodologia descrita por Bauer & Col. (2). Os agentes antibacterianos utilizados foram ampicilina (10µg), ácido nalidíxico (30µg), canamicina (30µg), cloranfenicol (30µg), carbenicilina (100µg), cefalotina (30µg), cefoxitina (30µg), clindamicina (2µg), colistina (10µg), eritromicina (15µg), gentamicina (10µg), lincomicina (2µg), sulfametrim (25µg), penicilina (10U), polimixina B (300U), tetraciclina (30µg) e vancomicina (30µg). A pesquisa de β-lactamase foi realizada pelo método

Tabela 1 - Perfil de sensibilidade de 135 amostras de *Yersinia* spp isoladas a partir de alimentos.

Símbolos: a = Amostras isoladas a partir de leite cru; b = De leite pasteurizado; c = De produtos cárneos; d = O numerador significa número de amostras sensíveis e o denominador número total de amostras.

Antimicrobianos	<i>Y. enterocolitica</i>			<i>Y. intermedia</i>			<i>Y. frederiksenii</i>			<i>Y. kristenseni</i>			Total de amostras sensíveis (%)	
	LCa	LP ^b	C	LC	LP	C	LC	LP	C	LC	LP	C		
Caramicina KG30	12/12 ^d	15/18	17/18	4/24	1/1	24/28	1/1	24/24	1/1	6/8			125	92,6
Ácido nalidíxico AN30	8/12	17/18	16/16	23/24	3/1	22/28	1/1	24/24	1/1	5/8			118	87,4
Sulfanetram SYT25	2/12	5/18	1/16	3/24	0/1	5/28	0/1	7/24	1/1	1/8			25	18,2
Lincamicina LN20	0/12	0/18	0/16	0/24	0/1	0/28	0/1	0/24	0/1	0/8			0	0,0
Penicilina PM10	0/12	0/18	0/16	0/24	0/1	0/28	0/1	0/24	0/1	0/8			0	0,0
Polimixina PI300	12/12	17/18	17/18	24/24	1/1	25/28	1/1	23/24	1/1	7/8			127	94,1
Extractomicina EI15	0/12	0/18	0/16	0/24	0/1	2/28	0/1	0/24	0/1	0/8			2	1,5
Carbenicilina CR10	0/12	0/18	0/16	1/24	1/1	6/28	0/1	0/24	0/1	1/8			15	11,1
Colistina CL10	8/12	15/18	14/18	24/24	1/1	19/28	1/1	23/24	0/1	7/8			112	82,9
Cloranfenicol CF30	12/12	14/18	17/18	24/24	1/1	27/28	1/1	23/24	1/1	8/8			128	94,8
Ampicilina AP10	0/12	3/18	0/18	1/24	0/1	7/28	0/1	0/24	0/1	7/8			18	13,3
Gentamicina QN10	12/12	16/18	17/18	24/24	1/1	25/28	1/1	23/24	1/1	7/8			127	94,1
Tetraciclina TR20	11/12	12/18	17/18	23/24	0/1	26/28	1/1	23/24	1/1	8/8			122	90,4
Cefoxitina CT30	3/12	2/18	4/18	4/24	0/1	12/28	0/1	9/24	0/1	6/8			40	29,6
Cefalotina CF30	0/12	0/18	0/18	0/24	0/1	0/28	0/1	0/24	0/1	0/8			0	0,0
Clindamicina C12	0/12	0/18	0/18	0/24	0/1	0/28	0/1	0/24	0/1	0/8			0	0,0
Vancomicina VC30	0/12	0/18	0/18	0/24	0/1	0/28	0/1	0/24	0/1	0/8			0	0,0

da cefalosporina cromogênica (18). Amostras de *Yersinia* foram semeadas na superfície inclinada do meio infuso de cérebro e coração (Biobrás) adicionado de 2% de agar, incubadas a 26°C durante 24 horas. A seguir, as culturas eram recobertas com reagente (Cefalosporina-Glaxo Research Ltda.), sendo a reação considerada positiva quando a cor de substrato passava de amarela para vermelha (1 a 2 minutos) e negativa quando não havia mudança de coloração em até 30 minutos.

Resultados e Discussão

Todas as amostras pertencentes às espécies *Y. enterocolitica*, *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii* e *Y. kristenseni* produziram β-lactamase, fato este já descrito por Nunes & Ricciardi (13) para as três primeiras espécies citadas. A produção desta enzima pode explicar a resistência da maioria das amostras aos antibióticos beta lactâmicos. Neste trabalho as amostras testadas foram resistentes à penicilina, lincamicina, cefoxitina, clindamicina e vancomicina. Foi observada elevada resistência à eritromicina, com exceção de duas amostras de *Y. intermedia*, isoladas a partir de carne, que foram sensíveis a

esse antimicrobiano. A alta resistência de *Y. enterocolitica* de origem humana a eritromicina já havia sido relatada por Zaremba & Aldová (22) e Krieg & Holt (8) assim como por Nunes & Ricciardi (13) em relação às amostras originárias de cães com ou sem diarréia. Kwaga & Col. (9) trabalhando com amostras de *Yersinia* spp isoladas de bovinos e suínos observaram um maior percentual de cepas sensíveis a este antimicrobiano.

A alta sensibilidade de *Yersinia* spp ao cloranfenicol, colistina, gentamicina, canamicina, polimixina-B, tetraciclina e ácido nalidíxico tem sido relatada por uma série de pesquisadores (3, 12, 13, 20). A maioria das nossas amostras foram sensíveis a cloranfenicol (94,8%), polimixina-B (94,1%), gentamicina (94,1%), tetraciclina (90,4%), ácido nalidíxico (87,4%) e colistina (82,9%). Cabe assinalar que *Y. enterocolitica* e *Y. intermedia* não apresentaram sensibilidade total para nenhum dos antimicrobianos testados (Tabela 1), e que *Y. frederiksenii* foi a espécie que apresentou maior sensibilidade frente aos antimicrobianos. Todas as 26 amostras examinadas foram sensíveis a canamicina e ácido nalidíxico, apenas uma foi resistente a polimixina B, uma ao cloranfenicol, e outra a tetraciclina e gentamicina. Todas as amostras de *Y. intermedia* foram sensíveis a polimixina B

e apresentaram sensibilidade variável em relação aos demais antimicrobianos testados. Dentre as amostras estudadas apenas aquelas pertencentes à espécie *Y. kristensenii* foram todas sensíveis ao cloranfenicol e tetraciclina. Com relação a este último antimicrobiano, seis amostras de *Y. enterocolitica*, quatro de *Y. intermedia* e uma *Y. frederiksenii* apresentaram resistência, fato este contrário aos dados existentes na literatura. Szita & Svidró (17) em um estudo abrangendo 5 anos, na Hungria, sobre infecções humanas por *Y. enterocolitica* relataram a existência de apenas 0,2% de amostras resistentes a esse antimicrobiano.

Dos resultados apresentados, podemos concluir que existem diferenças relacionadas às espécies de *Yersinia* quanto à sensibilidade aos antimicrobianos e que as amostras consideradas ambientais, em nosso meio, apresentaram maior resistência que aquelas isoladas em outros países.

Summary

Antimicrobial susceptibility of Yersinia spp isolated from foods in Rio de Janeiro

Antimicrobial susceptibility was tested in 135 strains of *Yersinia* isolated from foods using 17 antimicrobial agents by the agar disk diffusion test. Chloramphenicol, polimixin B, gentamicin, kanamicin, tetracycline, nalidixic acid and colistin were the antibiotics with highest activity. All the strains of *Y. enterocolitica*, *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii* and *Y. kristensenii* produced β -lactamase, which was detected by the cromogenic cephalosporin.

Referências Bibliográficas

- Asakawa, Y.; Akahane, S.; Shiozawa, K.; Hohnma, T. - Investigations of source and route of *Yersinia enterocolitica* infection. *Contr. Microbiol. Immunol.* 5:115-121, (Basel:Karger), 1979.
- Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M.; Shevis, J.C. & Turck, M. - Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Amer. J. Clin. Pathol.* 45:493-496, 1966.
- Bisset, M.L. - *Yersinia enterocolitica* isolates from humans in California, 1968-1975. *J. Clin. Microbiol.*, 4:137-144, 1976.
- Gill, C.O. & Newton, K.G. - Spoilage of vacuum-packaged dark, firm, dry meat at chill temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37:362-364, 1979.
- 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.
- Hanna, M.O.; Setward, J.C.; Carpenter, Z.L.; Zinc, D.L. & Vanderzant, C. - Isolation and characteristics of *Yersinia enterocolitica* - like bacteria from meats. *Contr. Microbiol. Immunol.*, 5:234-242 (Basel:Karger), 1979.
- Hughes, D. - Repeated isolation of *Yersinia enterocolitica* from a pasteurized milk in a holding vat at a dairy factory. *J. Appl. Bacteriol.*, 48:383-385, 1980.
- Krieg, N.R. & Holt, J.G. (eds) - *Bergey's manual of systematic bacteriology* 1 Williams & Wilkins Co. Baltimore, 1984.
- Kwaga, J.K.P.; Agbonlahor, D.E.; Adesiyun, A.A. & Lombin, L.H. - The sensitivity of antimicrobial agents of species of *Yersinia* isolated from cattle and pigs in Nigeria. *Vet. Microbiol.*, 12:383-388, 1986.
- Landgraf, M. & Falcão, D.P. - Isolamento de *Yersinia* sp em alimentos diversos. *Rev. Microbiol.*, 18(1):93-98, 1987.
- Mollaret, H.H.; Bercovier, H. & Alonso, J.M. - Summary of the data received at the WHO Reference Center for *Yersinia enterocolitica*. *Contr. Microbiol. Immunol.*, 5:174-184, (Basel:Karger), 1979.
- Nilehn, B. - Studies on *Yersinia enterocolitica* with special reference to bacterial diagnosis and occurrence in human acute enteric disease. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica Supplement.*, 206:1-48, 1969.
- Nunes, M.P. & Ricciardi, I.D. - Perfil de sensibilidade a antimicrobianos de amostras de *Yersinia* sp isoladas de cães no Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Med. Vet.* 9:30-34, 1987.
- Quan, T.J. - Biotypic and serotypic

- profiles of 367 *Yersinia enterocolitica* of human and environmental origin in the United States. *Contr. Microbiol. Immunol.* 5:83-87 (Basel:Karger), 1979.
15. Schiemann, D.A. & Toma, S. - Isolation of *Yersinia enterocolitica* from raw milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, 35:54-58, 1978.
16. Seeley, R.J. & Yearbury, B.J. - Isolation of *Yersinia enterocolitica* - resembling organisms and *Alteromonas putrefaciens* from vacuum-packaged chilled beef cuts. *J. Appl. Bacteriol.*, 46:493-499, 1979.
17. Szita, J. & Svidrő, A. - A five year survey of human *Yersinia enterocolitica* infections in Hungary. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 27:103-109, 1976.
18. Thornsberry, C. - Detection of β -Lactamase in *Neisseria gonorrhoeae* and *Haemophilus influenzae*. Centers for Disease Control. Atlanta, Georgia, 1979.
19. Tibana, A.; Warnken, M.B.; Nunes, M.P.; Ricciardi, I.D. & Noleto, A.L.S. - Occurrence of *Yersinia* species in raw and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Food. Prot.* 50(7):580-583, 1987.
20. Vidon, D.J.M. & Delmas, C.C. - Incidence of *Yersinia enterocolitica* in raw milk in eastern France. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41:355-359, 1981.
21. Warnken, M.B.; Nunes, M.P. & Noleto, A.L.S. - Incidence of *Yersinia* species in meat samples purchased in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Food Protec.* 50(7):578-579, 1987.
22. Zaremba, M. & Aldová, E. - Sensitivity to chemotherapeutics of *Yersinia enterocolitica* strains. *Arch. Immun. Ther. Exp.*, 27:847-852, 1979.

IN VITRO ACTIVITY OF LOMEFLOXACIN COMPARED OF THAT NORFLOXACIN, GENTAMICIN, AND CEFOTAXIME

Marcelo Magalhães
& Vera Magalhães

Deptº de Medicina Tropical
Hospital das Clínicas
Cidade Universitária
50739 Recife PE, Brasil

Resumo

Atividade in vitro do lomefloxacin comparada a do norfloxacin, gentamicina e cefotaxima

A atividade in vitro do Lomefloxacin, uma nova quinolona difluorinada, foi comparada com a do norfloxacin, gentamicina e cefotaxima contra 1503 isolados clínicos, pertencentes a 21 espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A comparação das CIMs, para 90% das cepas testadas, mostrou que o lomefloxacin foi discretamente menos ativo ou tão eficaz quanto o norfloxacin para a maioria das espécies bacterianas examinadas. Em contraste, ele foi ligeiramente mais ativo contra o *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Enterobacter cloacae* e *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase. Ambas quinolonas foram acentuadamente mais eficientes que a gentamicina ou a cefotaxima contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. cloacae*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Introduction

Over the last years there has been continued interest in the development of new quinolone antimicrobial agents. Lomefloxacin is a novel difluorinated quinolone which has a C-methyl group at the 3 position of the piperazine moiety. It was previously shown to be active in vitro and in vivo for a number of different species of Gram-negative and Gram-positive bacterial strains isolated at Japanese hospitals (2). The purpose of this study was compare the activity of this compound with those of norfloxacin, gentamicin, and cefotaxime against clinical isolates recovered from outpatients in Recife, Brazil.

Material and Methods

Bacteria - A total of 1503 strains representing 21 bacterial species were

tested. Cultures were collected during 1986-1987 from out patients at the Center for Microbiology and Immunology in Recife, Brazil.

Drugs - Antimicrobial agents, received as powder with known potency, were obtained from the following sources: lomefloxacin, G.D. Searle; norfloxacin, Merck Sharp-Dhome; gentamicin, Shering Corporation; and cefotaxime, Hoechst.

Susceptibility testing - MICs for all isolates were determined by the agar dilution method (4). The agar media used for susceptibility tests were Mueller-Hinton agar (Difco Laboratories, Detroit, Mich) fortified with 5% defibrinated sheep blood for streptococci, GC medium base (Difco) supplemented with 1% Isovitalex (BBL-Microbiology Systems, Cockeysville, Md) for *Neisseria gonorrhoeae* and *Campylobacter pylori*, and unsupplemented Mueller-Hinton agar for all other

Tabela 1 - Comparative in vitro activities
of Lomefloxacin and reference drugs against
1503 bacterial isolates.

Organism (no tested)	Agent	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		Range	50%	90%
<i>Staphylococcus aureus</i> (112)	Lomefloxacin	0.5-8	0.7	1
	Norfloxacin	0.5-8	0.75	1.7
	Gentamicin	0.06-128	0.22	41.6
	Cefotaxime	0.25-4	1.7	3.5
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (63)	Lomefloxacin	0.25-8	0.6	0.95
	Norfloxacin	0.25-8	0.65	1.45
	Gentamicin	0.06-128	0.19	11.6
	Cefotaxime	0.06-16	0.55	3.4
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (81)	Lomefloxacin	2-16	2.8	3.9
	Norfloxacin	1-8	2.6	3.9
	Gentamicin	0.06-4	0.06	0.1
	Cefotaxime	1-4	1.9	3.6
<i>Streptococcus pyogenes</i> (31)	Lomefloxacin	2-8	3.6	7.4
	Norfloxacin	2-8	2	4
	Gentamicin	1-4	1.7	3.4
	Cefotaxime	0.008-0.016-0.008		0.015
<i>Streptococcus</i> groups B, C, G. (31)	Lomefloxacin	2-8	3.9	7.2
	Norfloxacin	2-8	2	6
	Gentamicin	2-16	3.7	10.4
	Cefotaxime	0.03-0.12	0.06	0.11
<i>Enterococcus faecalis</i> (124)	Lomefloxacin	4-32	4-4	12
	Norfloxacin	4-32	4	7.8
	Gentamicin	0-256	12	153.6
	Cefotaxime	128-256	179.2	243.2
<i>Escherichia coli</i> (190)	Lomefloxacin	0.03-4	0.036	0.475
	Norfloxacin	0.03-4	0.06	0.21
	Gentamicin	0.25-256	0.75	1.9
	Cefotaxime	0.03-1	0.051	0.111
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (62)	Lomefloxacin	0.06-16	0.204	2
	Norfloxacin	0.06-16	0.168	1.7
	Gentamicin	0.25-256	0.5	48
	Cefotaxime	0.03-16	0.054	0.222
<i>Enterobacter aerogenes</i> (60)	Lomefloxacin	0.06-4	0.168	0.25
	Norfloxacin	0.06-4	0.102	0.228
	Gentamicin	0.12-256	0.275	24
	Cefotaxime	0.06-256	0.066	0.25
<i>Enterobacter cloacae</i> (59)	Lomefloxacin	0.06-4	0.168	1.7
	Norfloxacin	0.06-8	0.192	2.6
	Gentamicin	0.25-256	0.475	153.6
	Cefotaxime	0.06-16	0.22	96
<i>Shigella sonnei</i> (16)	Lomefloxacin	0.06-0.5	0.03	0.185
	Norfloxacin	0.03-3.5	0.01	0.185
	Gentamicin	0.5-4	0.9	1.9
	Cefotaxime	0.03-1	0.03	0.066
<i>Shigella flexneri</i> (85)	Lomefloxacin	0.03-0.12	0.058	0.108
	Norfloxacin	0.03-0.12	0.039	0.066
	Gentamicin	0.25-1	0.65	0.95
	Cefotaxime	0.03-0.12	0.03	0.042
<i>Salmonella</i> spp. (70)	Lomefloxacin	0.12-0.25	0.144	0.234
	Norfloxacin	0.06-0.25	0.084	0.12
	Gentamicin	0.25-4	1.1	2
	Cefotaxime	0.06-0.12	0.06	0.06
<i>Citrobacter freundii</i> (56)	Lomefloxacin	0.03-8	0.087	0.168
	Norfloxacin	0.01-4	0.051	0.168
	Gentamicin	0.12-256	0.228	0.5
	Cefotaxime	0.06-1	0.087	0.117
<i>Morganella morganii</i> (50)	Lomefloxacin	0.06-0.12	0.06	0.06
	Norfloxacin	0.06	0.06	0.06
	Gentamicin	0.25-16	0.425	0.85
	Cefotaxime	0.06-0.12	0.06	0.06
<i>Proteus mirabilis</i> (63)	Lomefloxacin	0.06-4	0.12	1.2
	Norfloxacin	0.03-1	0.043	0.375
	Gentamicin	0.25-256	0.75	60.8
	Cefotaxime	0.03-32	0.03	5.2
<i>Providencia</i> spp. (47)	Lomefloxacin	0.12-0.25	0.168	0.228
	Norfloxacin	0.06-0.12	0.06	0.06
	Gentamicin	0.12-0.5	0.186	0.35
	Cefotaxime	0.06	0.06	0.06
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (116)	Lomefloxacin	1-32	1.5	3.9
	Norfloxacin	0.25-8	0.75	2.4
	Gentamicin	0.25-756	2.4	153.6
	Cefotaxime	8-256	16.8	64
<i>Aeromonas</i> spp. (27)	Lomefloxacin	0.06-4	0.06	1.6
	Norfloxacin	0.05-2	0.06	1.5
	Gentamicin	1-4	1.9	3.6
	Cefotaxime	0.06-16	0.06	12
<i>Campylobacter pylori</i> (52)	Lomefloxacin	0.25-2	0.375	1.4
	Norfloxacin	0.12-1	0.3	0.5
	Gentamicin	0.12-0.5	0.144	0.3
	Cefotaxime	0.01-0.12	0.013	0.078
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (32)	Lomefloxacin	0.004-0.25	0.005	0.03
	Norfloxacin	0.004-0.25	0.008	0.03
	Gentamicin	0.5-2	1.1	1.8
	Cefotaxime	0.001-0.03	0.004	0.008
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (33) (penicillinase producing)	Lomefloxacin	0.004-0.016	0.004	0.01
	Norfloxacin	0.004-0.01	0.006	0.02
	Gentamicin	0.25-4	1.1	2
	Cefotaxime	0.004-0.004	0.004	0.005

isolates. Cultures were grown overnight in the appropriate agar or in Mueller-Hinton broth, except *C. pylori* which was grown for three days. The cell suspension from agar media or broth cultures were further diluted in broth to yield and inoculum of 10^4 colony forming units per drop when agar surface were spotted using a multipoint inoculator. The plates were incubated for 18-20h at 36°C. *N. gonorrhoeae* was incubated in 7% carbon dioxide, and *C. pylori* in anaerobic jars (GasPak, BBL Microbiology systems, without palladium catalyst) for three days. MIC was the lowest concentration of drug that inhibited the bacterial growth. A barely visible haze or the growth of a single colony were disregarded. ATCC cultures of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Enterococcus faecalis* were included as controls. All drugs were tested simultaneously.

Results and Discussion

The overall in vitro antibacterial activities of lomefloxacin and reference drugs are listed in Table 1. Both quinolones were markedly more efficient than gentamicin or cefotaxime against a number of Gram-positive and Gram-negative bacteria. In fact, gentamicin resistance among enterobacteria is known in Recife since 1972, when spreading of resistant strains was attributed to over generous and misuse of the antibiotic in pediatric units as a tentative to control a prolonged outbreak of gastroenteritis linked to a single multiresistant phage type of *Salmonella typhimurium* (3). Nowadays, however, a more important cause of concern was the isolation of many strains of *Enterobacter* and *P. aeruginosa* showing high levels of resistance to cefotaxime. This problem is still more serious if we take into account that our cultures were recovered from non-hospitalized patients. Present results are not quite different from those of other previous published studies (1, 5). Comparison of the MICs for 90% of the strains tested shows that lomefloxacin was slightly more active than

norfloxacin against *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. cloacae*, and penicillinase producing *N. gonorrhoeae*. Otherwise, it was less active than or equally as active as norfloxacin for most bacterial species examined. Despite this, in the treatment of mice experimentally infected with *E. coli*, *Proteus mirabilis* and *P. aeruginosa*, bacterial species for which higher MICs of lomefloxacin were required, it showed activities two to four greater than those of norfloxacin (2). These findings suggest that the therapeutic choice of a quinolone might be more dependent on their pharmacological properties rather than the in vitro antibacterial performance. Thus, further investigations to determine the pharmacokinetic characteristics of lomefloxacin in humans and its clinical efficacy in the treatment of systemic infections are indicated.

Summary

The in vitro activity of Lomefloxacin, a new difluorinated quinolone, was compared with those of norfloxacin, gentamicin, and cefotaxime against 1503 clinical isolates belonging to 21 Gram-positive and Gram-negative bacterial species. Comparison of the MICs for 90% of the strains tested shows that lomefloxacin was slightly less active than or equally as active as norfloxacin for most bacterial species examined. Otherwise, it was slightly more active than norfloxacin against *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Enterobacter cloacae*, and penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. Both quinolones were markedly more efficient than gentamicin or cefotaxime against *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. cloacae*, *Enterococcus faecalis*, and *Pseudomonas aeruginosa*.

References

- Chin, N.X.; Novelli, A. & Neu, H.C. - In vitro activity of lomefloxacin (SC-47111; NY-198), a difluoroquinolone 3-carboxilic acid, compared with those of other quinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 32:656-662, 1988.
- Hirose, T.; Okezaki, E.; Kato, H.; Ito, Y.; Inoue, M. & Mitsuhashi, S. - In

- vitro and in vivo activity of NY-198 a new difluorinated quinolone. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 31:854-859, 1987.
3. Magalhães, M.; Veras, A. & Damaso, A. - Transferable gentamicin resistance among enterobacteria. *Rev. Microbiol. (São Paulo)*, 6:90-92, 1975.
4. Washington, J.A. - Susceptibility tests: agar dilution, p.967-971.
- In: E.H. Lennette, A. Balows, W.J. Huasler Jr. & H.J. Shadomy (ed.) *Manual of Clinical Microbiology*, 4th ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
5. Wise, R.; Andrews, J.M.; Ashby, J.P. & Matthws, R.S. - In vitro activity of lomefloxacin, a new quinolone antimicrobial agent, in comparison with those of other agents. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 32:617-622, 1988.

Recebido para publicação em 25/11/88

EFEITO DE CONCENTRAÇÕES SUBMÍNIMAS INIBITÓRIAS DE PENICILINA SOBRE HIALURONIDASE E HEMOLISINA DE ESTREPTOCOCOS DO GRUPO B

Vânia Lúcia Carreira Merquior
& Leslie C. Benchetrit

Centro de Referências para Estreptococos
Instituto de Microbiologia da UFRJ
Caixa Postal 68040
21944 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Resumo

O efeito de doses subinibitórias de penicilina sobre dois produtos extracelulares de uma amostra de estreptococos do grupo B, foi avaliado. Os resultados obtidos demonstraram uma ação diferente para cada um dos produtos. A hialuronidase extracelular esteve aumentada em até 2.400% nas culturas expostas a 1/2 da CMI de penicilina, quando a atividade enzimática foi relacionada ao número de UFC/ml. Entretanto, para este mesmo nível do antimicrobiano pode-se observar a total repressão da atividade hemolítica da cultura. Esses resultados reforçam a importância do estudo de concentrações submínimas inibitórias de antimicrobianos pela sua influência na biologia e bioquímica do microrganismo.

Introdução

Os efeitos de concentrações subinibitórias de agentes antimicrobianos (subCMIs) na bactéria, "in vitro", são determinados por mudanças na morfologia e ultraestrutura dos diversos microrganismos (19). Estas traduzem a expressão de profundas alterações na biologia e bioquímica da célula. As modificações produzidas, incluem variações na taxa de crescimento bacteriano, na produção e/ou liberação de certas enzimas e toxinas, na susceptibilidade às células fagocitárias e à atividade bactericida do soro e no mecanismo de adesão ao tecido do hospedeiro (2, 7, 11). Os dados obtidos poderiam, de alguma forma, vir a contribuir na utilização dos antimicrobianos para a terapêutica e/ou profilaxia, bem como, no estudo da ação dos mesmos (10).

Segundo Shibl (17), a exposição dos microrganismos a antimicrobianos pode alterar a síntese de seus produtos extracelulares. Ademais, uma determinada droga pode aumentar a síntese de um produto em particular e

inibir a de outro no mesmo microrganismo. Este aumento pode ser atribuído a uma possível ação inolutiva da droga. Ogaard & Col. (14) observaram modificações na produção de dois conhecidos fatores de virulência de *Pseudomonas aeruginosa*, a exotoxina A e a elastase, frente a carbenicilina e gentamicina. Ambos os antimicrobianos inibiram a produção de toxina A. Entretanto, a carbenicilina não causou nenhum efeito na produção da elastase, apesar da gentamicina ter eliminado completamente a sua produção. Já em cepas de *Escherichia coli* enterotoxigênicas foi determinado um aumento na quantidade da enterotoxina termolábil (LT) intra e extracelular, quando essas bactérias foram cultivadas na presença de lincomicina e tetraciclina (20). Além disso, a LT extracelular quando purificada apresentou certas modificações na sua estrutura molecular, quando comparada com a toxina produzida por amostras controle.

A enzima hialuronidase, que pode participar na patogenicidade dos microrganismos que a elaboram (6), também teve a sua produção e/ou

liberação aumentadas por estreptococos dos grupos A e C, quando na presença de doses subinibitórias de clindamicina e penicilina, respectivamente (2). Shibli & Sowaygh (18) observaram o efeito de 4 antimicrobianos na produção de estreptolisina S por uma amostra de *Streptococcus pyogenes* e observaram que na presença de lincomicina e clindamicina ocorreu completa inibição da síntese dessa hemolisina. Nenhum efeito foi observado quando em subCMIs de cloranfenicol e eritromicina.

Em razão dos fatos expostos, este trabalho avalia a ação da penicilina sobre dois produtos extracelulares de estreptococos do grupo B, hialuronidase e hemolisina, "in vitro", que possivelmente desempenham um importante papel nas infecções. Estes microrganismos estão envolvidos em uma variedade de quadros infecciosos humanos, principalmente em neonatos (3), e a eficácia da penicilina para a erradicação do estado de portador ou no tratamento, tem levado a opiniões discordantes (15).

Material e Métodos

Amostra bacteriana - A amostra de *Streptococcus* beta-hemolítico do grupo B de Lancefield foi isolada de um caso clínico de infecção urinária. A classificação sorológica foi feita por reação de precipitação antígeno-anticorpo, em tubo capilar. O extrato antigênico foi obtido como descrito por El Kholy & Col. (5). O isolamento primário foi feito no Centro de Referência para Estreptococos (Instituto de Microbiologia, UFRJ), onde é designada 85-634 e mantida sob a forma liofilizada na coleção do laboratório.

Antibiótico - O antibiótico empregado no estudo foi a penicilina G potássica (potência 1580 U/mg; Indústrias Farmacêuticas Fontoura-Wyeth S/A). Uma solução de 1 mg/ml em água destilada foi esterilizada por filtração em membrana Millipore (tipo HA). Os efeitos da droga foram pesquisados em 1/16, 1/8, 1/4 e 1/2 da CMI. Um controle da sua atividade foi sempre incluído aos testes.

Concentração mínima inibitória - O método de determinação utilizado foi o de macrodiluição em caldo descrito por Jones & Col. (8). Um volume específico do antibiótico foi adicionado ao meio de cultura, caldo Todd-Hewitt (THB; Difco), procedendo-se diluições seriadas (\log_2), previamente estipuladas. O inoculo padrão foi feito a partir de uma cultura de 24 h a 37°C, diluída 1:100, de modo a conter entre 10^5 e 10^6 unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml). A concentração mínima inibitória (CMI) foi considerada como a menor concentração do antibiótico onde não se verificou, visualmente, crescimento bacteriano após incubação durante 18 h a 37°C em atmosfera normal.

Viabilidade e absorvância das culturas - O crescimento bacteriano foi apreciado através da medida da absorvância das culturas a 540nm, após 18 h a 37°C em atmosfera normal. Paralelamente, determinou-se a viabilidade bacteriana das culturas expostas à droga e controle, pela contagem do número de UFC/ml, segundo Krogstad & Moellering (9). Os dois parâmetros foram utilizados na correlação com a atividade hialuronidásica.

Atividade hialuronidásica - A determinação da atividade da enzima foi feita baseada no método espectrofotométrico descrito por Benchetrit & Col. (4), que é extremamente sensível em relação aos demais existentes, sendo capaz de revelar quantidades de enzima de até 0,00005 unidades NF ("National Formulary", EUA). Neste método há a participação de um corante do tipo carbocianina que tem a capacidade de ligar-se a mucopolissacarídeos ácidos, como por exemplo o ácido hialurônico, substrato enzimático. A interação corante-substrato altera o comprimento de onda do máximo de absorção do corante de 500 para 640nm. Sabendo-se que, a absorvância do complexo é proporcional a quantidade de substrato, pode-se correlacionar a sua degradação, pela presença de hialuronidase, através da diminuição da densidade ótica (UDO), já que o corante não se liga aos produtos de degradação.

A determinações foram feitas nos sobrenadantes de culturas expostas às subCMIs de penicilina e controle,

cultivadas em meio THB dialisado (D-THB). A diálise do meio de cultura é essencial para a eliminação de macromoléculas presentes, que pudessem vir a interferir nos processos de dosagem espectrofotométrica com a participação de corante (1).

Após o cultivo em D-THB por 18 h a 37 °C em atmosfera normal, as culturas foram centrifugadas e os sobrenadantes dialisados contra 100 volumes de tampão acetato de sódio (0,02 M e pH 5,0) contendo NaCl 0,01 M por 24 h a 4 °C sob agitação, com uma troca de tampão após as primeiras seis horas (1). Finalizado o período de diálise, os sobrenadantes foram esterilizados por filtração em membrana.

As reações foram realizadas com 0,9ml dos sobrenadantes dialisados e 0,1ml de uma solução de 1,0mg/ml de ácido hialurônico (Grau III, Sigma), em tampão acetato, e incubadas em banho-maria a 37 °C. Foram retiradas alíquotas de 70µl em tempos de 0, 20, 40, 60, 120 e 180 min. de incubação. Estas alíquotas foram diluídas em 0,63ml de água destilada a 4 °C, e mantidas em banho de gelo até o momento da leitura espectrofotométrica. Para tal, foram adicionados 6,3ml da solução corante e a absorbância foi mensurada a 640nm.

A atividade enzimática específica foi determinada dividindo-se o número de unidades de enzima por mililitro de sobrenadante, pela absorbância das culturas e pelo número de unidades formadoras de colônias.

Atividade hemolítica - Esta foi pesquisada tanto nos sobrenadantes quanto nas células das culturas crescidas em meio THB, expostas à penicilina e controle. A hemolisina ligada à célula foi observada após padronização das culturas, de modo a conterem 0,8 UDO a 540nm.

As células foram lavadas, uma vez, em tampão fosfato (0,01M e pH 7,2), contendo NaCl 0,15M, e ressuspensas em 0,5ml da mesma solução tampão com 0,1% de glicose. Adicionou-se ao sistema 4,5ml de hemácias de carneiro a 1% no mesmo tampão. Após incubação por 1h a 37 °C, os sobrenadantes das reações foram lidos em espectrofotômetro a 540nm. Considerou-se hemólise máxima (100% de lise das hemácias), o resultado obtido com a cultura

controle, crescida na ausência do antibiótico.

A atividade hemolítica dos sobrenadantes foi medida pela adição de 5ml ao sedimento resultante da centrifugação de 5ml de uma suspensão de hemácias de carneiro a 1%, em tampão fosfato-glicose. Após incubação por 1h a 37°C em banho-maria, os sistemas sedimentados por centrifugação e os sobrenadantes lidos em espectrofotômetro a 540nm. Acompanhando as reações foram incluídos controles das hemácias em tampão e hemácias em meio de cultura, bem como, em água destilada (controle de lise total).

Resultados

Pelos parâmetros utilizados (UDO e UFC/ml) em 1/2 da CMI foi observada uma marcante diminuição no crescimento estreptocócico, enquanto que, obviamente a redução gradativa da concentração do antimicrobiano levou a valores próximos do controle. A presença da penicilina promoveu decréscimos equivalentes a 15, 30, 70 e 90% para as culturas expostas à 1/16, 1/8, 1/4 e 1/2 da CMI, respectivamente, em relação ao controle, quando o resultado foi expresso em UDO. A contagem de viáveis determinou diminuições percentuais num intervalo de 75 a 90% para as culturas expostas à droga (Tabela 1).

A atividade enzimática da hialuronidase quando determinada por mililitro de sobrenadante (U/ml) das culturas expostas à penicilina foi menor em relação ao controle. O índice encontrado na cultura exposta a 1/4 da CMI foi o mais acentuado, correspondendo a uma diminuição de aproximadamente 40% desta em relação ao controle. Na Tabela 1 pode-se observar a correlação da atividade hialuronidásica com UDO dos crescimentos. Sob este enfoque foram revelados aumentos aproximados de 85 e 700% para as culturas em 1/4 e 1/2 da CMI, respectivamente. Todavia, para as demais concentrações estudadas observou-se decréscimos pouco significativos (1/16 da CMI, 20%; 1/8 da CMI, 10%).

Quando a atividade enzimática específica baseou-se na correlação com UFC/ml, todas as culturas apresentaram níveis superiores ao controle. Valores de 150, 350 e 700% para 1/16, 1/8 e 1/4

Tabela 1 - Efeito da penicilina no crescimento, atividade hialuronidásica e hemolítica de estreptococos do grupo B.
 Símbolos: * = Determinada nos sobrenadantes das culturas;
 ** = Absorvância a 540nm; *** = Calculada a partir da atividade hemolítica do controle que foi considerada como 100%; CMI = 0,06ug/ml.

Nível do antimicrobiano	Crescimento		Atividade hialuronidase			Atividade hemolítica % de lise***
	UDO**	logUFC/ml	U/ml	U/UDO	UX10 ⁵ /UFC	
0	0,75	8,5	4,3	5,7	0,01	100
1/16 da CMI	0,64	8,0	2,9	4,5	0,03	99
1/8 da CMI	0,54	6,7	2,8	5,1	0,05	93
1/4 da CMI	0,24	6,3	2,5	10,6	0,10	89
1/2 da CMI	0,07	6,0	3,1	44,2	0,29	0

da CMI, respectivamente, foram detectados. O percentual de aumento em 1/2 da CMI foi de 2.400%.

Pelos resultados apresentados na Tabela 1, pode-se também verificar que a atividade hemolítica da amostra estreptocócica, pelo método de dosagem utilizado, foi suprimida nas células cultivadas na presença de 1/2 da CMI. Para as demais concentrações estudadas, apesar de apresentarem níveis de repressão, estes foram pouco significativos. A atividade hemolítica pesquisada nos sobrenadantes não foi detectada, pelo método empregado, tanto nas culturas expostas à droga quanto no controle cultivado na ausência do antimicrobiano.

Discussão

As alterações causadas por subCMIs de penicilina na amostra de estreptococos do grupo B, traduziram-se por resultados significativos. Entretanto, as deduções provenientes dos estudos em concentrações subinibitórias têm gerado muitas controvérsias. Provavelmente, deve-se a isto a falta de padronização dentre as metodologias empregadas nos trabalhos divulgados pela literatura, até o momento. Sendo assim, não se encontrou ainda um critério definido para o comprometimento de subCMIs de antimicrobianos na virulência do microrganismo ou sua influência na susceptibilidade destes aos mecanismos imunológicos do hospedeiro. Isso porque, os efeitos produzidos parecem estar vinculados às cepas bacterianas

não podendo, algumas vezes, serem extrapolados dentro de uma mesma espécie. Este fato pode ser confirmado pela observação de Michel & Col. (13) que estudaram a ação de eritromicina, clindamicina e pristinamicina na produção de penicilinase por *S. aureus*. Estes autores verificaram que o mesmo antimicrobiano exerceu efeitos diferentes sobre amostras distintas da mesma espécie de microrganismo.

Observamos que, para a amostra de estreptococos do grupo B, a atividade da enzima hialuronidase por ml de sobrenadante, acarretou em uma pequena diminuição da mesma. Entretanto, se relacionada ao número de UFC ou UDO observou-se um expressivo aumento de sua atividade. Não podemos afirmar o comprometimento na produção e/ou liberação deste fator pelas células alteradas por ação da droga, ou ainda se a morte celular, ocorrida nestas culturas, provocou a maior disponibilidade de enzima livre no sobrenadante, o que não foi determinado. Porém, como a percentagem de aumento foi extremamente acentuada (700 e 2.400% em 1/2 da CMI para relação com UDO e UFC, respectivamente), somada a especificidade do método utilizado, acreditamos que talvez, esteja mais relacionado a ação da penicilina na produção da enzima.

Ferne & Col. (7) observaram a ação de cloranfenicol, eritromicina e penicilina em diferentes produtos de estreptococos do grupo A. A quantidade de ácido hialurônico extraído foi aumentada, somente na presença de cloranfenicol. Através da observação destes dados, os autores sugeriram que o estímulo

indutivo no aumento da atividade hialuronidásica, foi devido a maior produção de ácido hialurônico pelas células expostas aos antimicrobianos.

Um outro produto microbiano, a hemolisina ligada à célula dos estreptococos do grupo B, foi pesquisada, após exposição do microrganismo à penicilina. Em 1/2 da CMI nenhuma atividade hemolítica foi verificada nos sistemas de células. Isto também pode ser detectado nos experimentos que envolveram a utilização dos sobrenadantes das culturas, após 18 h de incubação, nas condições padronizadas. Apesar disso, poderíamos pressupor o estímulo à liberação desse constituinte celular, promovida pelo antibiótico. Porém, isto não foi detectado pela técnica utilizada. Possivelmente, a hemolisina não permaneça estável nos sobrenadantes das culturas, o que refleteria na sua determinação nessas condições. Com os resultados obtidos podemos hipotetizar também uma repressão na sua produção promovida pela ação da penicilina.

McDowell & Col. (12) observaram em diversas amostras de estreptococos que a inibição da síntese da peptidioglicana, pela ação de dois beta-lactâmicos (mecilinam e cefoxitina), foi seguida, rapidamente e sequencialmente pela inibição menos severa do RNA e síntese de proteínas. Nenhuma alteração a nível de DNA foi apreciada. Shibl (16) atribui a influência altamente seletiva na produção de certas enzimas e toxinas, por alguns antibióticos, à possível atuação nos ribossomos localizados perifericamente na célula, podendo estes, serem mais sensíveis às subCMIs, do que aqueles dispersos no citoplasma. Entretanto, não há evidências conclusivas sobre a síntese destas enzimas e toxinas estar relacionada aos ribossomos ligados à membrana.

As hipóteses advêm da existência de classes distintas destas organelas, contendo sítios específicos de reconhecimento para certos RNA mensageiros (RNA-m), além de receptores próprios na membrana celular. A especificidade poderia estar relacionada, também, a proteínas presentes na membrana que reconheceriam moléculas adequadas de RNA-m e estes teriam a capacidade de

capturar os ribossomos do citoplasma para o evento da transcrição.

Os resultados deste estudo confirmam o que já foi demonstrado anteriormente por Shibl (17), que afirma a ocorrência de efeitos distintos numa mesma cepa bacteriana exposta a um único antimicrobiano. Sendo assim, recomendamos estudos adicionais para uma melhor avaliação dos efeitos promovidos por subCMIs de antimicrobianos nos microrganismos e a sua possível implicação com a terapia e/ou profilaxia antimicrobiana.

Agradecimentos

Este trabalho recebeu apoio financeiro da CAPES, CNPq, FINEP/PADCT e CEPG/UFRJ.

Summary

Effect of subminimal inhibitory concentrations of penicillin on group B streptococcal hyaluronidase and hemolysin

The effect of subinhibitory doses of penicillin on two extracellular products of a group B streptococci strain was studied. The results showed a different action to each one of the products. The extracellular hyaluronidase was increased up to 2400% in the culture exposed to 1/2 of the MIC, when the enzymatic activity was related to the number of CFU/ml. However at the same antimicrobial level the total suppression of the hemolytic activity of the culture was observed. These results strengthen the importance of antimicrobial subminimal inhibitory concentrations studies because of their influence on the biology and biochemistry of the microorganisms.

Referências Bibliográficas

1. Benchetrit, L.C.; Avelino, C.C. & Oliveira, C.M. - Effect of subminimal inhibitory concentrations of penicillin on hyaluronidase production by group A streptococci. Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig. A, 251:152-156, 1981.
2. Benchetrit, L.C.; Castro, A.C.D.; Figueiredo, A.M.S. & Barrucand, L. - Effects of subminimal inhibitory concentrations of antibiotics on groups A and G streptococci. Recent Advances in Streptococci and Streptococcal Diseases. Kimura, Y.; Kotami, S. & Shiokawa, Y. (eds). Reedbooks, Bracknell, England, p.305-308, 1985.

3. Benchetrit, L.C.; Fracalanza, S.E.L.; Peregrino, H.; Camelo, A.A. & Sanches, L.A.L.R. - Carriage of *Streptococcus agalactiae* in women and neonates and distribution of serological types: a study in Brazil. *J. Clin. Microbiol.*, 15:787-790, 1982.
4. Benchetrit, L.C.; Pahuja, S.L.; Gray, E.D. & Edstrom, R.D. - A sensitive method for the assay of hyaluronidase activity. *Anal. Biochem.*, 79:431-437, 1977.
5. El Kholi, A.; Wannamaker, L.W. & Krause, R.M. - Simplified extraction procedure for serological grouping of beta-hemolytic streptococci. *Appl. Microbiol.*, 28:836-839, 1974.
6. Faber, V. & Rosendal, K. - Streptococcal hyaluronidase. II. Studies on the production of hyaluronidase and hyaluronic acid by representatives of all types of hemolytic streptococci belonging to group A. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 35:159-164, 1954.
7. Ferne, M.; Rabinowitz, S.B.; Duchan, Z. & Michel, J. - Morphologic and enzymatic changes of haemolytic group A streptococci due to subminimal inhibitory concentrations of chloramphenicol, erythromycin, and penicillin. Basic Concepts of Streptococci and Streptococcal Diseases. Holm, S.E. & Christensen, P. (eds). Reedbooks, Chertsey, England, p.148-150, 1982.
8. Jones, R.N.; Barry, A.L.; Gavan, T.L. & Washington II, J.A. - Susceptibility tests: microdilution and macrodilution broth procedures. Manual of Clinical Microbiology. Lennette, E.H.; Balows, A.; Hausler Jr., W.J. & Shadomy, H.J. (eds). American Society for Microbiology, Washington DC, EUA, p.972-977, 1985.
9. Krogstad, D.J. & Moellering Jr., R.C. - Antimicrobial combinations. Antibiotics in Laboratory Medicine. Williams & Wilkins, Baltimore, EUA, p.537-595, 1986.
10. Lam, C. & Basalka, E. - Effect of subinhibitory concentrations of josamycin on the expression of M protein by group A streptococci. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, 4:279-281, 1985.
11. Lorian, V. - Effect of low antibiotic concentrations on ultrastructure, their virulence, and susceptibility to immunodefences. Antibiotics in Laboratory Medicine. Lorian, V. (ed). Williams and Wilkins, Baltimore, EUA, p.596-668, 1986.
12. McDowell, T.D.; Buchanan, C.E.; Coyette, J.; Swavely, T.S. & Shockman, G.D. - Effects on meccillinam and cefoxitin on growth, macromolecular synthesis, and penicillin-binding proteins in a variety of streptococci. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 23:750-756, 1983.
13. Michel, J.; Stessman, P. & Stessman, J. - Effects of subminimal inhibitory concentrations of erythromycin, clindamycin, and pristinamycin on the penicillinase production of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 17:13-15, 1980.
14. Ogaard, A.R.; Bjoro, K.; Bukholm, G. & Berdal, B.P. - *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors: modification by sub-inhibitory concentrations of carbenicillin or gentamicin. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B*, 94:63-68, 1986.
15. Paredes, A.; Wong, P. & Yow, M.D. - Failure of penicillin to eradicate the carrier state of group B *Streptococcus* in infants. *J. Pediat.*, 89:191-193, 1976.
16. Shibli, A.M. - Effect of antibiotics on production of enzymes and toxins by microorganisms. *Rev. Infect. Dis.*, 5:865-875, 1983.
17. Shibli, A.M. - Effect of antibiotics on adherence of microorganisms epithelial cell surfaces. *Rev. Infect. Dis.*, 7:51-65, 1985.
18. Shibli, A.M. & Sowayah, I.A. - Differential inhibition of bacterial growth and hemolysin production by lincosamide antibiotics. *J. Bacteriol.*, 137:1022-1023, 1979.
19. Washington II, J.A. - The effects and significance of subminimal inhibitory concentrations of antibiotics. *Rev. Infect. Dis.*, 1:781-786, 1979.
20. Yoh, M.; Yamamoto, K.; Honda, T.; Takeda, Y. & Niwatani, T. - Effects of lincomycin and tetracycline on production and properties of enterotoxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 42:778-782, 1983.

PHENETICAL STUDY APPLIED IN THE ELUCIDATION OF THE TAXONOMICAL POSITION OF ORAL STRAINS OF *S. SANGUIS* I, *S. SANGUIS* II AND *S. MITIS*

Maria Regina Lorenzetti Simionato
Flávio Zelante

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

& Rubens Alves Cunha

Deptº de Estatística
Instituto de Geociências e Ciências Exatas
Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho"

Resumo

Análise fenética aplicada na elucidação da posição taxonômica de cepas orais de *S. sanguis* I, *S. sanguis* II e *S. mitis*

Os resultados de 36 provas fisiológicas realizadas com cepas de *S. sanguis* I, *S. sanguis* II e *S. mitis* foram submetidos à análise fenética, através de métodos de agrupamento e ordenação, usando o sistema computacional "NTSY-pc". Comprovou-se a distribuição das cepas em dois grupos fenéticos, um deles constituído apenas por cepas de *S. sanguis* I, o outro, por cepas de *S. sanguis* II e *S. mitis*. Dessa forma, foi sugerido que as cepas de *S. sanguis*, que constituem um grupo feneticamente bem definido, devam ser incluídas na espécie *S. sanguis*, enquanto as cepas de *S. sanguis* II e *S. mitis* devam ser grupadas na espécie *S. mitior*.

Introduction

It has been demonstrated that *S. sanguis* constitutes a significant proportion of the oral streptococcal flora. Observations suggested that *S. sanguis* plays an important role in dental plaque formation either by its ability to attach to acquired pellicle (1, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 17, 18, 21) or by coaggregating with other microorganisms (14, 15, 16, 18). Despite its well demonstrated role in oral ecology, there are still controversial aspects in the classification of this species and the relationships of their biotypes with *S. mitis* strains. Thus, while many authors (2, 5, 9) have established the existence of two biotypes in the species *S. sanguis*, other

investigators (3, 10) have considered that *S. sanguis* biotype I possesses a combination of characteristics that allows its classification as typical *S. sanguis*, while *S. sanguis* biotype II and some strains of *S. mitis* should be combined in the "*S. mitior*" species.

The objective of this research was to submit for phenetical analysis the results obtained in a previous physiological study of *S. sanguis* and *S. mitis* strains (19) with the purpose of clarifying the classification of these strains.

Material and Methods

A phenetical analysis was applied on the results of a physiological behaviour survey of 22 *S. sanguis* biotype I, 22 *S.*

sanguis biotype II and 13 *S. mitis* strains isolated on Mitis-Salivarius Agar (Difco) and identificated from dental plaque according Facklam (5) (1977), in addition to the respective type strains. The selected tests to identify *S. sanguis* I, *S. sanguis* II and *S. mitis* were acid production from mannitol, sorbitol, lactose and inulin, hydrolysis of aesculin and reactions in litmus milk. The type strains utilized were *S. sanguis* ATCC 10556, *S. sanguis* ATCC 10557 and *S. mitis* ATCC 9811, and they were denominated in this paper as I/1, II/1 and M/1, respectively. The oral strains were also denominated as I/, II/ and M/ followed by the number of the strain.

Seventy two physiological characters were examined as previously described (19) and out of these, 36 were selected for phenetical analysis (Table 1), because the remaining ones were invariant characters among the strains.

The phenetical analysis was done with the aid of a computer and the program used was NTSYS-pc*. The strains of streptococci were clustered by UPGMA (unweighted pair group method with averages) applied to a matrix of taxonomical distances obtained from standardized data matrix (20). The original data matrix was also submitted to ordination by principal components analysis according to Sneath & Sokal (20) (1973).

Results

The positive results of the physiological behaviour for each test and strain are presented in Table 1.

The results of phenetical analysis are shown in Figures 1 and 2. In Figure 1, the phenogram represents the interrelationships of the strains, with a cophenetic correlation of $r=0,874$, while Figure 2 shows a tridimensional ordination of the strains on three principal components. In order to obtain a better visualization, the graphics were designed considering the major groups.

Discussion

By phenetical analysis, using clustering and ordination methods, the interrelationships of the studied strains were proposed. The results of both methods agreed in the composition of the major groups.

The UPGMA phenogram (Figure 1), revealed to be the more effective method to show the phenons at high levels of similarity. The ordination method resulted in the establishment of the position of each one of the strains in a tridimensional space.

In such a way, the phenogram revealed two major groups at a similarity level of 0,668. The first one is composed of all strains of *S. sanguis* I, and also including *S. mitis* strains M/2 and M/6. The remaining group is composed of *S. sanguis* II strains and the others *S. mitis* strains. This result is in agreement with those of many authors (3, 4, 10) that demonstrated more uniform physiological, immunological and genetic behaviour of *S. sanguis* I strains. This study also demonstrated that *S. sanguis* I strains is a group phenetically well defined, agreeing with earlier investigators that prefered to include this biotype in the *S. sanguis* species (3, 10). On the other hand, *S. sanguis* II and *S. mitis* strains, that form the other major group, should be grouped with the *S. mitior* species, as many authors have suggested (3, 10).

The computation program NTSYS-pc revealed to be very adequated to this analysis and facilitated the aplication of the phenetical analysis. Thus, phenetical analysis revealed to be a helpful method that can contribute to elucidate the classification of microorganisms that have not a well defined taxonomic position.

Summary

In this study a phenetical analysis both by grouping and ordination methods were applied on physiological tests performed with *S. sanguis* I, *S. sanguis* II and *S. mitis* oral strains. Among the 72 characters initially proposed, 36 were selected for phenetical analysis. Both methods demonstrated the existence of two major groups. One is constituted only of *S. sanguis* I strains, while the

*Rohlf, F.J. "NTSYS-pc", 1986. Applied Biostatistics Inc. 3 Heritage Lane, Setauket, NY 11733.

Table 1 - Selected characters of the physiological behaviour of *S. sanguis* I, *S. sanguis* II and *S. mitis* strains which were useful to phenetical analysis.

Symbols: a = Reaction in 5% sucrose broth was considered as a unique character and was codified as 2 - 1 - 0, corresponding to gel, partial gel and none respectively; b = The measurement of final pH of each strain was maintained in the data matrix. Then, final pH at 24 h was considered as a unique character, and at 48 h and 72 h so to.

Physiological characters	<i>S. sanguis</i> I n=23	<i>S. sanguis</i> II n=23	<i>S. mitis</i> n=14
Reaction in 5% sucrose broth^a			
gel	2/23	2/23	0/14
partial gel	8/23	1/23	1/14
none	13/23	22/23	13/14
Growth at 25°C	21/23	23/23	13/14
Acid production from			
amylodalin	11/23	0/23	0/14
arabin	22/23	0/23	2/14
cellobiose	22/23	0/23	2/14
dextrin	9/23	9/23	9/14
maltoze	23/23	23/23	13/14
mannose	23/23	22/23	13/14
melibiose	0/23	3/23	0/14
rhamnose	0/23	1/23	0/14
salicin	22/23	0/23	4/14
trehalose	23/23	1/23	6/14
Hydrolysis			
arginine	23/23	0/23	2/14
starch	22/23	21/23	14/14
Reduction of			
0,01% methylene blue	22/23	20/23	14/14
clot	18/23	19/23	14/14
0,02% methylene blue	21/23	14/23	12/14
clot	18/23	14/23	10/14
0,1% methylene blue	18/23	12/23	7/14
clot	14/23	12/23	6/14
Nitrile	21/23	1/23	9/14
0,01% sodium selenite	13/23	5/23	5/14
0,01% tetrozolium	12/23	13/23	8/14
Tolerance to:			
1% sodium azide	1/23	0/23	0/14
5% bile	23/23	4/23	4/14
10% bile	23/23	1/23	4/14
40% bile	21/23	0/23	1/14
7% NaCl	22/23	4/23	6/14
4% NaCl	13/23	0/23	0/14
0,0002% crystal violet	21/23	19/23	12/14
0,0004% crystal violet	18/23	17/23	9/14
0,01% sodium selenite	13/23	5/23	5/14
0,01% tetrozolium	12/23	13/23	8/14
final pH^b			
24 h			
3,9 - 4,1	0/23	21/23	7/14
4,2 - 4,6	20/23	1/23	3/14
4,7	3/23	1/23	4/14
48 h			
3,9 - 4,1	1/23	22/23	8/14
4,2 - 4,6	21/23	1/23	4/14
4,7	1/23	0/23	2/14
72 h			
3,9 - 4,1	1/23	22/23	8/14
4,2 - 4,6	21/23	1/23	5/14
4,7	1/23	0/23	1/14

Figure 1 - Distance UPGMA phenogram of strains of *S. sanguis* I, *S. sanguis* II and *S. mitis*. Cophenetic correlation $r = 0,874$.

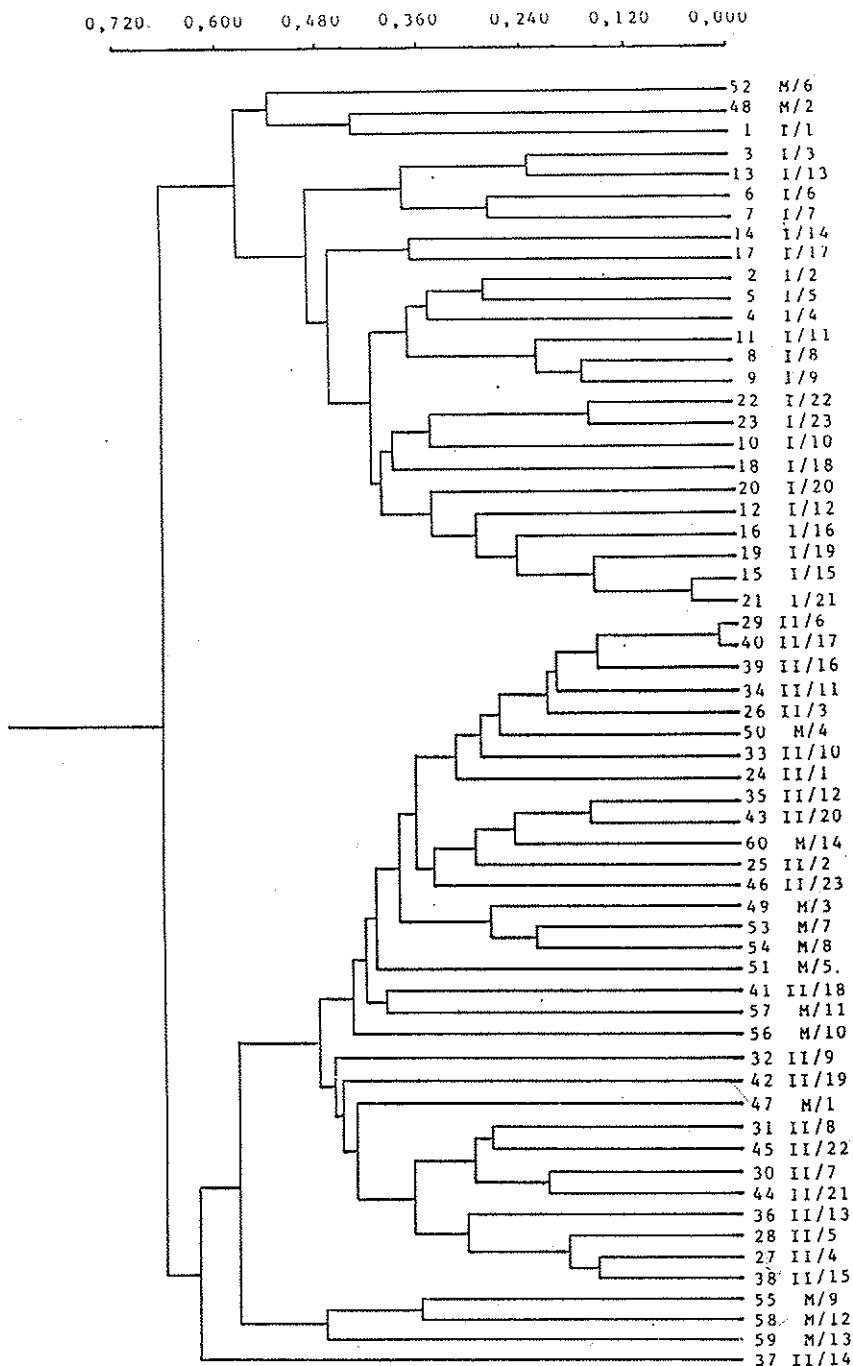
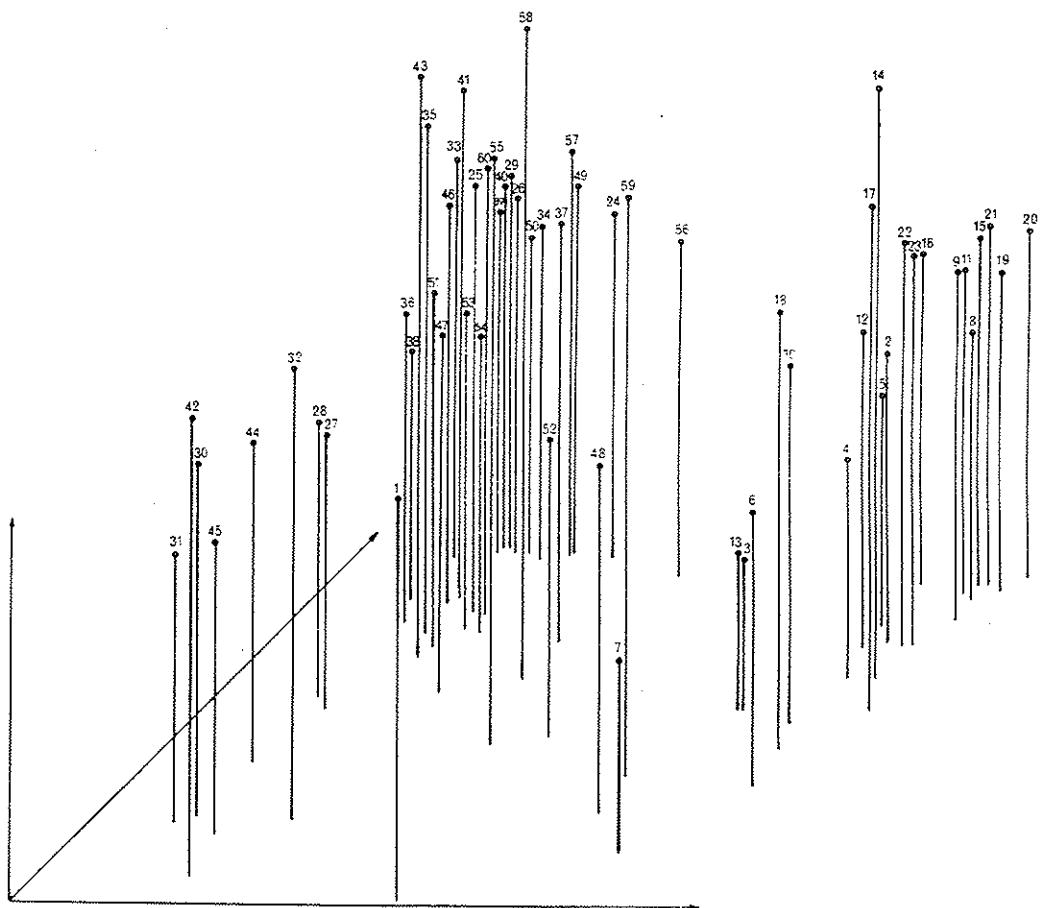


Figure 2 - Three dimensional projection of *S. sanguis* I, *S. sanguis* II and *S. mitis* strains.



other of *S. sanguis* II and *S. mitis* strains. Thus, it suggests that the *S. sanguis* I strains, which constitute a well defined phenetical group, should be included in the *S. sanguis* species, while *S. sanguis* II and *S. mitis* strains should be grouped in the *S. mitior* species.

Acknowledgement

This research was carried out with financial support from CNPq (Projects nº 40.3665 and nº 40.0676-83/ZO).

References

- Appelbaum, B.; Gotlib, E.; Holt, S.C.; Rosan, B. - In vitro studies of dental plaque formation: absorption of oral streptococci to hydroxyapatite. *Infect. Immun.*, 25:717-728, 1979.
- Carlsson, J. - A numerical taxonomic study of human oral streptococci. *Odontol. Revy*, 19:137-160, 1968.
- Colman, G.; Williams, R.E.O. - Taxonomy of some human viridans streptococci. In: Wannamaker, L.W.; Matsen, J.M., eds. *Streptococci and streptococcal diseases*. New York: Cambridge Univ. Press, 281-299, 1972.

4. Coykendall, A.L.; Specht, P.A. - DNA bases sequence homologies among strains of *Streptococcus sanguis*. *J. Gen. Microbiol.*, 91:92-98, 1975.
5. Facklam, R.R. - Physiological differentiation of viridans streptococci. *J. Clin. Microbiol.*, 5:184-201, 1977.
6. Gibbons, R.J. - Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. *J. Dent. Res.*, 63:378-385, 1984.
7. Gibbons, R.J.; Etherden, I.; Skobe, Z. - Association of fimbriae with the hydrophobicity of *Streptococcus sanguis* FC-1 and adherence to salivary pellicles. *Infect. Immun.*, 41:414-417, 1983.
8. Gibbons, R.J.; Etherden, I.; Moreno, E.C. - Association of neuraminidase-sensitive receptors and putative hydrophobic interactions with high-affinity binding sites for *Streptococcus sanguis* CS in salivary pellicles. *Infect. Immun.*, 42:1006-1012, 1983.
9. Hamada, S.; Torii, M.; Tsuchitani, Y.; Kotani, S. - Isolation and immunobiological classification of *Streptococcus sanguis* from human tooth surface. *J. Clin. Microbiol.*, 12:243-249, 1980.
10. Hardine, J.M. - Oral streptococci. In: Holt, J.G., ed. *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1054-1063, 1986. v.2.
11. Hogg, S.D.; Handley, P.S.; Embery, G. - Surface fibrils may be responsible for the salivary glycoprotein-mediated aggregation of the oral bacterium *Streptococcus sanguis*. *Arch. Oral Biol.*, 26:945-949, 1981.
12. Levine, M.J.; Herzberg, M.C.; Levine, M.S.; Ellison, S.A.; Stinson, M.W.; Li, H.C.; Van Dyke, T. - Specificity of salivary-bacterial interactions: role of terminal sialic acid residues in the interaction of salivary glycoproteins with *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.*, 19:107-115, 1978.
13. Liljemark, W.F.; Bloomquist, C.G.; Ofstehage, J.C. - Aggregation and adherence of *Streptococcus sanguis*: role of human salivary immunoglobulin A. *Infect. Immun.*, 26:1104-1110, 1979.
14. McIntire, F.C.; Vatter, A.E.; Barros, J.; Arnold - Mechanism of coaggregation between *Actinomyces viscosus* T14V and *Streptococcus sanguis* 34. *Infect. Immun.*, 21:978-988, 1978.
15. Mizuno, J.; Cisar, J.A.; Vatter, A.E.; Fennessey, P.V.; McIntire, F.C. - A factor from *Actinomyces viscosus* T14V that specifically aggregates *Streptococcus sanguis* H1. *Infect. Immun.*, 40:1204-1213, 1983.
16. Mouton, C.; Reynolds, H.S.; Genco, R.J. - Characterization of tufted streptococci isolated from the "corn cob" configuration of human dental plaque. *Infect. Immun.*, 27:235-245, 1980.
17. Nagata, K.; Nakao, M.; Shibata, S.; Shizukuishi, S.; Nakamura, R.; Tsunemitsu, A. - Purification and characterization of galactosephilic component present on the cell surfaces of *Streptococcus sanguis* ATCC 10557. *J. Periodontol.*, 54:163-172, 1983.
18. Newbrun, E. - *Cariology*. 2nd ed. London: William & Wilkins, 1983. 344p.
19. Simionato, M.R.L.; Zelante, F. - Physiological analysis of oral strains of *S. sanguis* I, *S. sanguis* II and *S. mitis*. *Rev. Microbiol.*, 20, 1989.
20. Sneath, P.H.A.; Sokal, R.R. - *Numerical taxonomy*. San Francisco W.H. Freeman, 1973.
21. Stinson, M.W.; Levine, M.J.; Cavese, J.M.; Prakobphol, A.; Murray, P.A.; Tabak, L.A.; Reddy, M.S. - Adherence of *Streptococcus sanguis* to salivary mucin bound to glass. *J. Dent. Res.*, 61:1390-1393, 1982.

Recebido para publicação em 27/12/88

PHYSIOLOGICAL ANALYSIS OF ORAL STRAINS OF *STREPTOCOCCUS SANGUIS I*, *STREPTOCOCCUS SANGUIS II* AND *STREPTOCOCCUS MITIS*

Maria Regina Lorenzetti Simionato
& Flávio Zelante

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

Resumo

Análise fisiológica de cepas orais de *Streptococcus sanguis I*, *Streptococcus sanguis II* e *Streptococcus mitis*

Apesar do grande número de estudos, permanecem, ainda, contradições a respeito de aspectos fisiológicos, sorológicos e genéticos de *S. sanguis* e *S. mitis*, que refletem em sua classificação. Assim, foram verificadas 72 características fisiológicas de cepas de *S. mitis* e de *S. sanguis* biotipos I e II isolados de placa dental. Os resultados, além de revelarem a caracterização fisiológica das cepas, demonstraram a importância das provas de produção de ácidos a partir de arbutina, cellobiose e salicina, hidrólise de arginina e tolerância a 40% de bile para a sua diferenciação. Dessa forma, foi sugerida a inclusão destes testes nos esquemas de identificação dessas espécies, em adição aos comumente utilizados. Além disso, as cepas padrão utilizadas demonstraram, em algumas provas, comportamento oposto às de idêntico biotipo isoladas de placa dental, sendo preconizado, então, que os estudos taxonômicos não devam se basear unicamente no comportamento das cepas padrão.

Introduction

Viridans streptococci comprise the largest portion of the oral microbial flora. *Streptococcus sanguis* appears to be among pioneer organisms that colonize the tooth surface (1, 16, 17, 18, 21, 22, 23, 27, 28, 32), remaining in high levels in the mature plaque through its ability to interact with other organisms (24, 25, 26, 28). In spite of the great number of physiological, serological and genetic studies of *Streptococcus sanguis*, many contradictions concerning its classification have persisted in the literature.

White & Niven (34) (1946) applied the name *S. sanguis* to viridans streptococci which hydrolyse arginine, aesculin and produce glucan from sucrose. Later, Carlsson (6) (1968) reported the division of this species into the biotypes I:A and I:B. The strains in group I:B resembled closely the *S. sanguis* described by White &

Niven (34) (1946), while the strains in group I:A did not have the combination of characteristics that was considered unique for this species. Carlsson (6) (1968) classified these strains as *S. sanguis* based on their common habitat and similar morphology. Colman & Williams (7) (1972) considered the strains belonging to Carlsson's group I:A as glucan producing *S. mitior*. Coykendall & Specht (9) (1975) established the genetic relationships among *S. sanguis* strains and suggested the division of this species in two subspecies, excluding the strains that resembled *S. mitior*. Facklam (13) (1977) proposed an identification scheme which allows the differentiation among *S. sanguis I*, *S. sanguis II* and *S. mitis* strains. Hamada & Col. (19) (1980) classified isolates of *S. sanguis* in biotypes A and B, although the B strains resembled *S. mitior*. Thus, they agreed with Carlsson (6) (1968) and Facklam (13) (1977) in classifying these strains as *S. sanguis*, considering of

high value the ability to synthetize glucan from sucrose. The ninth edition of Bergey's Manual (20) considers Facklam's *S. sanguis* I analogous to typical *S. sanguis* and recommends that Facklam's *S. sanguis* II and some strains of *S. mitis* should be combined into one species, "*S. mitior*". The species *S. mitis* persists in this Manual as a species "incertae sedis".

Contradictions in the criteria used to establish these species remain among the investigators. The purpose of this research was to study the physiological aspects of Facklam's *S. sanguis* I and II and *S. mitis* oral strains and to analyse the value of various tests, some used as a routine in the laboratory and others not, to separate these strains.

Material and Methods

1. Bacterial strains

Isolation and identification of *S. mitis*, *S. sanguis* I and II strains from dental plaque - Dental plaque samples were collected with sterile toothpicks from 30 subjects. The samples were dispersed in flasks containing 5,0ml of sterile saline and glass beads, then they were diluted in saline to 1/100, 1/500 and 1/1000 and inoculated on Mitis Salivarius Agar (Difco) plates (MS), incubated at 37°C/48hs in candle jars. Some colonies resembling *S. sanguis* and *S. mitis* were selected and a pure culture of each isolate was obtained by repeated transfers on MS plates. The isolated strains were identified adopting criteria recommended by Facklam (13) (1977), based on acid production from lactose, inulin, mannitol, sorbitol and raffinose, aesculin hydrolysis and reactions in litmus milk. In this way, 22 *S. sanguis* I, 22 *S. sanguis* II and 13 *S. mitis* strains were selected.

Type strains - Type strains of *S. sanguis* ATCC 10556 (Facklam's biotype I), ATCC 10557 (Facklam's biotype II) and *S. mitis* ATCC 9811 were kindly provided by Dr. Lucia Martins Teixeira from the "Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro".

2. Physiological tests

Growth at different temperatures - Strains were grown in Brain Heart Infusion (Difco) (BHI) for 24d at 4°C, 10d at 10°C, 48h at 25°C and 45°C, and growth was recorded as visible turbidity (11).

Haemolytic activity - Was examined after 48h of incubation either by pour plate or anaerobic system (Gas Pack) on Heart Infusion Agar (Difco) (HIA) containing 4% of defibrinated sheep blood.

Reaction in 5% sucrose broth - The property of gel formation after 48h incubation was tested in broth described by Stoppelaar & Col. (33) (1967).

Catalase production - Was examined on Brain Heart Infusion Agar (Difco) (BHIA) slants containing 1% dextrose. The surface of 16h cultures were flooded with 3% hydrogen peroxide to detect the catalase production (8).

Peroxide formation - Was observed as a dark colouration around growth on heated blood agar with o-dianisidine, according to Wittenbury (35) (1964).

Reactions of hydrolysis - Arginine hydrolysis was carried out following Niven & Col. (29) (1942). Aesculin hydrolysis was performed as described by Sands & Col. (31) (1982). Gelatin hydrolysis was tested on Heart Infusion Broth (Difco) (HIB) containing 12% of gelatin as recommended by Facklam (11) (1972). Hippurate hydrolysis was observed using the method of Facklam & Col. (15) (1974). Starch hydrolysis was detected on HIA containing 2% soluble starch. Plates were flooded with Gram's iodine after 48h incubation in order to stain unhydrolysed starch (11).

Acid production from carbohydrates - Were investigated in HIB containing bromocresol purple and 1% of the following carbohydrates: adonitol, amygdalin, arabinose, arbutin, cellobiose, dextrin, dulcitol, fructose, galactose, glycerol, dextrose, inositol, inulin, lactose, maltose, mannose, mannitol, melezitose, mellibiose, raffinose, rhamnose, sucrose, salicin, sorbitol, sorbose, trehalose, xylitol and xylose, as described by Facklam (11)

Table 1A - Physiological behaviour of *S. sanguis* I,
S. sanguis II and *S. mitis* strains.

	<i>S. sanguis</i> I n=23	<i>S. sanguis</i> II n=23	<i>S. mitis</i> n=14
Growth at			
4°C	0/23	0/23	0/14
10°C	0/23	0/23	0/14
25°C	21/23	23/23	13/14
45°C	0/23	0/23	0/14
Alpha haemolysis			
pour plate	23/23	23/23	14/14
Gas Pack	23/23	23/23	14/14
Reaction in % sucrose broth			
gel	2/23	0/23	0/14
partial gel	8/23	1/23	1/14
none	13/23	22/23	13/14
Catalase production	0/23	0/23	0/14
Peroxide formation	23/23	23/23	14/14
Hydrolysis			
arginine	23/23	0/23	2/14
gelatin	0/23	0/23	0/14
hippurate	0/23	0/23	0/14
starch	22/23	21/23	14/14
Acid production from			
adonitol	0/23	0/23	0/14
amygdalin	11/23	0/23	0/14
arabinose	0/23	0/23	0/14
arbutin	22/23	0/23	2/14
celllobiose	22/23	0/23	2/14
dextrans	9/23	9/23	9/14
dulcitol	0/23	0/23	0/14
fructose	23/23	23/23	14/14
galactose	23/23	23/23	14/14
glycerol	0/23	0/23	0/14
dextrose	23/23	23/23	14/14
inositol	0/23	0/23	0/14
maltose	23/23	23/23	13/14
mannose	23/23	22/23	13/14
melicitose	0/23	0/23	0/14
melibiose	0/23	3/23	0/14
rhamnose	0/23	1/23	0/14
sucrose	23/23	23/23	14/14
salicin	22/23	0/23	4/14
sorbose	0/23	0/23	0/14
trehalose	23/23	1/23	6/14
xylitol	0/23	0/23	0/14
xylose	0/23	0/23	0/14

(1972).

Final pH - After 24, 48 and 72h incubation in BHI containing 5% dextrose, final pH was measured with a digital pH meter.

Tolerance to inhibitory compounds and heat - Growth was observed as visible turbidity in BHI containing 2%, 3%, 4% and 6,5% NaCl after 72h incubation (12). HIA was used as basal medium for the preparation of 5%, 10% or 40% blood bile (3), 1% sodium azide (3), 1% thallous acetate (3, 10), 0,1% sodium selenite (3), 0,0002% and 0,0004% crystal violet (3), 0,04% and

0,1% potassium tellurit (11), 0,01% and 0,1% 2, 3, 5 triphenyl tetrazolium chloride agar plates (11). The tolerance to these compounds was recorder when examination of the plates revealed growth of colonies at any time interval within 72h incubation. Resistance to heat was determined by inoculating the strains in BHI and leaving the tubes at 60°C during 1, 15 and 30 min, 1 and 2h. The cultures were cooled in tap water and incubated for 72h (14).

Reactions of reduction - Reduction of nitrate and nitrite were recorded in BHI containing either 0,1% KNO₃ or 0,001% NaNO₂ with Durhan tubes, as recommended

Table 1B - Physiological behaviour of *S. sanguis* I, *S. sanguis* II and *S. mitis* strains.

	<i>S. sanguis</i> I n=23	<i>S. sanguis</i> II n=23	<i>S. mitis</i> n=14
Final pH:			
24h			
3,9-4,1	0/23	21/23	7/14
4,2-4,6	20/23	1/23	3/14
>4,7	5/23	1/23	4/14
48h			
3,9-4,1	1/23	22/23	8/14
4,2-4,6	21/23	1/23	4/14
>4,7	1/23	0/23	2/14
72h			
3,9-4,1	1/23	22/23	8/14
4,2-4,6	21/23	1/23	5/14
>4,7	1/23	0/23	1/14
Tolerance to:			
2% NaCl	23/23	23/23	14/14
3% NaCl	22/23	4/23	6/14
4% NaCl	13/23	0/23	0/14
6,9% NaCl	0/23	0/23	0/14
5% bile	23/23	4/23	4/14
10% bile	23/23	1/23	4/14
40% bile	7/23	0/23	1/14
1% sodium azide	1/23	0/23	0/14
1% thallous acetate	23/23	23/23	14/14
0,07% selenite	22/23	21/23	12/14
0,002% crystal violet	20/23	19/23	12/14
0,0004% crystal violet	18/23	17/23	9/14
0,04% tellurit	0/23	0/23	0/14
0,1% tellurit	0/23	0/23	0/14
0,01% tetrazolium	14/23	13/23	9/14
0,1% tetrazolium	0/23	0/23	0/14
60°C/1 min.	23/23	23/23	14/14
60°C/15 min.	0/23	0/23	0/14
60°C/30 min.	0/23	0/23	0/14
60°C/1 h.	0/23	0/23	0/14
60°C/2 h.	0/23	0/23	0/14
Reduction of:			
0,01% methylene blue	22/23	20/23	14/14
clot	18/23	19/23	14/14
0,02% methylene blue	21/23	14/23	12/14
clot	18/23	14/23	10/14
0,1% methylene blue	18/23	12/23	7/14
clot	14/23	12/23	6/14
nitrate	0/23	0/23	0/14
nitrite	21/23	1/23	9/14
0,01% selenite	13/23	5/23	5/14
0,01% tetrazolium	12/23	13/23	8/14

by Blazevic & Ederer (2) (1975). Reduction of 0,01%, 0,02% and 0,1% of methylene blue were performed in skim milk as recommended by Facklam & Moody (14) (1970). Reduction of sodium selenite and tetrazolium were recorded only when the strain showed resistance to the respective concentrations of these compounds, revealed by the growth of red colonies.

Results

Among the strains isolated and identified from dental plaque, 22 *S.*

sanguis I, 22 *S. sanguis* II and 13 *S. mitis* were selected. These, in addition to the respective type strains, were submitted to the physiological tests proposed. The results are recorded at the Table 1.

Discussion

The purpose of the high number of tests included in this research was to verify the physiological behaviour of *S. sanguis* I, II and *S. mitis* strains.

Moreover, this approach should reveal which tests, including those not used as a routine in streptococcal studies, would be useful in separating these strains.

The tests which demonstrated major differences were arbutin, cellobiose and salicin acid production, arginine hydrolysis and tolerance to 40% bile. It was verified that only *S. sanguis* I strains produced acid from arbutin, cellobiose and salicin, which agreed with Carlsson (6) (1968), but not to the results reported by Bridge & Sneath (3) (1983). In relation to salicin, our results confirmed the data of Facklam (13) (1977) and White & Niven (34) (1946), but disagreed with Facklam (13) (1977) in relation to *S. sanguis* II behaviour. In agreement with several investigators (3, 4, 5, 7, 9, 13, 19, 30, 34), all *S. sanguis* I strains have produced ammonia from arginine, in contrast with no *S. sanguis* II and only two *S. mitis* strains, confirming the high differential value of this test. In respect to bile tolerance, *S. sanguis* I strains revealed more resistance to the concentrations analysed, when compared with other investigators (3, 6, 13).

Thus, we suggest the inclusion of these tests in the identification schemes of these strains, in addition to those routinely proposed. In contrast, the remainder provided no differentiation, because in some instances the tested organisms showed the same behaviour and in others the analysed character was variable for the tested species and biotypes.

In reference to the type strains, *S. sanguis* ATCC 10556 presented opposite behaviour in acid production from arbutin, cellobiose and salicin, reduction of methylene blue and tolerance to crystal violet, when compared with strains of identical biotype isolate from dental plaque. In relation to *S. sanguis* ATCC 10557, the same variance occurred in the tolerance tests to 5% and 10% bile. Thus we suggest that, in characterization studies related to taxonomical aspects, the inclusion of clinical isolates strains, as well as types strains, is necessary.

Summary

In spite of the great number of studies, contradictions still remain in the literature about the physiological, serological and genetic aspects of *S. sanguis* and *S. mitis* strains, and by consequence, about their classification. In this paper, 72 physiological characteristics of *S. mitis* and *S. sanguis* biotypes I and II strains were analysed. The results also demonstrated, besides the physiological characterization, the importance of acid production from arbutin, cellobiose and salicin, arginine hydrolysis and 40% bile tolerance tests in the differentiation of these strains. Thus, it suggests the inclusion of these tests in the identification schemes of these strains, in addition to those commonly proposed. Nevertheless, the type strains demonstrated, in some tests, a behaviour opposite to others of identical biotype isolated from dental plaque. Thus, it also suggests that taxonomy studies should not be based on the behaviour of type strains.

Acknowledgment

This research was carried out with financial support from CNPq (Project CNPq n° 40.3665/84).

References

- Appelbaum, S.; Gotlib, E.; Holt, S.C.; Rosen, B. - In vitro studies of dental plaque formation: adsorption of oral streptococci to hydroxyapatite. *Infect. Immun.*, 25:717-728, 1979.
- Bilazovic, D.J.; Ederer, G.M. - Principles of biochemical tests in diagnostic microbiology. New York: John Wiley, 1975. 136p.
- Bridge, P.D.; Sneath, P.H.A. - Numerical taxonomy of *Streptococcus*. *J. Gen. Microbiol.*, 129:565-597, 1983.
- Carlsson, J. - Zoogloea-forming streptococci, resembling *Streptococcus sanguis*, isolated from dental plaque in man. *Odontol. Revy*, 16:348-356, 1965.
- Carlsson, J. - Presence of various types of non-haemolytic streptococci in dental plaque and in other sites of the oral cavity in man. *Odontol. Revy*, 16:55-74, 1967.

6. Carlsson, J. - A numerical taxonomic study of human oral streptococci. *Odontol. Revy.*, 19:137-160, 1968.
7. Colman, G.; Williams, R.E.O. - Taxonomy of some human viridans streptococci. In: Wannamaker L.W.; Matsen, J.M. eds. *Streptococci and streptococcal diseases*. New York: Cambridge Univ. Press, 281-299, 1972.
8. Cowan, S.T.; Steel, K.J. - Manual for the identification of medical bacteria. 2nd ed. London: Cambridge Univ. Press, 1974. 238p.
9. Coykendall, A.L.; Specht, P.A. - DNA base sequence homologies among strains of *Streptococcus sanguis*. *J. Gen. Microbiol.*, 91:92-98, 1975.
10. Crawford, Y.E. - A laboratory guide to the mycoplasmas of human origin. 2nd ed. Great Lakes: Naval Medical Research Unit No 4, 1972. 60p.
11. Facklam, R.R. - Recognition of group D streptococcal species of human origin by biochemical and physiological tests. *Appl. Microbiol.*, 23:1131-1139, 1972.
12. Facklam, R.R. - Comparison of several laboratory media for presumptive identification of enterococci and group D streptococci. *Appl. Microbiol.*, 26:138-145, 1973.
13. Facklam, R.R. - Physiological differentiation of viridans streptococci. *J. Clin. Microbiol.*, 5:184-201, 1977.
14. Facklam, R.R.; Moody, M.D. - Presumptive identification of group D streptococci: the bile-esculin test. *Appl. Microbiol.*, 20:245-250, 1970.
15. Facklam, R.R.; Padula, J.F.; Thackler, L.G.; Wortham, E.C.; Sconyers, B.J. - Presumptive identification of group A, B and D streptococci. *Appl. Microbiol.*, 27:107-113, 1974.
16. Gibbons, R.J. - Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. *J. Dent. Res.*, 63:378-385, 1984.
17. Gibbons, R.J.; Etherden, I.; Skobe, Z. - Association of fimbriae with the hydrophobicity of *Streptococcus sanguis* FC-1 and adherence to salivary pellicles. *Infect. Immun.*, 41:414-417, 1983.
18. Gibbons, R.J.; Etherden, I.; Moreno, E.C. - Association of neuraminidase-sensitive receptors and putative hydrophobic interactions with high-affinity binding for *Streptococcus sanguis* CS in salivary pellicles. *Infect. Immun.*, 42:1006-1012, 1983.
19. Hamada, S.; Torii, M.; Tsuchitani, Y.; Kotani, S. - Isolation and immunobiological classification of *Streptococcus sanguis* from human dental surface. *J. Clin. Microbiol.*, 12:243-249, 1980.
20. Hardie, J.M. - Oral streptococci. In: Holt, J.G., ed. *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1054-1063, 1986. v.2.
21. Hogg, S.D.; Handley, P.S.; Embery, G. - Surface fibrils may be responsible for the salivary glycoprotein-mediated aggregation of the oral bacterium *Streptococcus sanguis*. *Arch Oral Biol.*, 26:945-949, 1981.
22. Levine, M.J.; Herzberg, M.C.; Levine, M.S.; Ellison, S.A.; Stinson, M.W.; Li, H.C.; Van Dyke, T. - Specificity of salivary-bacterial interactions: role of terminal sialic acid residues in the interaction of salivary glycoproteins with *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.*, 19:107-115, 1978.
23. Liljemark, W.F.; Bloomquist, C.G.; Ofstehage, J.C. - Aggregation and adherence of *Streptococcus sanguis*: role of human salivary immunoglobulin A. *Infect. Immun.*, 26:1104-1110, 1979.
24. McIntire, F.C.; Vatter, A.E.; Baros, J.; Arnold, J. - Mechanism of coaggregation between *Actinomyces viscosus* T14V and *Streptococcus sanguis* 34. *Infect. Immun.*, 21:978-988, 1978.
25. Mizuno, J.; Cisar, J.A.; Vater, A.E.; Fennessey, P.V.; McIntire, F.C. - A factor from *Actinomyces viscosus* T14V that specifically aggregates *Streptococcus sanguis* H1. *Infect. Immun.*, 40:1204-1213, 1983.
26. Mouton, C.; Reynolds, H.S.; Genco, R.J. - Characterization of tufted streptococci isolated from the "corn cob" configuration of human dental plaque. *Infect. Immun.*, 27:235-245, 1980.
27. Nagata, K.; Nakao, M.; Shibata, S.; Shizukuishi, S.; Nakamura, R.; Tsunemitsu, A. - Purification and characterization of galactosephilic component present on the cell surfaces of *Streptococcus sanguis* ATCC 10557. *J.*

- Periodontol., 54:163-172, 1983.
28. Newbrum, E. - Cariology. 2nd ed. London: Williams & Wilkins, 1983. 344p.
29. Niven Jr., C.F.; Smiley, K.L.; Sherman, J.M. - The hydrolysis of arginine by streptococci. J. Bacteriol., 43:651-660, 1942.
30. Price, T.; French, G.L.; Talsania, H.; Phillips, I. - Differentiation of *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus mitior* by whole-cell thiamose content and possession of arginine dihydrolase. J. Med. Microbiol., 21:189-197, 1986.
31. Sands, M.; Sommers, H.M.; Rubin, M.B. - Speciation of the "viridans" streptococci. Am. J. Clin. Pathol., 78:78-80, 1982.
32. Stinson, M.W.; Levine, M.J.; Cavese, J.M.; Prakobphol, A.; Murray, P.A.; Tabak, L.A.; Reddy, M.S. - Adherence of *Streptococcus sanguis* to salivary mucin bound to glass. J. Dent. Res., 61:1390-1393, 1982.
33. Stoppelaar, J.D.; Van Houte, J.; Moor, C.E. - The presence of dextran-forming bacteria, resembling *Streptococcus bovis* and *Streptococcus sanguis*, bovis and *Streptococcus sanguis*, in human dental plaque. Arch. Oral Biol., 12:1199-1201, 1967.
34. White, J.C. & Niven Jr., C.F. - *Streptococcus s.b.e.*: a streptococcus associated with subacute bacterial endocarditis. J. Bacteriol., 51:717-722, 1946.
35. Whittenbury, R. - Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. J. Gen. Microbiol., 35:13-26, 1964.

Recebido para publicação em 27/12/88

PERFIL DE PLASMÍDIOS E RESISTÊNCIA A BACTERIÓFAGOS EM ESTREPTOCOCOS LÁCTICOS MÉSÓFILOS

Alda Luiza Santos Lerayer

ITAL

Av. Brasil, 2880

13073 Campinas SP, Brasil

& Marie-Christine Chopin

INRA

rue de Saint Brieuc

35000 Rennes, França

Resumo

Dentre 58 culturas lácticas pertencentes à Coleção de Fermentos Lácticos do ITAL, previamente selecionadas quanto às características tecnológicas, 21 apresentaram perfis de plasmídios diferentes observando-se, para as restantes, seis tipos de perfis análogos. Todas as culturas que possuíam perfis distintos mostraram-se lisogênicas, com liberação de profagos após indução com luz ultravioleta. Através do espectro lítico por elas apresentado, em relação a fagos virulentos e aos profagos liberados, pode-se classificá-las em três grupos, a saber: $G_1 = 168$; $G_2 = \text{linhagens } 307, 309, 16 \text{ e } 262$ e, $G_3 = \text{linhagens } 310, 96, 97, 105, 163, 175, 179 \text{ e } 162$. Verificou-se, ainda, que as linhagens 310 e 162 apresentaram sistemas de restrição e modificação de 4 log e 2 log, respectivamente, em relação aos fagos 66, 67 e 188 para a primeira delas e 66 para a segunda. Foi possível definir quais linhagens não poderiam coexistir num mesmo sistema de "starter", misto ou múltiplo.

Introdução

Os estreptococos lácticos do grupo N, especialmente os *Streptococcus lactis*, *S. cremoris* e *S. lactis* subsp. *diacetylactis*, são diretamente responsáveis pela acidificação do leite por meio da transformação da lactose em ácido láctico e, consequentemente, pelas qualidades organolepticas dos produtos lácticos.

Enquanto na maior parte das indústrias de fermentação são utilizadas linhagens de microrganismos selecionadas e melhoradas geneticamente, a indústria de laticínios apenas dispõe, em geral, de culturas selvagens com propriedades mal definidas e utilizadas em misturas.

Dentre os problemas que impedem a utilização de culturas puras selecionadas, um dos mais importantes

é a destruição por bacteriófagos durante os processamentos industriais. A ocorrência de fagos causa perdas econômicas muito importantes às fabricações de queijo e impede qualquer emprego racional de linhagens já melhoradas para características tecnológicas.

Vários procedimentos têm sido utilizados no controle de bacteriófagos (16, 20, 23, 25, 44, 50, 52); entretanto, além de não prevenirem completamente a infecção fágica, necessitam de instrumentos que nem sempre estão disponíveis na indústria. Ademais, os bacteriófagos multiplicam-se em profusão, podendo uma fábrica produzir aproximadamente 10^{16} fagos diariamente.

A maioria das linhagens de estreptococos lácticos possui plasmídios dos mais variados tamanhos (4, 10). A

biologia de plasmídios tem se tornado uma área importante de investigação nas bactérias lácticas, pois numerosas características fermentativas e metabólicas, de grande instabilidade em alguns desses organismos, estão ligadas a genes localizados em plasmídios (34), tais como: a fermentação de lactose, galactose, sacarose, glicose, manose e xilose (3, 8, 14, 21, 27, 37); a utilização de citrato (22); a produção de proteinases (32, 36, 38) e de nisin e bacteriocinas (9, 15, 46); a resistência a sais inorgânicos (13) e produção de outras substâncias (10, 31).

Outras características mediadas por plasmídios incluem: sistemas de restrição e modificação (6, 42) e adorção de fagos (43), conferindo resistência a certos bacteriófagos (33).

A localização extracromossômica do DNA plasmidial codificando tantas características genéticas importantes nas bactérias lácticas faz com que sejam herdadas e mantidas de forma muito instável. A evidência cada vez maior da associação de plasmídios com a resistência dos estreptococos lácticos a bacteriófagos fornece um mecanismo genético que explica o rápido aparecimento de variantes sensíveis nos fermentos lácticos (43).

Dessa forma, o estudo da biologia de plasmídios nos estreptococos lácticos, assim como em outros gêneros de bactérias lácticas, tornou-se um pré-requisito para futuros programas de melhoramento genético.

Este trabalho visou, portanto, o conhecimento do perfil plasmidial de alguns estreptococos lácticos pertencentes à Coleção de Fermentos Lácticos do ITAL, assim como seu comportamento quando em contato com bacteriófagos virulentos.

Material e Métodos

Microrganismos - Neste trabalho utilizaram-se as seguintes espécies e respectivas linhagens de estreptococos mesófilos:

- *Streptococcus lactis*: 141, 163, 175, 178, 179, 206, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291,

292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 303, 305, 306, 310, 313, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 323, 324, IL 6, IL 13, IL 408, IL 414, IL 562, IL 598, IL 823, IL 1403, IL 929, IL 920.

- *Streptococcus cremoris*: 16, 161, 167, 168, 169, 262, 307, 308, 309, IL 10, IL 737, IL 746.

- *Streptococcus sp*: 96, 97, 100, 101, 104, 105, 113.

- *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*: 162, IL 561.

As linhagens IL pertencem à Coleção de Culturas do Institut National de la Recherche Agronomique-INRA. Todas as outras linhagens utilizadas pertencem à Coleção de Fermentos Lácticos do ITAL, selecionadas, previamente, quanto às características tecnológicas (45).

As culturas foram estocadas em M17 (47), onde a lactose foi substituída por glicose, juntamente com 15% de glicerol e 2% de inóculo, com congelação imediata e mantidas em congelador a -40°C. Sua ativação era feita em M17 + glicose, com incubação a 30°C durante 18 horas.

Bacteriófagos - Foram utilizados os bacteriófagos 6, 8, 25, 42, 52, 66, 67, 119, 129 e 188, todos pertencentes à Coleção do INRA (5). Os estoques de fagos foram mantidos em 5ml de tampão Tris 0,05M contendo NaCl 0,1M juntamente com glicerol em concentração final de 15% e conservados sob congelação a -40°C.

Método de semeadura para determinação e título de bacteriófagos - A mistura contendo 0,2ml das culturas juntamente com 0,1ml do soro contendo fagos com e sem diluições e 0,05ml de CaCl₂ 1M foi incubada durante 10 minutos a 30°C. Adicionaram-se 3,0ml de M17 semi-sólido (0,45% ágar), agitou-se e verteu-se em placas de Petri contendo M17 + glicose sólido adicionado de 0,01% de CaCl₂ 1M. As placas com as duplas camadas de meio foram incubadas a 30°C e após 4 a 5 horas já se podia fazer a primeira contagem das placas líticas; a contagem final foi feita após 18 horas de incubação (1).

Verificação de lisogenia através de indução com luz ultravioleta (U.V.)

Para indução de profagos, as bactérias lácticas foram irradiadas com luz U.V. (comprimento de onda = 247nm) seguindo-se metodologia proposta por Chopin & Cols. (7). O meio contendo profagos liberados foi filtrado, diluído e testado pelo método de gotas contra todas as culturas lácticas brasileiras e alguns estreptococos lácticos sensíveis testadores, pertencentes à Coleção do INRA. O crescimento e lise das células também foi acompanhado por meio de espectrofotômetro (Bonet, Maury, Jouan, França), obtendo-se valores de densidade óptica das amostras irradiadas e não irradiadas, durante incubação a 30°C.

Titulação de bacteriófagos pela técnica de gotas - Utilizou-se metodologia descrita por Chopin & Cols. (5) podendo-se testar diversos fagos e suas diluições em uma única placa de Petri. O meio M17 diluído a 10% foi utilizado para preparar as diluições dos fagos a serem ensaiados.

Extração de plasmídios - Utilizou-se o micro-método para a determinação rápida de perfis plasmidiais descrito por Portnoy & Col. (40).

Eletroforese - Utilizou-se a técnica de eletroforese horizontal em gel de agarose (34) para determinar o perfil plasmidial das culturas. A eletroforese foi realizada em tampão tris-horato (Tris 54%, ácido bórico 27,5% e EDTA 0,05M, pH 8,0) (30). A concentração de agarose utilizada foi de 0,5%. A revelação dos géis foi feita por uma solução de brometo de etídio a 0,05g/ml e examinados em luz U.V. (300nm). Os géis foram fotografados sob transiluminador U.V., utilizando-se um aparelho Polaroid MP 3, munido de um filtro laranja e de um filtro U.V., além de um filme Polaroid 667.

Resultados

Observando as Figuras 1 e 2, verifica-se que 21 linhagens apresentaram perfis de plasmídios distintos, sendo que seu número, por linhagem, variou de um a onze (linhagem 308). Foram verificadas

analogias no conteúdo de plasmídios de 43 culturas, cujos tipos estão representados na Figura 3. Duas linhagens, 179 e 320, apresentaram o perfil de plasmídios do tipo A; cinco delas, 280, 313, 316, 317 e 319, o perfil do tipo B; vinte e sete (141, 16, 318, 321, 323, 324 e 281 a 301), o perfil do tipo C; três linhagens, 303, 305 e 306, o perfil do tipo D; três linhagens, 175, 178 e 206, o perfil do tipo E e outras três, 167, 168 e 169, o perfil plasmidial do tipo F.

As 21 linhagens de estreptococos lácticos que apresentaram perfis distintos de plasmídios foram ensaiadas contra 10 bacteriófagos pertencentes ao INRA e representativos de seis grupos líticos (5). Observou-se que 47,6% das linhagens testadas foram sensíveis a um ou vários fagos virulentos, pertencentes aos grupos G₁ (4,7%), G₂ (19,8%) e G₃ (23,8%). Não se obtiveram resultados positivos de sensibilidade aos demais fagos ensaiados pertencentes aos grupos G₄ (fago 25), G₅ (fago 119) e G₆ (fago 42). Por outro lado, as demais linhagens ensaiadas (52,4%) mostraram-se resistentes a fagos de todos os seis grupos líticos.

Segundo a Tabela 1, obtiveram-se dois tipos de resultados em relação ao nível de sensibilidade: (1) culturas apresentando igual sensibilidade a um determinado fago quanto à sua cultura de propagação (eficiência de multiplicação = 1), por exemplo, as linhagens 168, 179 e 163, em relação às linhagens de propagação IL 10 (fago 8), IL 598 (fago 52), IL 562 (fago 67) e IL 823 (fago 188) e (2) culturas apresentando sensibilidade menor que as linhagens de propagação dos respectivos fagos, por exemplo, as linhagens 307, 309, 16, 262, 310, 105 e 162 em relação às linhagens de propagação IL 6 (fago 6), IL 1403 (fago 66), IL 562 (fago 67) e IL 823 (fago 188), respectivamente. Para este último grupo, tentou-se identificar o mecanismo de resistência presente naquelas culturas.

Verificou-se que as linhagens 310, 162, 105, 307, 16, 262 e 309 apresentaram um mecanismo de resistência a determinados fagos virulentos ensaiados (Tabela 1). Estabeleceu-se, posteriormente, a existência de um mecanismo de restrição e modificação na linhagem 310 em relação aos fagos 66, 67 e 188 de 4 log e na linhagem 162, em

Figura 1 - Diferentes perfis de plasmídios de linhagens de estreptococos lácticos da coleção do ITAL.

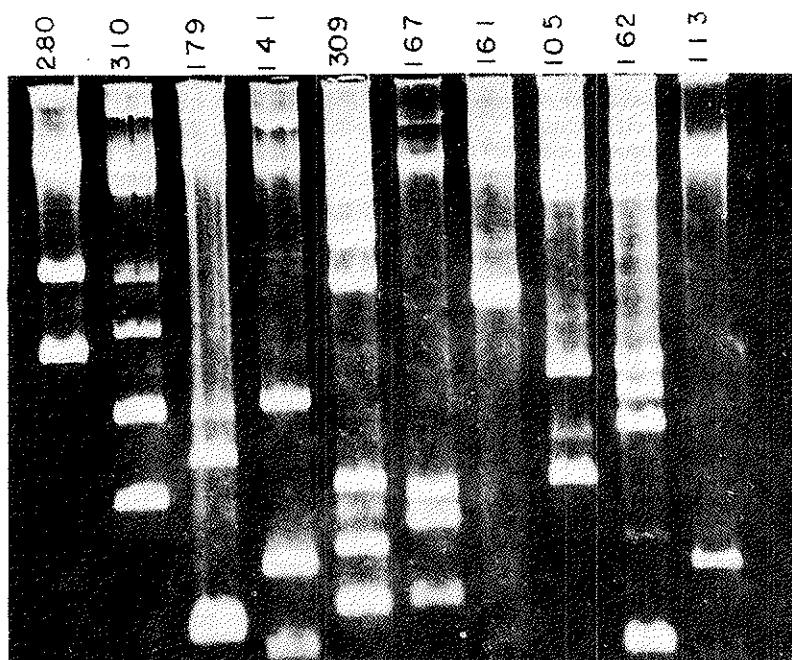


Figura 2 - Diferentes perfis de plasmídios de linhagens de estreptococos lácticos da coleção do ITAL.

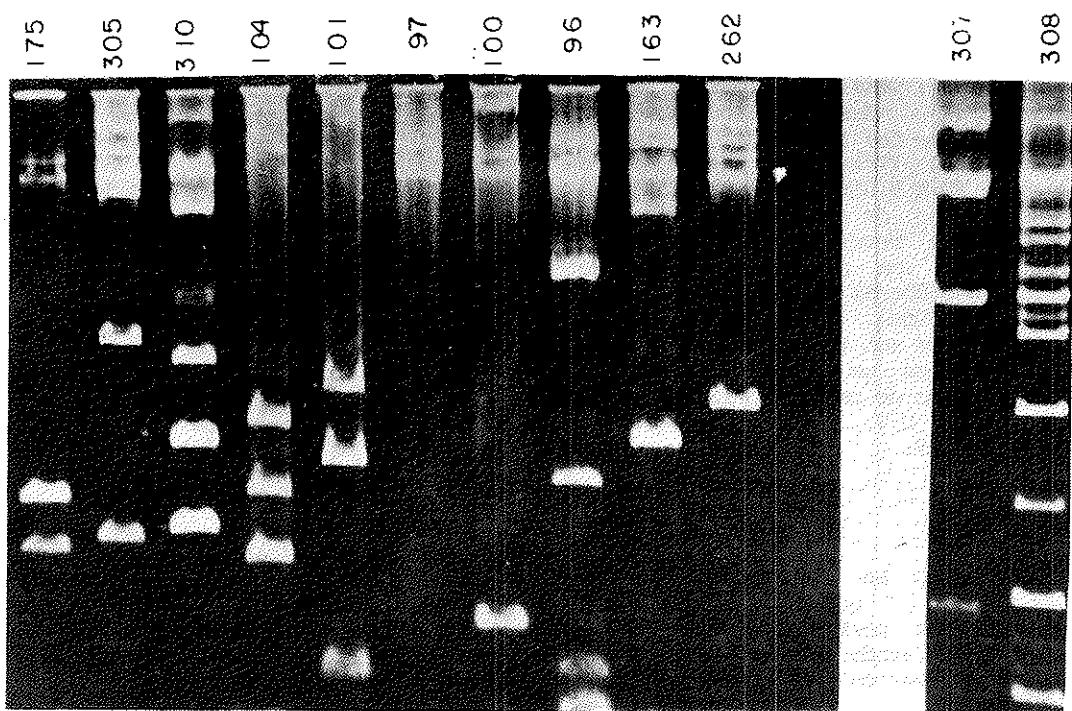


Figura 3 - Perfis de plasmídios idênticos de linhagens de estreptococos lácticos da coleção do ITAL.

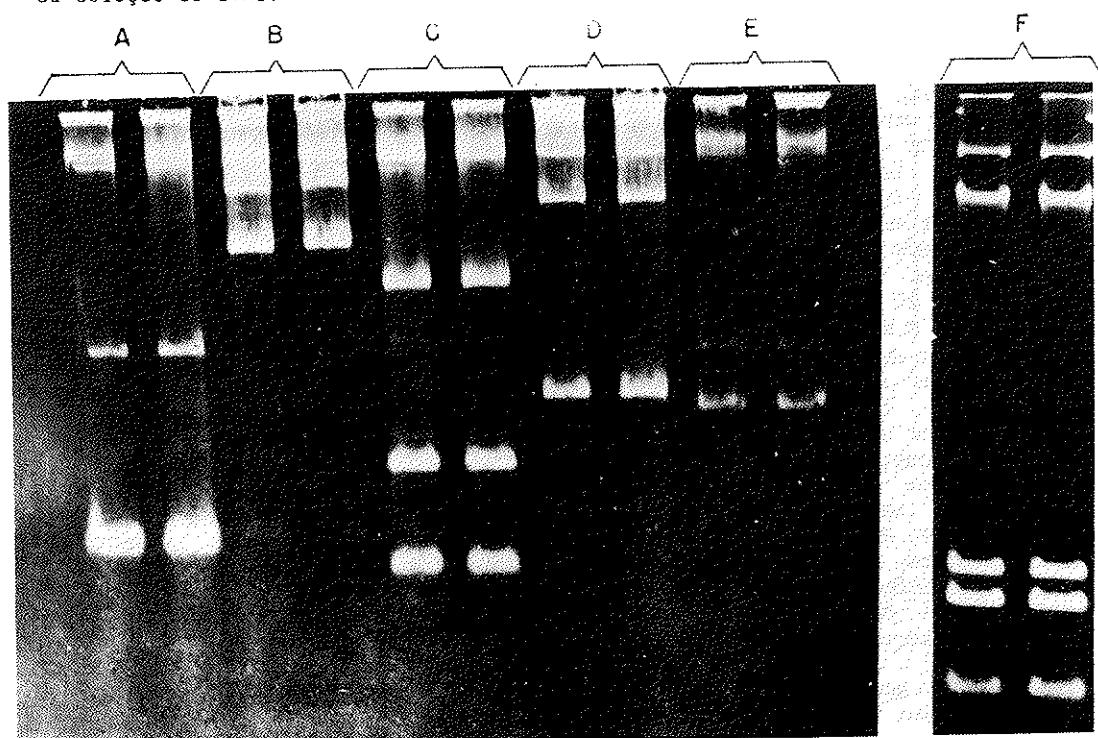
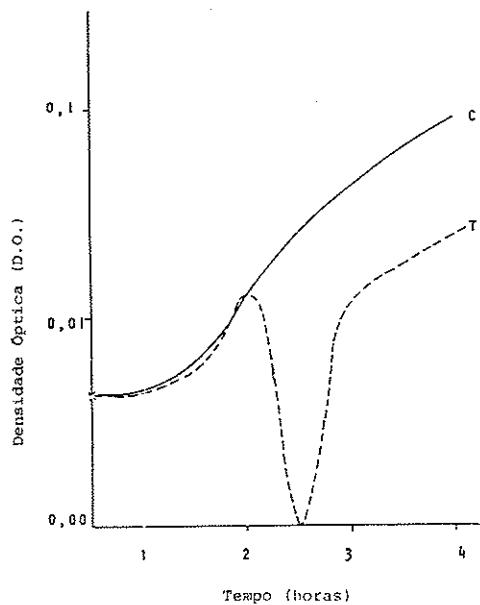


Figura 4 - Evolução da densidade óptica da linhagem 96 com (T) e sem (C) indução com uma dose de 20 J.m^{-2} de redução U.V.



relação ao fago 66 de 2 log. Estes resultados estão sumarizados nas Tabelas 2 e 3.

A Tabela 4 apresenta o resultado da propagação do fago 188 sobre a linhagem 105, observando-se a existência de uma mutação no fago.

Com o intuito de verificar se os 21 estreptococos lácticos em estudo eram lisogênicos, foram submetidos à irradiação por meio de luz U.V., a fim de induzir seus possíveis profagos ao ciclo lítico. Foram utilizadas dosagens de 20 J.m^{-2} para induzir 17 culturas e 60 J.m^{-2} para as restantes, pois nem todas as culturas puderam ser induzidas com a primeira dose. A indução dos fagos temperados foi evidenciada por um clareamento do meio de cultura contendo as linhagens induzidas, em comparação com as testemunhas não submetidas à irradiação U.V. Este clareamento ainda foi comprovado por medidas contínuas em espectrofotômetro da densidade óptica (D.O.) de todas as culturas. Esses resultados são exemplificados pela Figura 4.

Procurou-se em seguida, linhagens sensíveis aos fagos temperados presentes nos lisados obtidos. Para tanto, testou-se a ação destes últimos sobre as 21 culturas em estudo e também sobre seis culturas da coleção do INRA, que já haviam se revelado boas indicadoras em trabalho anterior (41). Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 5.

A Tabela 6 resume o agrupamento final das culturas mediante os resultados de resistência/sensibilidade apresentados em relação a fagos líticos e temperados.

Discussão

Os resultados obtidos após extração dos plasmídios de 58 culturas confirmam o valor do método utilizado para a identificação de plasmídios de linhagens de estreptococos lácticos. Ademais, permitem estabelecer comparações entre os diferentes perfis.

O número de plasmídios encontrados é inferior aos já descritos por Davies & Cols. (12), que encontraram até 14 plasmídios em algumas culturas. Chopin

Tabela 1 - Nível de sensibilidade de estreptococos lácticos e fagos virulentos.

Símbolos:
 * Eficiência de multiplicação = $\frac{\text{nº de fagos multiplicados sobre a cultura estudada}}{\text{nº de fagos multiplicados sobre a cultura de propagação}}$

Cultura Nº	Eficiência de multiplicação dos fagos*					
	8	6	52	66	67	188
168	1					
307		$3,0 \times 10^{-8}$				
309		$1,3 \times 10^{-7}$				
310				$5,7 \times 10^{-4}$	$7,3 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^{-4}$
105						$1,1 \times 10^{-5}$
162					$2,7 \times 10^{-2}$	$3,0 \times 10^{-5}$
179					1	$1,2 \times 10^{-3}$
163						1
16				$1,4 \times 10^{-5}$		
262				$1,5 \times 10^{-5}$		

& Langella (4) discutem que, talvez, nem todas essas 14 bandas encontradas representem, realmente, plasmídios diferentes. Segundo a técnica de extração utilizada, um mesmo plasmídio pode ter seu ácido nucleíco presente sob diferentes formas, ou seja, super-espiraladas, relaxadas e lineares, as quais resultam em bandas distintas após eletroforese. No presente caso, desde que foi utilizada uma técnica de extração alcalina, a qual resulta, raramente, em formas relaxadas, pode-se pensar que todas as 11 bandas observadas, no caso da linhagem 308, correspondem inequivocamente a plasmídios, ou seja, a formas super-espiraladas.

A freqüência de plasmídios análogos foi, aproximadamente, de 1/3, ou seja, a mesma encontrada por Pechmann & Teuber (39) com 51 culturas. Outros autores (12), entretanto, encontraram apenas 4 linhagens com perfis análogos, dentre um grande número de culturas, sendo que as demais apresentavam plasmídios variados e específicos. Entretanto, eles também verificaram que as 4 linhagens idênticas derivavam de uma mesma cultura de origem, evidenciando, portanto, que a utilização de perfis de plasmídios é um excelente método para reconhecer diferentes linhagens. Yu & Cols. (49) concluíram, igualmente, que perfis de plasmídios tão diferentes e específicos para cada organismo poderiam ser utilizados na identificação de diversas culturas lácticas.

Este fato também foi comprovado no

Tabela 2 - Evidência de um mecanismo de restrição/modificação presente na linhagem 310, ativa contra o fago 66.

Símbolos:

$$\text{a/ Eficiência de multiplicação} = \frac{\text{Nº de multiplicados sobre a cultura estudada}}{\text{Nº de fagos multiplicados sobre a cultura de propagação}}$$

b/ = O fago 66 foi propagado sobre a linhagem IL 1403;
 c/ = O fago 66 foi propagado sucessivamente sobre as linhagens IL 1403 e 310; d/ = O fago 66 foi propagado sucessivamente sobre as linhagens IL 1403, 310 e IL 1403.

Linhagem hospedeira	Eficiência de Multiplicação do ^{a/}		
	Fago 66 (IL 1403) ^{b/}	Fago 66 (IL 1403-310) ^{c/}	Fago 66 (IL 1403-310) IL 1403 ^{d/}
IL 1403	1	1	1
310	$5,7 \times 10^{-3}$	1	$3,2 \times 10^{-4}$

Tabela 3 - Evidência de um mecanismo de restrição/modificação presente na linhagem 162, ativa contra o fago 66.

Linhagem hospedeira	Eficiência de Multiplicação do		
	Fago 66 (IL 1403)	Fago 66 (IL 1403-162)	Fago 66 (IL 1403-162) IL 1403
IL 1403	1	1	1
162	$2,9 \times 10^{-2}$	1	$2,7 \times 10^{-2}$

Tabela 4 - Evidência de um mecanismo de resistência apresentado pela linhagem 105, devido a mutações sofridas pelo fago 188.

Linhagem hospedeira	Eficiência de Multiplicação do		
	Fago 188 (IL 823)	Fago 188 (IL 823-105)	Fago 188 (IL 823-105) IL 823
IL 823	1	$1,6 \times 10^{-5}$	1
105	$4,5 \times 10^{-6}$	1	1

presente trabalho, já que as linhagens possuindo o perfil tipo E (Figura 3), são oriundas de uma mesma cultura, assim como aquelas de números 282 a 300, perfil tipo C, também possuem uma única cultura de origem.

Dessa forma, o conhecimento do perfil de plasmídios das culturas

lácticas pertencentes à Coleção do ITAL é de extrema importância, pois muitas delas foram isoladas de soros provenientes de processamentos de diferentes indústrias e, consequentemente, de fermentos comerciais que podem ser idênticos.

De acordo com Chopin & Langella (4), a

Tabela 5 - Espectro lítico de fagos liberados após indução com luz ultravioleta.
Símbolos: + = 10^1 a 10^2 UFP/ml (Unidade Formadora de Placa); ++ = 10^2 a 10^4 UFP/ml; +++ = 10^4 a 10^6 UFP/ml.

Linhagem indicadora	Linhagem induzida		
	179	175	310
IL 929	+++		
IL 920	+++	++	
IL 408	+++	*	
96	*		
163	+++		
310	++		
97	+		

analogia de perfis de plasmídios não é surpreendente, podendo-se supor que as pequenas diferenças observadas nos perfis de algumas linhagens estudadas resultem de variações nas pressões de seleção exercidas sobre elas, durante sua passagem nas diversas coleções.

Para complementar a informação sobre as linhagens possuindo perfis análogos, há necessidade de se testar a sua sensibilidade a bacteriófagos virulentos.

Um dos métodos utilizados no controle de bacteriófagos na indústria é a utilização de rotação de culturas que não sejam fago-relacionadas (23). Para tanto, há necessidade de se conhecer a sensibilidade das bactérias aos fagos, ou seja, realizar uma tipagem. A aplicação deste método é grandemente facilitada se forem estabelecidos grupos de linhagem que não apresentem o mesmo padrão de sensibilidade aos fagos utilizados para a tipagem, assim como a escolha de linhagens e fagos de cada grupo que permitam uma rápida classificação, tanto de um novo fago, como de uma nova linhagem isolada (5). Nesse sentido, vários tipos de agrupamentos de fagos possuindo reações líticas similares foram criados (18) e complementados com estudos sorológicos dos fagos (51).

Tabela 6 - Agrupamento dos estreptococos lácticos pertencentes à coleção do ITAL, de acordo com a classificação proposta por Chopin & Cols. (5) e Reyrolle & Cols. (41).

Grupo de classificação	Nº Cultura
1	168
2	307
	309
	16
	262
3	310
	105
	162
	179
	175
	96
	163
	97

Chopin & Cols. (5) mostraram um sistema de agrupamentos de fagos segundo sua ação lítica, assim como um outro de estreptococos lácticos com base na sua sensibilidade aos bacteriófagos virulentos que foi aplicado neste estudo. A percentagem de linhagens resistentes a fagos dos seis grupos líticos foi maior que aquela de 10% observada por Nichols & Hoyle (35) e a de 31% por Henning & Cols. (18). Estes últimos consideraram que a ausência de fagos ativos contra 31% das linhagens que testaram deveu-se a terem vindo de regiões diferentes daquelas onde os fagos haviam sido isolados. Isto pode adequar-se ao caso presente, já que as culturas eram provenientes do Brasil e todos os fagos isolados em industriais de laticínios da França. Entretanto, alguns autores (5) consideraram que as linhagens resistentes obtidas poderiam ser sensíveis a um pequeno número de fagos raros, ainda não isolados, lisogênicas para a maioria deles ou, ainda, mutantes resistentes a fagos.

Os resultados obtidos com as culturas

lácticas brasileiras confirmam outros anteriormente descritos (5) quanto ao grupo lítico G₃, tendo-se verificado, também, que a maioria das linhagens foi sensível a fagos deste grupo, os quais agiram, na maioria dos casos, sobre duas ou mais linhagens de estreptococos lácticos.

As 10 culturas lácticas sensíveis apresentaram, porém, níveis de sensibilidade diferentes. Assim, segundo a cultura indicadora utilizada, a linhagem a ser classificada ou a cultura normal de propagação do fago, o número de fagos obtidos não foi o mesmo.

De posse dos resultados de nível de sensibilidade aos fagos, procurou-se verificar se culturas que apresentavam perfis de plasmídios análogos possuíam, igualmente, a mesma sensibilidade aos fagos líticos. Os dados obtidos foram positivos, determinando-se, dessa forma, que a eficiência de multiplicação do fago 8 sobre as linhagens 166, 167 e 169 era idêntica àquela sobre a linhagem 168, assim como a da linhagem 320 foi idêntica à obtida sobre a linhagem 179. Esses resultados confirmaram aqueles obtidos por outros autores (4) quanto à semelhança de perfis de plasmídios e espectro de sensibilidade idêntico. Confirmou-se, também, que o sistema proposto por Chopin & Col. (5) pode ser aplicado para estreptococos lácticos provenientes de outras regiões, classificando-se as linhagens sensíveis da seguinte forma: Grupo G₁: linhagem 168; Grupo G₂: linhagens 307, 309, 16 e 262 e Grupo G₃:

linhagens 310, 105, 162, 179 e 163.

Após propagação do fago 66 sobre a linhagem IL 1403, obteve-se um título de somente 1 fago em 10⁴ sobre a linhagem 310. Desde que este fago foi propagado sobre a 310, ele foi modificado, podendo, então, multiplicar-se bem sobre esta linhagem. Quando propagado novamente sobre IL 1403, ele perdeu a modificação adquirida com a linhagem 310, a qual passou a restringi-lo como anteriormente.

Estabeleceu-se, ainda, que a resistência da linhagem 310 aos fagos 188 e 67 era devida, igualmente, a este sistema de restrição/modificação (resultados não apresentados).

Da mesma forma, observou-se que as

placas de lise formadas pelo fago 188 sobre as culturas 162 e 105 correspondiam a fagos mutantes. Assim, o fago 188, modificado quando de sua propagação na linhagem 105, conserva esta modificação, mesmo após sua multiplicação em IL 823. Não se trata, portanto, de uma modificação controlada pelo hospedeiro, mas de uma mutação (29).

O fago 6 causa, provavelmente, uma lisogenização nas linhagens 307, 309, 16 e 262, as quais também apresentaram resistência a ele; o mesmo pode-se dizer para o fago 67 em relação à linhagem 162 (Tabela 1). Isto foi evidenciado pela impossibilidade de multiplicação deste fago naquelas culturas, além do aspecto morfológico das placas de lise apresentadas, ou seja, muito pequenas e turvas, de difícil visualização e contagem. Este fenômeno está sendo, no momento, pesquisado.

Os estreptococos lácticos podem ser uma possível fonte de fagos temperados, responsáveis por falhas na produção de ácido láctico durante o processamento de queijos (25). A incidência praticamente universal de lisogenia nessas bactérias indica que podem servir como um reservatório de fagos potencialmente capazes de atacar as cepas que compõem os fermentos lácticos mistos (19). Além disso, podem ocorrer trocas genéticas mediadas por fagos nas bactérias lácticas, sendo este um outro fator que pode contribuir para aumentar a variabilidade das linhagens correspondentes daqueles fermentos (2). Por esse motivo, o conhecimento de linhagens lisogênicas e indicadoras, que possibilitem a multiplicação dos fagos liberados é muito importante na escolha de uma cultura componente de um fermento láctico.

Todas as culturas submetidas ao estudo de lisogenia, neste trabalho, sofreram lise entre 90 minutos e 4 horas após o choque com U.V. Os lisados obtidos foram testados contra as 21 culturas em estudo e contra seis pertencentes aos grupos G₁, G₂ e G₃. Dessa forma, obteve-se o título das unidades formadoras de placas de lise (UFP) de cada lisado, para cada linhagem sensível.

As culturas indicadoras do INRA, pertencentes aos grupos G₁ e G₂, não mostraram sensibilidade a nenhum dos lisados obtidos. Pela Tabela 5, pode-se verificar que apenas três das linhagens

indicadoras, IL 929, IL 930 e IL 408, todas pertencentes ao grupo G3, assim como 19% das culturas em estudo, demonstraram sensibilidade a um ou mais fagos liberados por, somente, 3 das culturas induzidas. Por outro lado, obtiveram-se 100% da indução, medida pelo clareamento do meio e pela curva de crescimento em biofotômetro, indicando que todas as 21 culturas eram lisogênicas. Esses resultados foram superiores aos encontrados por Kozak & Cols. (24) com *S. cremoris* e *S. lactis*. Após indução das culturas com U.V., verificaram liberação de profagos em apenas 8% das 87 culturas testadas. Também Huggins & Sandine (19) e Davies & Gasson (10), utilizando-se de método similar, relataram que 20% de um total de 69 linhagens e 60% de 63 linhagens, respectivamente, eram lisogênicas.

Davies & Gasson (11) concluem que a maioria, senão, todos os estreptococos lácticos são lisogênicos e que as variações nas freqüências de aparecimento encontradas refletem, provavelmente, os diferentes critérios usados para determinação da lisogenia, a subjetividade na interpretação das quedas de densidade óptica encontradas nas curvas de crescimento após indução e a dificuldade de se encontrar linhagens indicadoras.

A rara freqüência de linhagens indicadoras já havia sido discutida por diversos autores (17, 28) apesar de outros (41) terem concluído que 25% das linhagens testadas serviram como indicadoras. O presente trabalho vem reafirmar a dificuldade de se dispor de linhagens indicadoras, por não ter sido possível detectar todos os fagos liberados por meio das linhagens usadas. Por outro lado, a existência de linhagens lisogênicas pertencentes somente ao grupo G₃ pode refletir, apenas, o pequeno tamanho da amostra, além da não disponibilidade de uma linhagem indicadora específica para os grupos G₄, G₅ e G₆.

Confirmou-se, também, uma especificidade na reação lítica entre o fago temperado e a bactéria, pois todos os profagos originados de culturas do grupo G₃ foram capazes de lisar somente linhagens deste mesmo grupo, de acordo com a classificação anteriormente feita em relação aos fagos virulentos. Dentre elas, a

maioria é de *S. lactis* (310, 163, 175 e 179), algumas não têm espécie identificada, sendo, portanto, *Streptococcus* sp. (96, 97 e 105) e uma é *S. lactis* subsp. *diacetylactis* (162).

A liberação de fagos foi, para a maioria das linhagens sensíveis, muito intensa, situando-se entre 10⁴ a 10⁶ partículas por mililitro. Esses resultados foram semelhantes aos obtidos por Reyrolle & Cols. (41) por meio de indução com mitomicina C.

As linhagens que já haviam sido classificadas com base na sua sensibilidade aos fagos virulentos são lisogênicas, sendo os fagos temperados liberados após indução com U.V. pertencentes ao mesmo grupo de sensibilidade. Esta correlação entre fagos temperados e virulentos também já foi comprovada a nível morfológico (48). Ademais, confirma a hipótese (26) de que não se deve misturar, nos fermentos lácticos, linhagens sensíveis aos fagos das demais culturas componentes do mesmo.

Dessa forma, de acordo com os resultados obtidos, na elaboração de fermentos múltiplos ou mistos, a partir das culturas aqui estudadas, não se poderia misturar as linhagens 96, 163, 310 ou 97 com a 175 e a linhagem 163 com a 179. Isto significa que as linhagens lisogênicas podem constituir-se em reservatório de fagos virulentos, capazes de lisar as linhagens sensíveis, ou sofrer mutação contra seu próprio hospedeiro, podendo ocasionar problemas graves durante os processamentos de queijo (19, 25, 41).

Finalizando, a indução das linhagens lisogênicas e o espectro lítico de seus profagos permitiram a classificação das culturas 96, 97 e 175 no grupo G₃ (Tabela 6), coisa que não foi possível fazer por meio do teste com fagos virulentos, assim como confirmou-se a classificação anteriormente feita por aquele método, para as culturas 310, 163 e 179. Isso corrobora a validade e aplicação da classificação proposta por Chopin & Cols. (5) para culturas lácticas provenientes de diferentes origens.

Summary

Plasmid profiles and bacteriophage resistance of mesophilic lactic streptococci

Among the lactic cultures belonging to the Food Technology Institute (ITAL-Brazil) 21 out of 58 showed different profiles of plasmids, while in the remaining 6 types of analogue profiles were observed. All the cultures showing different profiles were found to be lysogenic, releasing prophages after exposure to ultraviolet light. The lytic spectrum showed that based on virulent phages and on prophages released, one can classify the strains into three groups: G₁, G₂ and G₃. It was also observed that some cultures showed restriction and modification system ranging from 2 to 4 log, in relation to phages 66, 67 and 188. It was possible to define which strain could not mixed in a multiple starter system.

Agradecimentos

As autoras agradecem a Alain Chopin pelas sugestões valiosas e a Micher Gautier e Annette Rouault pela ajuda técnica e pela amizade.

A.L.S. Lerayer agradece ao Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) pelo aceite de sua viagem e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) pela ajuda financeira.

Referências Bibliográficas

1. Adams, N.H. - *Bacteriophages*. New York, Interscience Publishers, Inc., 1950.
2. Allen, L.K.; Sandine, W.E. & Elliker, P.R. - Transduction on *Streptococcus lactis*. *J. Dairy Res.*, 30:351-357, 1963.
3. Anderson, D.G. & McKay, L.L. - Plasmids, loss of lactose metabolism, and appearance of partial and full lactose-fermenting revertants in *Streptococcus thermophilus* B₁. *J. Bacteriol.*, 129:367-377, 1977.
4. Chopin, A. & Langella, P. - Analogies de profils plasmidiques chez les streptocoques du groupe N. *Le Lait*, 62:705-719, 1982.
5. Chopin, M.C.; Chopin, A. & Roux, C. - Definition of bacteriophage groups according to their lytic action and mesophilic lactic streptococci. *Appl. Environm. Microbiol.*, 32:741-746, 1976.
6. Chopin, A.; Chopin, M.C.; Moillo-Batt, A. & Langella, P. - Two plasmid-determined restriction and modification systems in *Streptococcus lactis*. *Plasmid*, 11:260-263, 1984.
7. Chopin, M.C.; Moillo-Batt, A. & Rouault, A. - Plasmid-mediated U.V.-protection in *Streptococcus lactis*. *FEMS Microbiol. Letters*, 26:243-245, 1985.
8. Crow, V.L.; Davey, G.P.; Pearce, L.E. & Thomas, T.O. - Plasmid linkage of the D-tagatose 6-phosphate pathway in *Streptococcus lactis*: effect on lactose and galactose metabolism. *J. Bacteriol.*, 153:76-83, 1983.
9. Davey, G.P. - Plasmid associated with diplococcin production in *Streptococcus cremoris*. *Appl. Environm. Microbiol.*, 48:895-896, 1984.
10. Davies, F.L. & Gasson, M.J. - Reviews of the progress of dairy science: genetics of lactic acid bacteria. *J. Dairy Res.*, 48:363-376, 1981.
11. Davies, F.L. & Gasson, M.J. - Bacteriophages of dairy lactic-acid bacteria. In: Davies, F.L. & Law, B.A., Eds. *Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*. London, Elsevier Applied Science Publishers, 1984, p.127-151.
12. Davies, F.L.; Underwood, R.M. & Gasson, M.J. - The value of plasmid profiles for strain identification in lactic-streptococci and the relationship between *Streptococcus lactis* 712, ML₃ and C₂. *J. Appl. Bacteriol.*, 51:325-337, 1981.
13. Efstratiou, J.O. & McKay, L.L. - Plasmids in *Streptococcus lactis*: evidence that lactose metabolism and proteinase activity are plasmid linked. *Appl. Environm. Microbiol.*, 32:28-44, 1976.
14. Gasson, M.J. - Transfer of sucrose fermenting ability, nisin resistance and nisin production into *Streptococcus lactis* 712. *FEMS Microbiol. Letters*, 21:7-10, 1984.
15. Geis, A.; Shing, J. & Teuber, M. - Potential of lactic streptococci to produce bacteriocin. *Appl. and Environm. Microbiol.*, 45:205-211, 1983.
16. Gulstrom, T.J.; Pearce, L.E.; Sandine, W.E. & Elliker, P.R. - Evaluation of commercial phage inhibitory media. *J. Dairy Sci.*, 62:208-221, 1979.
17. Heap, H.A.; Limsowtin, G.K. & Lawrence, R.C. - Contribution of *Streptococcus*

- lactis* strains in raw milk to phage infection in commercial cheese factories. N.Z.J. Dairy Sci. and Technol., 13:16-22, 1978.
18. Henning, D.R.W.; Black, C.H.; Sandine, W.E. & Elliker, P.R. - Host-range studies of lactic streptococcal bacteriophages. J. Dairy Sci., 51:16-21, 1968.
19. Huggins, A.R. & Sandine, W.E. - Incidence and properties of temperate bacteriophages induced from lactic streptococci. Appl. Environm. Microbiol., 33:184-191, 1977.
20. Hull, R.R. - Factory - derived starter cultures for the control of bacteriophage in cheese manufacture. Aus. J. Dairy Technol., Dec. 149-154, 1983.
21. Kempler, G.M. & McKay, L.L. - Genetic evidence for plasmid-linked lactose metabolism in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. Appl. Environm. Microbiol., 37:1041-1043, 1979.
22. Kempler, G.M. & McKay, L.L. - Biochemistry and genetics of citrate utilization in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. J. Dairy Sci., 64:1527-1539, 1981.
23. Keogh, B.P. - A re-assesment of the starter rotation system. Aus. J. Dairy Technol., 27:86-87, 1972.
24. Kozak, W.; Rajchert-Trzpil, M.; Zadzel, J. & Dobrzanski, W.P. - Lysogeny in lactic streptococci producing and not producing nisin. Appl. Microbiol., 25:305-308, 1973.
25. Lawrence, R.C.; Thomas, T.D. & Terzaghi, B.E. - Reviews of the progress of dairy science: cheese starters. J. Dairy Res., 43:141-193, 1976.
26. Lawrence, R.C.; Heap, H.A.; Limsowtin, G. & Jarvis, A.W. - Cheddar cheese starters: Current knowledge and practices of phage characteristics and strain selection. J. Dairy Sci., 61:1181-1191, 1978.
27. LeBlanc, D.J.; Crow, V.L.; Lee, L.N. & Garon, C.P. - Influence of the lactose plasmid on the metabolism of galactose by *Streptococcus lactis*. J. Bacteriol., 137:878-884, 1979.
28. Lowrie, R.J. & Pearce, L.E. - Use of indicator strains for the assay of bacteriophage of lactic streptococci. N. Zea. J. Dairy Sci. Technol., 6:192, 1971.
29. Luria, S.E. - Host-induced modification of viruses. Cold Spring Harbor Symposia on Quant. Biol., 18:237-244, 1953.
30. Maniatis, T.; Tritsch, E.F. & Sambrook, J. - Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York, Cold Spring Harbor, 545p., 1982.
31. McKay, L.L. - Functional properties of plasmids in lactic streptococci. Antoine van Leeuwenhoek, 49:259-274, 1983.
32. McKay, L.L. & Baldwin, K.A. - Plasmid distribution and evidence for a proteinase plasmid in *Streptococcus lactis* C₂. Appl. Microbiol., 29:546-548, 1975.
33. McKay, L.L. & Baldwin, K.A. - Conjugative 40 - megadalton plasmid in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* DRC3 is associated with resistance to nisin and bacteriophage. Appl. Environm. Microbiol., 47:68-74, 1984.
34. Meyers, J.A.; Sanchez, O.; Elwell, P.P. & Falkow, S. - Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol., 127:1529-1537, 1976.
35. Nichols, A.A. & Hoyle, M. - Bacteriophages in typing lactic streptococci. J. Dairy Res., 16:167-208, 1949.
36. Otto, R.; Vos Willem, M. & Gavrieli, J. - Plasmid DNA in *Streptococcus cremoris* Wg 2: Influence of pH on selection in chemostats of a variant lacking a protease plasmid. Appl. Environm. Microbiol., 43:1272-1277, 1982.
37. Park, Y.H. & McKay, L.L. - Distinct galactose phosphoenolpyruvate - dependent phosphotransferase system in *Streptococcus lactis*. J. Bacteriol., 149:420-425, 1982.
38. Pearce, L.E.; Skipper, N.A. & Jarvis, B.J. - Proteinase activity in slow lactic acid - producing variants of *Streptococcus lactis*. Appl. Microbiol., 27:933-937, 1974.
39. Pechmann, H. & Teuber, M. - Plasmid pattern of group N (lactic) streptococci. Zentralblatt für Bakteriologie, 1C 1:133-136, 1980.
40. Portnoy, D.A.; Moseley, S.L. & Falkow, S. - Characterization of plasmids and plasmid associated determinants of

- Yersinia enterocolitica* pathogenesis. Infect. Imm., 31:775-782, 1981.
41. Reyrolle, J.; Chopin, M.C.; Letellier, F. & Novel, G. - Lysogenic strains of lactic acid streptococci and lytic spectra of their temperat bacteriophages. Appl. Environm. Microbiol., 43:349-356, 1982.
42. Sanders, M.E. & Klaenhammer, T.R. - Evidence for plasmid linkage of restriction and modification in *Streptococcus cremoris* KH. Appl. Environm. Microbiol., 42:944-950, 1981.
43. Sanders, M.E. & Klaenhammer, T.R. - Characterization of phage-sensitive mutants from a phage-insensitive strain of *Streptococcus lactis*: evidence for a plasmid determinant that prevents phage adsorption. Appl. Environm. Microbiol., 46:1125-1133, 1983.
44. Sandine, W.E. & Ayres, J.W. - Method and starter compositions for the growth of acid producing bacteria and bacterial compositions produced thereby. US PAT. 4,282-255, 1981.
45. Santos, A.L.L. dos & Azevedo, J.L. - Seleção tecnológica de estreptococos lácticos. Col. ITAL (Campinas), 15:127-139, 1985.
46. Scherwitz, K.M.; Baldwin, K.A. & McKay, L.L. - Plasmid linkage of a bacteriocin-like substance in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* strain VM4: transferability to *Streptococcus lactis*. Appl. Environm. Microbiol., 45:1506-1512, 1983.
47. Terzaghi, E.A. & Terzaghi, B.E. - Effect of lactose concentration on the efficiency of plating of bacteriophages on *Streptococcus cremoris*. Appl. Environm. Microbiol., 35:471-478, 1978.
48. Teuber, M. & Lembke, J. In: Microbiology-1982. Schlessinger D., Ed. Washington, D.C. American Society for Microbiology. Apud: Davies, F.L. & Law, B.A. - Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk. London, New York, Elsevier Applied Science Publishers, 1984. p.99-126.
49. Yu, R.S.T.; Hung, T.V. & Azad, A.A. Plasmid complement and sequence homology of some technological strains of lactic streptococci. Aus. J. Dairy Technol., 38:104-109, 1983.
50. Wigley, R.C. - Advances in technology of bulk starter production and cheesemaking. J. Soc. Dairy Technol., 33:24-30, 1980.
51. Wilkowske, H.H.; Nelson, F.E. & Parmelee, C.E. - Serological classification of bacteriophages active against lactic streptococci. Appl. Microbiol., 2:243-249, 1954.
52. Wright, S.L. & Richardson, G.H. - Optimization of whey-based or nonfat dry milk-based media for production of pH controlled bulk lactic cultures. J. Dairy Sci., 65:1882-1894, 1982.

Recebido para publicação em 17/01/89

MÉTODO RÁPIDO Y ECONÓMICO PARA DETECTAR AFLATOXINAS Y ZEARALENONA EN ALIMENTOS PARA ANIMALES

Cecilia L. Fulgueira
& Blanca J.C. de Bracalenti

Depto de Microbiología
Facultad de Ciencias Bioquímicas y
Farmacéuticas
Universidad Nacional de Rosario
Suipacha 531
Rosario (2000)
Santa Fe
República Argentina

Resumen

Se ha desarrollado un método cuantitativo (A-Z) para determinar Aflatoxina B₁ y Zearalenona en mezclas de alimentos destinados al consumo animal. También puede ser usado para cuantificar Aflatoxinas B₂, G₁ y G₂, y puede ser aplicado a maíz. El método, rápido, económico y de fácil aplicación, comprende extracción con una mezcla acuosa de metanol, bipartición con cloroformo y cuantificación visual por cromatografía en capa delgada (TLC). No requiere complicadas etapas de purificación y permite eliminar interferencias empleando una TLC bidimensional, siendo apropiado para laboratorios pequeños, sin equipamiento sofisticado. Detecta 1-2 μ g/Kg de Aflatoxina B₁ y 25 μ g/Kg de Zearalenona. La validez de la técnica ha sido demostrada por comparación con el método CB de la A.O.A.C. de determinación de Aflatoxinas en maíz y con el método oficial de la A.O.A.C. para Zearalenona en maíz.

Introducción

La presencia de hongos y sus metabolitos tóxicos (micotoxinas) constituye una importante amenaza para la salud animal y su productividad (12). Los cereales, granos y forrajes a menudo son invadidos simultáneamente por distintas especies fúngicas, detectándose por lo tanto en ellos la presencia de varias micotoxinas (10).

La velocidad y la economía son dos factores increíblemente importantes en el análisis de micotoxinas en alimentos para animales (11). El tiempo requerido para las etapas de extracción y limpieza principalmente, hace que la mayoría de los métodos analíticos resulten inconvenientes para un "screening" de rutina de un gran número de muestras (13).

Este artículo describe procedimiento cuantitativo (Método A-Z) para

determinar Aflatoxina B₁ y Zearalenona, en alimentos compuestos destinados al consumo animal.

Este método también puede ser usado para determinar Aflatoxinas B₂, G₁ y G₂ y para ser aplicado satisfactoriamente a maíz. Para evaluar esta técnica se compararon determinaciones de Aflatoxina B₁ y Zearalenona en muestras de alimentos para cerdos contaminados naturalmente con cepas de hongos toxicogénicos, con resultados obtenidos en las mismas muestras por métodos de referencia. Se eligieron como técnicas de referencia el método CB de la Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.) de determinación de Aflatoxinas en maíz (principal componente del alimento balanceado) (2) y el método oficial de la A.O.A.C. de análisis de Zearalenona en maíz (3).

Material y Métodos

a) Aparatos

1) **Equipo de cromatografía en capa delgada (TLC)** - Placas de vidrio de 10x10cm cubiertas con 0.25mm de sílica gel 60G (Merck, art. 7731) o folios de aluminio cubiertos con sílica gel 60G (Merck, art. 5553).

2) **Lámpara ultravioleta** - Mineralight Lamp-Model UV SL 58. Multiband UV 254/366nm.

3) **Moedor de granos.**

4) **Licuadora de uso doméstico.**

5) **Evaporador rotatorio de vacío.**

b) Reactivos

1) **Solventes** - Metanol, cloroformo, acetona (grado analítico), cloroformo (purísimo para la partición).

2) **Agente de secado** - Sulfato de sodio anhidro.

3) Soluciones standards de micotoxinas

- Aflatoxina B₁ y Zearalenona. Makor Chemicals Ltd. Jerusalem, Israel. La concentración de las soluciones standards comerciales fue determinada siguiendo el método espectofotométrico de la A.O.A.C. (1).

4) **Solución de cloruro de aluminio 20% p/v en etanol.**

5) **Solución de ácido sulfúrico 50% p/v.**

c) Método A-Z

Extracción y limpieza - 25g de alimento finamente molido fueron colocados en una licuadora de uso doméstico. Se le agregó 125ml de metanol-agua (65-35) y se agitó 3 minutos en la licuadora a velocidad media.

Se filtró a través de papel de filtro y 25ml del filtrado fueron recogidos y trasvasados a una ampolla de decantación de 250ml. Se le agregó 65ml de agua destilada (para aumentar la polaridad de la mezcla y evitar emulsiones) y se extrajo 3 veces con

fracciones de 15ml de cloroformo cada vez. Las fracciones clorofórmicas fueron combinadas, secadas con sulfato de sodio anhidro, filtradas y evaporadas a casi sequedad en evaporador rotatorio de vacío. El residuo fue transferido cuantitativamente a un frasco de vidrio pequeño y se continuó la evaporación hasta sequedad. El residuo fue redissuelto en 100l de cloroformo.

Cromatografía en capa delgada - Las placas cromatográficas o los cromatofolios fueron sembrados de la siguiente manera (Figura 1) - en posición 8 se sembró una aliquota del extracto y se desarrolló la placa en dirección A con éter anhidro, sometiendo este único punto a una cromatografía bidimensional para separar las sustancias que pudieran interferir en la determinación de aflatoxinas (6); - Se sembró luego: - en 2 una aliquota del extracto, en 1 una aliquota del extracto y se le sobresembró standard de Aflatoxina B₁ y de Zearalenona como patrón interno, en 3-7 distintas cantidades de los standards de Aflatoxina B₁ y Zearalenona.

Se desarrolló la placa en dirección B con cloroformo-acetona (90+10).

Se investigó Aflatoxina B₁ en el extracto sembrado en 8 (fluorescencia a 366nm) y Zearalenona en el extracto sembrado en 2 (fluorescencia a 254nm).

Se calculó la concentración de cada micotoxina empleando la fórmula:

$$\text{micotoxina } (\mu\text{g/Kg}) = (M.V) / (X.W)$$

donde M: cantidad (ng) de standard de micotoxina de fluorescencia igual al desconocido; V: volumen en μl del extracto final de la muestra para la TLC; X: volumen en μl del extracto de la muestra que presenta una fluorescencia igual a M; W: peso en gramos del producto representado por el extracto final para la TLC.

Cuando fue necesario se diluyó el extracto.

Se confirmó Aflatoxina por spray con ácido sulfúrico 50% p/v (9) y Zearalenona rociando la mancha sospechosa de tal con solución de cloruro de aluminio 20% p/v en etanol, calentando la placa 10 minutos a 105-110 °C y observándola bajo luz UV larga (366nm) (5, 7, 9, 10).

Contaminación natural de las muestras - Muestras de alimentos para cerdos de

FIG. N° 1

PLACA PARA CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA BIDIMENSIONAL

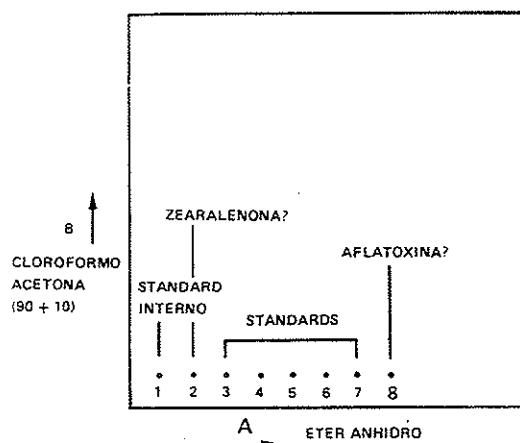


Tabla 1 - Determinaciones de Zearalenona en alimentos compuestos por los dos métodos en estudio ($\mu\text{g/kg}$). Recuperación de Zearalenona agregada (100 $\mu\text{g/kg}$): 70.85% (método A.O.A.C.) y 90.46% (método A-Z).

X A-Z/A.O.A.C.: 1.28

Símbolos: (*) = Límite de detección 25 $\mu\text{g/kg}$.

Muestra nº	Método A.O.A.C.		Método A-Z (*)		A-Z/A.O.A.C.
	OBS. 1	OBS. 2	OBS. 1	OBS. 2	
1	607.5	614.9	750	777	1.25
2	367	370	469	475	1.28
3	710	701	912.5	912.5	1.29
4	748.6	750	938	945	1.26
5	500	507	637.6	620	1.25
6	607	613.4	780	789	1.29
7	519	500	621.8	615	1.21
8	752	759	875	875	1.16
9	560.5	565.7	695	691.8	1.24
10	585	585	720.5	730.7	1.24

diferentes orígenes fueron contaminadas naturalmente con cepas de hongos toxicogénicos. Diez muestras de alimentos fueron contaminadas con *Fusarium graminearum* NRRL 6207 (productor de Zearalenona) y 7 con *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 (productor de Aflatoxinas). Todas las muestras fueron procesadas por los métodos a comparar.

Resultados

Las concentraciones de Zearalenona estimadas por el método A-Z y por el método oficial de la A.O.A.C. se presentan en la Tabla n° 1 y los resultados obtenidos del análisis de Aflatoxina B₁ en la Tabla n° 2.

Las determinaciones fueron efectuadas por duplicado y las dos estimaciones se presentan en las Tablas. Los resultados de la TLC fueron cuantificados por comparación visual.

Como se observa en las dos Tablas, los valores obtenidos con el método A-Z fueron significativamente mayores ($p \leq 0.001$) que los obtenidos por el método de la A.O.A.C.

Tabla 2 - Determinaciones de Aflatoxina B₁ en alimentos compuestos por los dos métodos en estudio ($\mu\text{g/kg}$). Recuperación de Aflatoxina B₁ agregada (20 $\mu\text{g/kg}$): 73.70% (método A.O.A.C.) y 90.55% (método A-Z).

X A-Z/A.O.A.C.: 1.23

Símbolos: (*) = Límite de detección 1-2 $\mu\text{g/kg}$.

Muestra nº	Método A.O.A.C.		Método A-Z (*)		A-Z/A.O.A.C.
	OBS. 1	OBS. 2	OBS. 1	OBS. 2	
1	5600	5900	7250	7250	1.26
2	5000	5000	6500	6250	1.28
3	5000	5500	6700	6800	1.29
4	5750	5750	7250	7500	1.28
5	7000	7250	8750	8500	1.14
6	6500	6500	8000	8000	1.23
7	5350	5650	6850	7150	1.27

Discusion

El método A-Z resultó adecuado para determinar Aflatoxina B₁ y Zearalenona en todas las muestras de alimento.

Además, la técnica fue ensayada para Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en muestras de maíz suministradas por "The International Mycotoxin Check Sample Programme" organizado por la "International Agency for Research on Cancer" de la Organización Mundial de la

Salud, obteniéndose resultados satisfactorios (8).

El método propuesto presentó las siguientes ventajas - Un procedimiento rápido, económico y de fácil aplicación, puede utilizarse para cuantificar Aflatoxinas y Zearalenona en maíz o alimentos compuestos para animales. Para maíz puede suprimirse la cromatografía bidimensional, efectuando solamente el desarrollo en cloroformo-acetona (90 + 10).

No requiere complicadas etapas de purificación que si bien permiten separar algunos compuestos que se extraen de la muestra junto con las micotoxinas, o bien no eliminan los compuestos más semejantes al estudiado que son los que realmente interfieren en el análisis posterior, o si lo hacen ocasionan también una pérdida considerable del compuesto a cuantificar.

Aunque las técnicas rápidas que emplean minicolumnas logran eliminar interferencias en sustancias de composición conocida (4), para el caso de alimentos compuestos se hace necesario el empleo de una TLC bidimensional que permite obtener un mapa cromatográfico y así evitar falsos positivos altamente probables en productos de composición tan variada.

El método es apropiado para ser utilizado en laboratorios pequeños sin necesidad de equipamiento sofisticado permitiendo efectuar estudios de incidencia y control de la contaminación por micotoxinas de cereales y subproductos lo que resulta de fundamental importancia para la producción y exportación de productos agropecuarios para los países latinoamericanos.

Summary

Rapid and economic method to detect Aflatoxins and Zearalenone in animal feed

The quantitative method (A-Z) has been developed to determine Aflatoxin B₁ and Zearalenone in mixed feed for the animal consumption. It can be used to quantify Aflatoxins B₂, G₁ and G₂ to be applied to corn. Also, this

economic, rapid and applicable method comprehends: extractions with an aqueous mixture of methanol, bipartition with chloroform, and visual quantification by thin layer chromatography. Complex steps for purification are not required, interferences are eliminated using a bidimensional thin layer chromatography, and ordinary laboratories find it the appropriate method. And it can detect 1-2 μ g/Kg of Aflatoxin B₁ and 25 μ g/Kg of Zearalenone. The validity of the technique has been demonstrated by comparison with the CB method of the A.O.A.C. for determination of Aflatoxins in corn, and by the use of the official method of the A.O.A.C. for Zearalenone in corn.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado por subsidios del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y de la Secretaría de Ciencia y Técnica (SECyT), dependientes del Ministerio de Educación de la República Argentina.

Referencias Bibliograficas

1. Association of Official Analytical Chemists. Book of Methods 14th. Ed., A.O.A.C. Washington DC; Sec. 26004-26013, 1984.
2. Association of Official Analytical Chemists. Book of Methods 14th. Ed.; A.O.A.C. Washington DC; Sec. 26026-26031, 1984.
3. Association of Official Analytical Chemists. Book of Methods 14th. Ed.; A.O.A.C. Washington DC; Sec. 26139-26147, 1984.
4. Eguizazu, G.M. - Bildungs bedingungen von Aflatoxinen in Sonnenblumen. Diss. Universitat Hohenheim, 1983.
5. Eppley, R.M.; Stoloff, L.; Trucksess, M.W. & Chung, C.W. - Survey of Corn for Fusarium toxins. J.A.O.A.C. 57(3):618-620, 1974.
6. Fulgueira, C.L. & Bracalenti, B.J.C. de - Detección simultánea de Aflatoxina B₁ y Zearalenona en alimento balanceado para cerdos. Revista Latinoamericana de Microbiología 29(3):216-224, 1987.
7. Gimeno, A. - Rapid Thin Layer Chromatographic Determination of Zearalenone in Corn, Sorghum and Wheat.

- J.A.O.A.C. 66(3):565-569, 1983.
8. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. Preliminary Report on the Statistical Analysis of Results Obtained for the Analysis of Aflatoxins B_1 , B_2 , G_1 and G_2 in 84-1 Yellow Maize (Corn) Meal. Aflatoxins Check Sample Survey Programme, 1985.
9. Joseffson, B.G.E. & Moller, T.E. - Screening method for the detection of Aflatoxins, Ochratoxin, Patulin, Sterigmatocystin, and Zearalenone in Cereals. J.A.O.A.C. 60(6):1369-1371, 1977.
10. Kamimura, H.; Nishijima, M.; Yasuda, K.; Saito, K.; Ibe, A.; Nagayama, T.; Ushiyama, H. & Naoi, Y. - Simultaneous Detection of Several Fusarium Mycotoxins in Cereals, Grains, and Foodstuffs. J.A.O.A.C. 64(5):1067-1073, 1981.
11. Roberts, B.A.; Glancy, E.M. & Patterson, D.S.P. - Rapid, Economical Method for Determination of Aflatoxin and Ochratoxin in Animal Feedstuffs. J.A.O.A.C. 64(4):961-963, 1981.
12. Trenholm, H.L.; Friend, D.W.; Hamilton, R.M.G. & Thompson, B.K. - Vomitoxin and Zearalenone in Animal Feeds. Minister of Supply and Services Canada. Publication 1745/E:3-8, 1982.
13. Warner, R.; Ram, B.F.; Hart, L.P. & Pestke, J.J. - Screening for Zearalenone in Corn by Competitive Direct Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. J. Agric. Food Chem., 34(4):714-717, 1986.

Recebido para publicação em 27/07/87

INHIBICIÓN DE ASPERGILLUS PARASITICUS NRRL 2999 POR UNA CEPA DE STREPTOMYCES SP (°)

Cecilia Fulgueira
 Alfredo L. Borghi
 & Blanca J.C. de Bracalenti

Deptº de Microbiología
 Facultad de Ciencias Bioquímicas y
 Farmacéuticas
 Universidad Nacional de Rosario
 Suipacha 531.2000 Rosario
 Santa Fe. República Argentina

Resumen

Aspergillus parasiticus está presente en el ambiente con otros microorganismos que pueden influenciar su desarrollo y la producción de aflatoxinas. Estas deterioran la calidad de los alimentos y, ya que es casi imposible su descontaminación, se trata de evitar la contaminación por las cepas fúngicas productoras. Entre los microorganismos antagonistas presentes en los suelos donde se cultivan cereales se hallan los *Streptomyces*. El propósito de este estudio fue probar el poder inhibitorio de una cepa de *Streptomyces* sp. sobre la germinación y crecimiento de *A. parasiticus* NRRL 2999, productor de aflatoxinas. La germinación y el crecimiento del *A. parasiticus* fueron estudiados: a) en condiciones basales, b) sembrando simultáneamente una suspensión de *Streptomyces* sp. y una suspensión de conidias de *A. parasiticus*, c) sembrando la suspensión del *Streptomyces* y 24 horas después la suspensión del *Aspergillus*, d) enfrentando la suspensión del *Aspergillus* con un filtrado del medio extracto de levadura-glucosa, inoculado con *Streptomyces* sp. *A. parasiticus* alcanzó el 100% de germinación a las 9 horas, mientras que en la prueba c) sólo el 20% de sus conidias germinaron en el mismo tiempo. El crecimiento de *A. parasiticus* se estableció en medio de Czapecck, observándose una inhibición en el desarrollo sólo en el caso c). Si bien la cepa de *Streptomyces* sp. no inhibió totalmente la germinación del *A. parasiticus*, permitió controlar antagónicamente su desarrollo, evitando así la producción de aflatoxinas.

Introducción

Las aflatoxinas son un grupo de metabolitos secundarios altamente tóxicos producidos por los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* que pueden infectar las semillas (11).

La contaminación con aflatoxinas de maíz precolechado, semillas de algodón, maní y otros productos agrícolas es un problema sustancial en

las regiones templadas donde se desarrollan estos cultivos.

Estas micotoxinas deterioran la calidad de los alimentos y ya que es casi imposible su detoxificación, se trata de evitar la contaminación por las cepas fúngicas productoras.

Considerables esfuerzos de investigación han sido dirigidos hacia desarrollar medidas de control contra la producción de aflatoxinas en productos agrícolas y docenas de fungicidas inhibidores de

(°) Trabajo subsidiado por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Nación (SECyT).

crecimiento y sustancias químicas variadas han sido testadas como posibles inhibidores de la síntesis de aflatoxinas (11).

Además de los químicos agregados como biocidas durante la labranza agrícola, en la naturaleza existen numerosos factores que interaccionan con el crecimiento y el metabolismo de un hongo. Pueden haber, por ejemplo, agentes antimicrobianos producidos por la planta sobre la cual el hongo está creciendo o por los microorganismos, estableciéndose en este último caso un tipo de control biológico, es decir el empleo de un organismo para controlar otro (2, 10).

Las interacciones microbianas asociadas con control biológico, han sido consideradas generalmente antagonistas (antibiosis, micoparasitismo, lisis) o competitivas (4).

Entre de las bacterias, las propiedades micolíticas han sido observadas principalmente en los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Streptomyces*. Muchas de las inhibiciones reportadas son debidas a una respuesta del patógeno a una sustancia antimicrobiana o antibiótica producida por el actinomicete o bacteria (9).

Entre los microorganismos antagonistas presentes en los suelos donde se cultivan cereales se hallan gran cantidad de *Streptomyces*, muchos de ellos capaces de producir sustancias inhibidoras que pueden llegar a afectar la viabilidad y capacidad de diseminación del *A. flavus* y *A. parasiticus*, como así también su capacidad para producir aflatoxinas.

El propósito de este estudio fue probar el poder inhibitorio de una cepa de *Streptomyces* sp., seleccionado entre los que produjeron inhibición del *A. parasiticus* NRRL 2999 cuando se sembró una suspensión de tierra y el hongo en estudio, sobre la germinación y el crecimiento del mencionado *A. parasiticus* productor de aflatoxinas, determinando si tal acción es debida a antagonismo o competencia.

Materiales y Metodos

Preparación del inóculo de *A.*

parasiticus - La cepa fue siministrado por el National Regional Research Laboratory de USA. El *A. parasiticus* fue sembrado en placas de Agar-Czapeck e incubado a 28°C, 5-6 días hasta visualizar la aparición de conidias. En ese momento las placas fueron inundadas con una solución de Tween 80 al 1% que luego fue filtrada a través de 6 capas de gasa estéril, procediéndose posteriormente al recuento de la suspensión de conidias resultante en cámara de Neubauer. Se prepararon suspensiones de aproximadamente 10⁷ conidias/ml.

Aislamiento de una cepa de Streptomyces con propiedades inhibitorias - El *Streptomyces* empleado se aisló del suelo, seleccionándolo entre los que produjeron inhibición del desarrollo del *A. parasiticus* cuando se sembró en placas de Agar Extracto de malta una suspensión de tierra proveniente de un campo donde se cultivan cereales próximo a la ciudad de Rosario, y el hongo en estudio.

La cepa de *Streptomyces* sp. fue sembrada en un medio especial para el mantenimiento de *Streptomyces* consistente en: glucosa 1%, polipeptona 0,2%, extracto de carne 0,1%, extracto de levadura 0,1%, sulfato de magnesio heptahidratado 0,5%, solución salina ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1%, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1%, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,1%, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,05%) 1% y agar 2,0%, pH = 7,0 (5). Los tubos se incubaron a 28°C, 4-5 días, y luego se conservaron a 4°C.

En el momento de usar, el *Streptomyces* fue repicado en placas de Agar Extracto de Malta incubado por 5 días a 28°C. A partir de las mismas se preparó una suspensión acuosa del *Streptomyces* usando Tween 80 como tensoactivo y se determinó la concentración de tal suspensión por recuento de las unidades formadoras de colonias después de dilución y siembra en Agar Extracto de Malta.

Germinación de conidias de A. parasiticus en medio sólido - La germinación de conidias de *A. parasiticus* se estudió sobre placas de Agar Extracto de Malta incubado a 30°C. Se sembraron en cada placa 200μl de la suspensión conteniendo 10⁷ conidias/ml. La germinación fue detenida a diferentes tiempos mediante el agregado de 0,2ml de formal y en cada placa se efectuó la determinación del porcentaje de conidias

productoras de tubos germinativos.

Germinación en presencia de *Streptomyces* sp. - La germinación de las conidias del *A. parasiticus* NRRL 2999 fue estudiada: a) Sembrando simultáneamente 0,5ml de una suspensión del *Streptomyces* de $3,6 \times 10^3$ u.f.c./ml y 200 μ l de una suspensión de conidias del *A. parasiticus* de 10^7 conidias/ml en Agar Extracto de Malta.

b) Sembrando 0,5ml de la suspensión del *Streptomyces* sp. de $3,6 \times 10^3$ u.f.c./ml en Agar Extracto de Malta, incubando 24 horas a 30°C y luego sembrando 200 μ l de la suspensión de *A. parasiticus* de 10^7 conidias/ml.

c) Enfrentando la suspensión del *Aspergillus* con 1ml. del filtrado del medio Extracto de levadura-glucosa (glucosa 2%, extracto de levadura 0,5%), inoculado con *Streptomyces* sp. e incubado 5 días a 30°C .

La germinación fue seguida de la misma forma que en las condiciones basales.

Crecimiento; determinación de la curva de crecimiento en medio sólido en condiciones basales - Inóculos de 1 μ l de la suspensión de *A. parasiticus* NRRL 2999 contenido 10 7 conidias/ml fueron sembradas sobre placas de Agar Czapeck y el crecimiento se estimó determinando el diámetro promedio (a diferentes tiempos) de las colonias obtenidas por incubación a 28°C .

Crecimiento en presencia de *Streptomyces* sp. - El crecimiento del *A. parasiticus* NRRL 2999 fue estudiado - a) Sembrando simultáneamente 1 μ l de la suspensión de *A. parasiticus* contenido 10 7 conidias/ml y 0,5ml de la suspensión de *Streptomyces* sp. de $3,6 \times 10^3$ u.f.c./ml sobre placas de Agar Czapeck.

b) Sembrando 0,5ml de la suspensión de *Streptomyces* sp. de $3,6 \times 10^3$ u.f.c./ml en Agar Czapeck, incubando a 28°C durante 24 horas y luego sembrando 1 μ l de la suspensión de conidias del *A. parasiticus*.

Determinación de la concentración de glucosa - Se utilizó para la determinación de glucosa el método enzimático de la glucosa oxidasa (Wiener Lab.) con un testigo de glucosa de 100mg/dl.

Se sembraron por separado 1 μ l de la suspensión de *A. parasiticus* NRRL 2999 de 10^7 conidias/ml y 0,5ml de una suspensión de *Streptomyces* sp. contenido 3,6 x 10^3 u.f.c./ml en medio de Extracto de malta líquido contenido 1284mg/ml de glucosa inicial. La glucosa residual fue determinada tomando alícuotas del medio inoculado a diferentes tiempos.

Determinación del pH - Se tomaron alícuotas de los cultivos en distintos tiempos y se midió el pH con un aparato Orion Research Digital Ionalyzer x 501.

El pH del medio Extracto de Malta líquido utilizado fue de 6.65.

Resultados

Germinación - Las determinaciones fueron efectuadas por triplicado y los valores medios se presentan en la Tabla 1 y en la Figura 1.

Crecimiento - Los diámetros promedios de las colonias obtenidas por incubación a 28°C se muestran en la Figura 2 y en la Tabla 2. (Las determinaciones fueron realizadas por triplicado).

Determinación de la concentración de glucosa - Los promedios de las determinaciones se muestran en la Figura 3 y en la Tabla 3. (Las determinaciones fueron efectuadas por triplicado).

Determinación del pH - Los promedios de las determinaciones se muestran en la Figura 4 y en la Tabla 4. Las determinaciones fueron hechas por triplicado.

Discusion

Cuando *Streptomyces* sp. creció conjuntamente con *Aspergillus parasiticus* alteró la germinación y el crecimiento de este hongo.

La fase de crecimiento del *Streptomyces* sp. fue determinante de la forma en la cual éste afectó el ambiente en el que creció junto a *Aspergillus parasiticus*.

Los estudios de la germinación demostraron que la presencia del *Streptomyces* sp. disminuyó el porcentaje

Tabla 1 - Germinación de las conidias del *A. parasiticus* NRRL 2999 sembradas en Agar Extracto de Malta en condiciones basales, junto con su filtrado de *Streptomyces* sp., simultáneamente al *Streptomyces* sp. o 24 horas después del crecimiento del *Streptomyces* sp.

Tiempo (horas)	Porcentaje de conidias germinadas					
	<i>Aspergillus</i>		<i>Streptomyces</i>		Filtrado	
	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	(24 horas)	+	<i>Streptomyces</i>	
4	0	0	0	0	0	
6	15	9	0	16		
6.30	30	11	0	31		
7	53	14	0	52		
7.30	67	17	0	65		
8	85	19	0	83		
9	100	20	0	95		

Tabla 2 - Crecimiento del *A. parasiticus* NRRL 2999 en Agar Czaapeck sembrado en condiciones basales, junto al *Streptomyces* sp. o 24 horas después del crecimiento del *Streptomyces* sp.

Tiempo (días)	Diámetro de la colonia (mm)		
	<i>Aspergillus</i>		<i>Streptomyces</i>
	(24 horas)	+	(24 horas)
1	-	-	0
2	5,5	-	0
3	12	0	0
4	20	3	0
5	30	6	0
6	39,5	7	0
7	50	8	0
8	56	9	0
9	61,5	10	0
10	65	10	0
11	69	11	0
12	69	11	0
13	69	12	0

Tabla 3 - Variación la concentración de glucosa residual del medio Extracto de Malta líquido inoculado con *A. parasiticus* NRRL 2999 y con *Streptomyces* sp.

Días	<i>A. parasiticus</i>	<i>Streptomyces</i>
2	1160	1200
4	900	1170
7	650	1125
9	500	1070
10	380	1040
12	225	940

Tabla 4 - Variación del pH del medio Extracto de Malta líquido inoculado con *A. parasiticus* NRRL 2999 y con *Streptomyces* sp.

Días	<i>A. parasiticus</i>	<i>Streptomyces</i> sp.
2	6,60	6,45
4	5,63	6,10
7	4,46	6,00
9	4,40	5,90
10	4,30	5,85
12	4,20	5,80

de conidias germinadas, siendo la inhibición total sólo en el caso en que este microorganismo fue sembrado con anticipación al *A. parasiticus*. Teniendo en cuenta que *Streptomyces* son organismos típicamente conocidos por su producción de sustancias antimicrobianas y de crecimiento lento en medios sólidos, el efecto anterior podría atribuirse a la producción de metabolitos inhibidores que actuarían sobre la germinación de las conidias de *A. parasiticus* más que a una competición por el sustrato.

Además, conociendo que la germinación de las conidias del *A. parasiticus* es relativamente rápida (a

las 9 horas el 100% de las conidias emitieron tubos germinativos) es probable que la producción de la sustancia inhibidora quede retrasada a la emisión de tubos germinativos y por eso su efecto sea sólo parcial.

Cuando se estudió la acción del filtrado de *Streptomyces* sobre la germinación, no se observó ningún efecto inhibidor significativo, lo que podría deberse a que el medio Extracto de Levadura-Glucosa no sea el apropiado para la síntesis y exportación de la sustancia inhibidora.

También se observó que cuando se enfrentaron *Streptomyces* y *Aspergillus* la inhibición del crecimiento del hongo

Figura 1 - Curvas de germinación de las conidias del *A. parasiticus* NRRL 2999 sembradas en Agar Extracto de Malta en condiciones basales, junto con su filtrado de *Streptomyces* sp., simultáneamente al *Streptomyces* sp. o 24 horas después que el *Streptomyces* sp. había sido sembrado.
Símbolos: ASP = *Aspergillus parasiticus*; STR = *Streptomyces* sp.

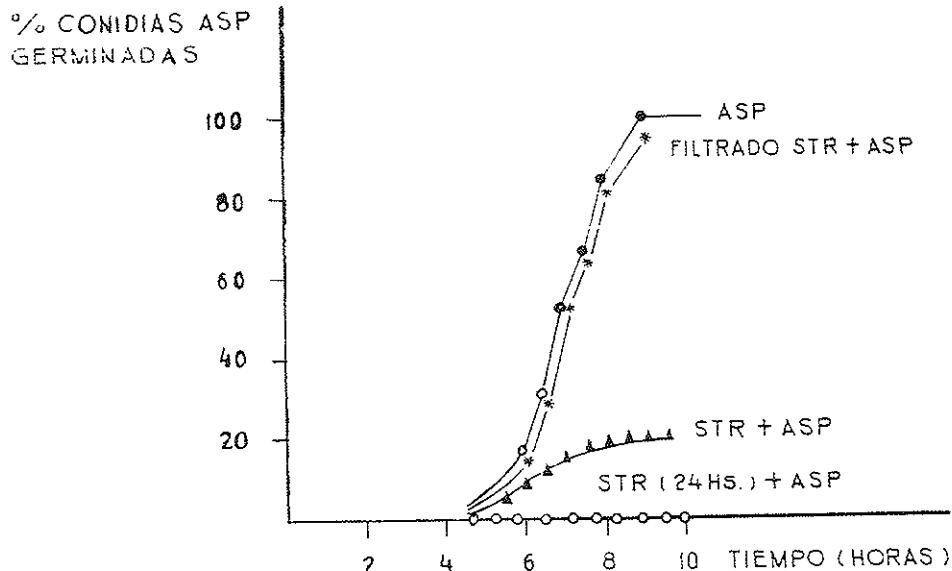


Figura 2 - Curvas de crecimiento del *A. parasiticus* NRRL 2999 en Agar Czaapeck sembrado en condiciones basales, junto al *Streptomyces* sp. o 24 horas después que el *Streptomyces* sp. había sido sembrado.

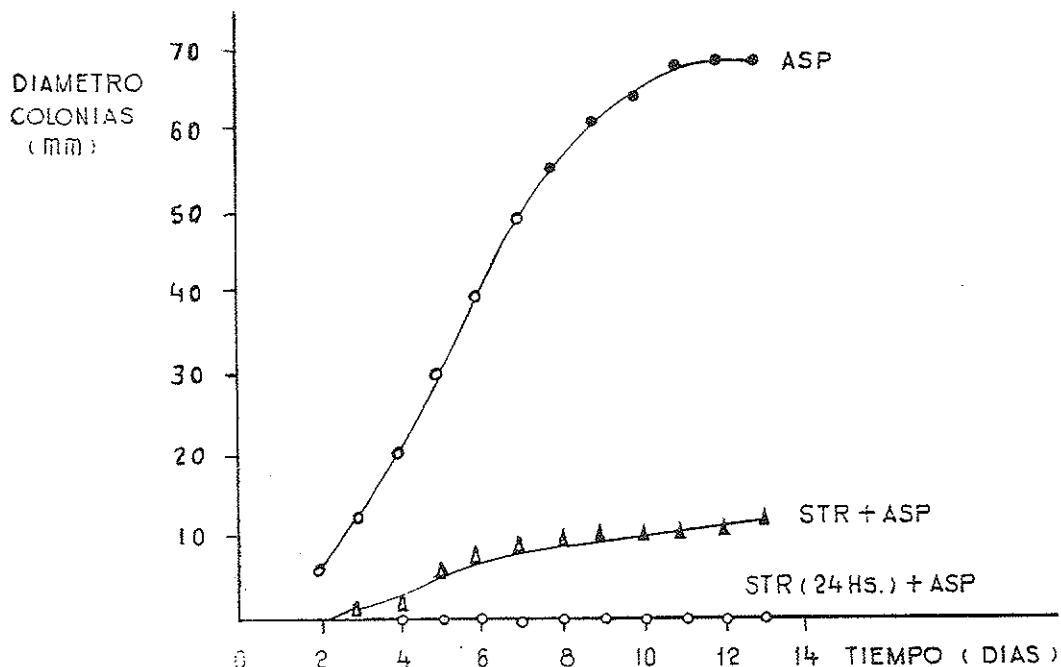


Figura 3 - Variación de la concentración de glucosa residual del medio Extracto de Malta líquido inoculado con *A. parasiticus* NRRL 2999 y con *Streptomyces* sp.

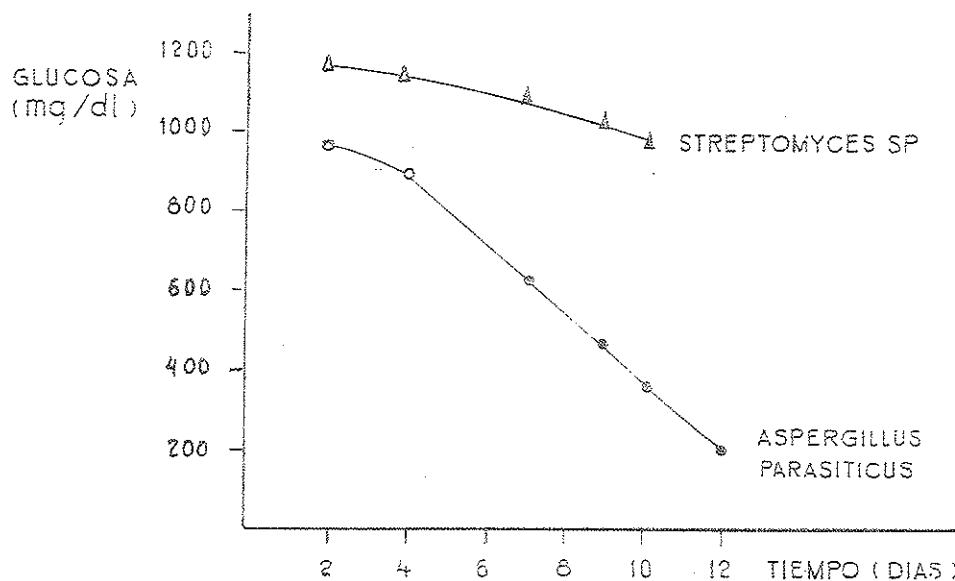
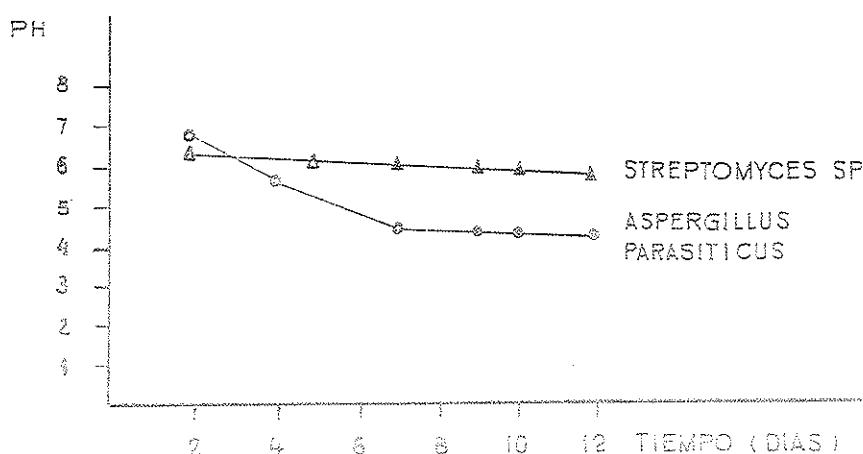


Figura 4 - Variación del pH del medio Extracto de Malta líquido inoculado con *A. parasiticus* NRRL 2999 y con *Streptomyces* sp.



fue completa únicamente cuando se sembró anticipadamente *Streptomyces*, tal vez por la acción de la sustancia inhibidora sobre la germinación. En el caso que los dos microorganismos fueron sembrados simultáneamente algunas conidias que no fueron afectadas pudieron germinar, continuando su desarrollo pero sin alcanzar las dimensiones observadas en ausencia de *Streptomyces*, obteniéndose colonias de crecimiento más restringido.

Para evaluar si el *Streptomyces* afecta también el crecimiento del *A. parasiticus* es fundamental determinar si la sustancia inhibidora producida ejerce algún efecto sobre las conidias del hongo ya germinado.

Con respecto a la utilización de glucosa por *A. parasiticus* en el medio Extracto de Malta-Glucosa, comparativamente con *Streptomyces* sp., se observa en la Figura 3 que el hongo metaboliza la glucosa con mayor velocidad que el *Streptomyces* sp. por lo tanto se descartaría que el efecto inhibitorio sobre *A. parasiticus* sea por competencia sobre éste en el medio de cultivo.

Las variaciones del pH a lo largo de la experiencia para *Streptomyces* sp. son relativamente pequeñas, en cambio *A. parasiticus* acidifica el medio hasta el día 7 y luego el pH permanece estable. La influencia de *Streptomyces* sp. como modificador del pH del medio no es significativa por lo tanto no influiría en el efecto inhibitorio.

Los hongos productores de aflatoxinas fueron considerados inicialmente como hongos de almacenamiento. Sin embargo descubrimientos subsiguientes de especies aflatoxicogénicas en granos en desarrollo demostró que la contaminación puede efectuarse también antes de la cosecha a partir del suelo (1, 3, 6, 7).

La efectividad de *Streptomyces*, presentes naturalmente en el mismo suelo donde se desarrollan los cereales, como agentes protectores contra *A. parasiticus* bajo condiciones de campo está siendo estudiada y podría ser aprovechada para controlar la contaminación precosecha.

Summary

Inhibición de Aspergillus parasiticus

NRRL 2999 for a strain of *Streptomyces* sp

Aspergillus parasiticus is present in the environment together with other organisms that can influence its developing and production of aflatoxins. These toxins deteriorate the quality of food and, since its decontamination is almost impossible. It is intended to avoid contamination produced by toxigenic fungi strains. Among all the antagonistic microorganisms present in the soils cereals are grown, *Streptomyces* is found. The aim of this study was to test the inhibitory potential of a strain of *Streptomyces* sp. on the germination and growing of *A. parasiticus* NRRL 2999, producer of aflatoxins. Germination and growth of *A. parasiticus* were studied: a) on basal conditions, b) cultivating simultaneously a suspension of *Streptomyces* sp. and a suspension of *A. parasiticus*, c) cultivating the suspension of *Streptomyces* and 24 hours later inoculating a suspension of *Aspergillus*, d) facing the suspension of *Aspergillus* with a filtered medium extract of yeast-dextrose, inoculated with *Streptomyces* sp. *A. parasiticus* reached a 100 percent of germination at 9 hours while in test c) only a 20 percent of its conidias grown at the same period of time. The growth of *A. parasiticus* was established in medium Czapecck. An inhibition in the growing was observed only in test c). Despite the fact that *Streptomyces* sp. strains did not inhibit the germination of *A. parasiticus*, completely, it did allow the control of the growth of *A. parasiticus*, not permitting, this way, the production of aflatoxins.

Referencias

1. Anderson, H.W.; Nehring, E.W. & Wichser, W.R. - Aflatoxin contamination of corn in the field. J. Agric. Food Chem., 23:775-782, 1975.
2. Deacon, J.W. - Introduction to Modern Mycology. 2nd. ed. Great Britain. Blackwell Scientific Publications, 1981.
3. Guthrie, W.D.; Lillehoj, E.B.; Barry, D.; Mc Millian, W.W.; Kwolek, W.F.; Franz, A.O.; Catalano, E.A.; Russell, W.A. & Widstrom, N.W. - Aflatoxin contamination of pre-harvest corn

- interaction of european corn borer larvae and *Aspergillus flavus*-group isolates. J. Econ. Entomol. 75:265-269, 1982.
4. Huber, D.M.; Andersen, A.L. & Finley, A.M. - Mechanism of Biological Control in a Bean Root Soil. Phytopathology 56:953-956, 1966.
5. Keeratipibul, S.; Sugiyama, M.; Nimi, O. & Nomi, R. - Streptothrinic Production by a New Isolate of *Streptomyces* from Thailand Soil. J. Fermet. Technol., 62(1):19-28, 1984.
6. Lillehoj, E.B. & Hesseltine, C.W. - Aflatoxin control during plant growth and harvest of corn. In J.V. Rodricks, C.W. Hesseltine & M.A. Mehlman (eds.). Mycotoxins in Human and Animal Health. Pathotox Publishers. Park Forest South III. pp.107-119, 1977.
7. Lillehoj, E.B. - Effect of environmental and cultural factors on aflatoxin contamination of developing corn kernels. In U.L.Diener, R.L. Asquith and J.W.Dickens (ed.). Aflatoxin and *Aspergillus flavus* in corn. Southern Cooperative Series Bulletin 279. Alabama Agricultural Experiment Station; Auburn., pp.27-34, 1983.
8. Marois, J.J. & Mitchell, D.J. - Effects of Fungal Communities on the Pathogenic and Saprophytic Activities of *Fusarium oxysporum* f.sp. radicis lycopersici. Phytopathology 71 (12):1251-1256, 1981.
9. Rose, S.L.; Li, C.Y. & Stiebres Hutchins, A.A. - Streptomycete antagonist to *Phellinus wienii*, *Fomes annosus* and *Phytophthora cinnamomi*. Can. J. Microbiol., 26:583-587, 1980.
10. Smith, J.E. & Moss, M.D. - Mycotoxins. Formation, Analysis and Significance. Great Britain. John Wiley & Sons. Ltd., 1985.
11. Valcarel, R.; Bennett, J.W. & Vidansa, J. - Effect to selected inhibitions on growth, pigmentation and Aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. Mycopathologia, 94:7-10, 1986.

Recebido para publicação em 21/04/88

EFEITO DE INÓCULO DE FUNGOS MICORRÍZICOS VESÍCULO ARBUSCULARES PROVENIENTES DE DIFERENTES PLANTAS DOADORAS SOBRE O MILHO*

José Octávio Machado
 Manoel Evaristo Ferreira
 Eurico Kenji Nakazawa
 Ely Nahas
 & Euclides Braga Malheiros

Fac. de Ciências Agrárias e Veterinárias
 de Jaboticabal - UNESP
 Rodov. Carlos Tonanni Km 5, s/nº
 14870 Jaboticabal SP

Resumo

Conduziu-se em casa de vegetação, um ensaio onde ao mesmo tempo em que se testou uma técnica de adição de inóculos de fungos micorrízicos se comparou três plantas hospedeiras como doadoras dos mesmos. A técnica empregada consiste na adição, localizada logo abaixo da linha em que ficarão as sementes de uma "cama" de fragmentos de raízes micorrizadas, recém-coletadas. As fornecedoras destes inóculos foram: *Paspalum notatum* Flugge, *Oryza sativa* Lineu e *Zea mays* Lineu e a receptora *Z. mays* L. Ao final do experimento verificou-se que a técnica estudada propiciou bons resultados e que o *P. notatum* se mostrou mais promissor como fornecedor de fungo micorrízico, recomendando-se maior atenção ao mesmo. Ainda, pelo emprego de duas fontes de fósforo, pode-se concluir que efetivamente o inóculo de *P. notatum* aumenta a capacidade da planta em absorver o fósforo disponível, não atuando diretamente como solubilizador de fosfato.

Introdução

As associações não patogênicas entre fungos e plantas que mostram no córtex das raízes vesículas e arbusculos são denominados micorrizas vesículo arbusculares (MVA). Estas ocorrem na maioria das plantas cultivadas e espécies de plantas em seus ecossistemas naturais (Hayman 1978). Segundo o mesmo autor as MVA são amplamente distribuídas entre as gramíneas e leguminosas de interesse econômico.

A literatura mostra que a associação MVA beneficia as plantas através de maior absorção de nutrientes, principalmente de fósforo (Abbott & Robson 1982) e, também provavelmente, devido à produção de fitohormônios pelo fungo (Hayman 1978). Com relação

a absorção de nutrientes e mecanismo mais aceito, segundo Nye (1977), seria a diminuição da distância de difusão dos nutrientes da solução do solo para as raízes devido a um aumento da superfície de absorção, conferida pela ação do fungo, além da zona de depleção da própria raiz.

Como consequência da associação micorrízica ocorre maior desenvolvimento e produtividade das plantas (Hyman & Mosse 1971 e 1972; Mosse & Col. 1973; Ross 1971; Crush 1973 e 1974; Ross & Gilliam 1973). Entre as, plantas beneficiadas por essa associação, o milho (*Zea mays* L.), na ausência de adubação fosfatada chega a produzir dez vezes mais grãos e, na presença da mesma, cerca de 20% a mais (Smith 1978).

Dada a potencial importância da MVA no incremento da produtividade das

*Trabalho desenvolvido com apoio da Comissão de Projetos Especiais da UNESP.

culturas, muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos no sentido de se inocular variedades selecionadas de fungos às plantas cultivadas (Mosse & Col. 1969; Mosse & Hayman 1971). A maior dificuldade para utilização dos inóculos, em larga escala, decorre da impossibilidade de cultivo, em cultura pura, do fungo capaz de formar a associação (Hayman 1978). Inoculação de fungos formadores de micorrizas, isentos de contaminantes é possível a partir de esporos coletados, por métodos especiais, diretamente do solo de rizosfera. Tal prática é inviável para utilização em larga escala, a menos que se encontre ambiente com alta concentração de propágulos de fungos MVA. Inóculos de uso mais prático podem ser obtidos peletizando-se sementes com solo que contenha esporos como sugere Powell (1979) ou, colocando-se solo infectado e fragmentos de raízes infectadas, logo abaixo da semente (Gerdemann & Nicolson 1963).

Considerando o papel que associações micorrízicas podem representar no aproveitamento de fosfatos, foi conduzido o presente trabalho com o objetivo de avaliar a eficiência de inóculos portadores de endófitos nativos provenientes de diferentes plantas tendo como receptora o milho.

Material e Métodos

Foi usada terra colhida na camada arável de um Latossol Vermelho Escuro-fase arenosa, cuja caracterização química inicial, feita segundo a metodologia descrita em Raij & Quaggio (1983), é a seguinte: pH = 4,3; MO = 0,85%; P = 11 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TFSA; Ca, Mg e K, em e.mg/100ml de TFSA, respectivamente 0,4, 0,2 e 0,11; H⁺ + Al³⁺ = 5,3 e.mg/100ml TFSA.

Os tratamentos foram constituídos pela combinação dos níveis 0 e 1 de fosfato nas formas de fosfato de rocha moída (fosfato natural de Araxá), superfosfato triplo e raízes de três plantas hospedeiras infectadas, admitidas como doadoras de inóculos de fungos micorrízicos nativos (*Paspalum notatum* Flugge, *Oryza sativa* Lineu e *Zea mays* Lineu), esterilizadas por autoclavação a 120°C por 15 minutos (inóculo inativo) ou não esterilizadas

(inóculo ativo), num total de 18 tratamentos. A dose de P adicionada foi equivalente a 30 μg de P/ml de TFSA, adotando-se o teor de P₂O₅ total do adubo para efeito de cálculo. A quantidade de raiz usada foi de 96g de fragmentos por vaso, para as três plantas doadoras, pois os níveis de infecções nas raízes foi semelhante, sendo de 100% para *P. notatum* F e 98,3% para *O. sativa* L. e *Zea mays* L. estas porcentagens foram determinadas após preparação das raízes pelo método de Phillips & Haymann (1970) e avaliação pelo método microscópico, aplicado a 60 pedaços de 0,5cm, conforme descrição de Giovanetti & Mosse (1980). Do solo retirado durante a limpeza, a seco das raízes, foram separados e examinados os esporos de fungos MVA e constatado a presença dos gêneros *Gigaspora*, *Glomus* e *Sclerocystis*, este último, muito abundante em solo de *P. notatum* F. Foram usadas 3 repetições e o delineamento empregado foi o inteiramente casualizado, num esquema fatorial 3 x 3 x 2.

A volumes de 2,8 litros de terra previamente tratada com carbonato de cálcio e carbonato de magnésio, na proporção 3:1 de Ca para Mg, de modo a elevar a sua saturação em bases a 40%, adicionou-se cloreto de potássio para saturação a 5% e fosfato nas doses zero ou 0,084g de P₂O₅, na forma de fosfato de rocha moída ou de superfosfato triplo. A terra foi umedecida a 80% do poder de enbebição e colocada, com leve compactação nos respectivos vasos. Após 10 dias, lavou-se o excesso de sais de cada vaso através de adição de 2500ml de água destilada e aguardou-se tempo suficiente para que o solo voltasse ao peso inicial (umidade de 80% do poder de enbebição). Posteriormente, removeu-se 1/4 da terra de cada vaso, colocou-se 96g de raízes fragmentadas, correspondentes à respectiva fonte pretendida de micorriza. Devolveu-se a terra retirada do vaso ao mesmo, fazendo-se leve compactação. A seguir semeou-se 10 sementes de milho a profundidade de cerca de 3cm, cobrindo-se com terra seca. Adicionou-se 100ml de solução de nutrientes (contendo N, S, Cu, Zn, Mn, B e Mo) preparada conforme citado em Waugh e Fitts (1966). Após a germinação aguardou-se 5 dias e procedeu-se, desbaste deixando-se 5 plantas por vaso. Durante a condução do

Tabela 1 - Valores médios encontrados na parte aérea e radicular de *Zea mays* L. em termos de matéria seca (MS), teores de fósforo (%P), fósforo extraído (P extraído) e porcentagem de infecção micorrízica (%MVA) em função das fontes de fósforo, do tipo (planta doadora) e da viabilidade (esterilizado ou não) do inoculante portador de fungos endomicorrízicos.

Fontes de fósforo	Inóculo		Parte aérea			Sistema radicular		
	Planta hospedeira (doadora de inóculo)	Atividade	MS g/vaso	%P	P extraído mg/vaso	MS g/vaso	%P	%MVA
Nenhum	<i>Oryza sativa</i> L.	Ativo	12,997	0,048	6,215	6,590	0,210	70,000
		Inativo	12,650	0,049	6,210	6,970	0,187	59,445
	<i>Paspalum notatum</i> F.	Ativo	14,047	0,065	9,097	7,127	0,223	71,567
		Inativo	12,667	0,061	7,788	7,330	0,180	68,333
	<i>Zea mays</i> L.	Ativo	13,270	0,061	8,095	6,950	0,180	69,444
		Inativo	13,857	0,058	8,090	6,960	0,190	50,000
Fosfato natural	<i>Oryza sativa</i> L.	Ativo	13,980	0,058	8,141	6,777	0,173	75,000
		Inativo	13,997	0,077	10,420	7,126	0,170	57,056
	<i>Paspalum notatum</i> F.	Ativo	14,227	0,065	9,232	6,610	0,170	48,889
		Inativo	14,207	0,063	8,956	7,117	0,203	35,556
	<i>Zea mays</i> L.	Ativo	13,060	0,065	8,482	6,847	0,203	78,333
		Inativo	14,077	0,083	11,631	7,077	0,210	52,056
Superfosfato triplo	<i>Oryza sativa</i> L.	Ativo	20,390	0,085	17,306	7,203	0,150	73,889
		Inativo	20,170	0,101	20,419	7,007	0,177	65,000
	<i>Paspalum notatum</i> F.	Ativo	20,327	0,097	19,651	7,333	0,193	69,444
		Inativo	20,800	0,088	18,304	7,313	0,193	42,220
	<i>Zea mays</i> L.	Ativo	18,330	0,080	14,564	6,827	0,200	72,578
		Inativo	20,267	0,079	15,921	6,733	0,180	51,111

experimento manteve-se a umidade dos vasos a 80% do poder de embebição, sendo que, uma vez por semana, adicionou-se 100ml da solução de nutrientes. Após 49 dias da germinação cortou-se as plantas rente ao solo de cada vaso, procedeu-se à lavagem com água e secagem até peso constante entre 60-70°C em estufa com circulação forçada de ar. Ao mesmo tempo colheu-se também o sistema radicular das plantas de cada vaso, tendo usado peneira e jatos de água de torneira. Separou-se amostra de raiz suficiente para os estudos de micorriza, anotando-se o peso fresco de cada amostra. O restante foi lavado cuidadosamente, inclusive com HCl diluído, anotando-se o peso fresco e depois, secou-se até peso constante entre 60-70°C em estufa com circulação forçada de ar.

Além da produção de matéria seca da parte aérea e radicular foi procedida a avaliação da frequência de infecção micorrízica usando-se a mesma metodologia empregada para avaliar as infecções nos inóculos. Determinou-se o teor de fósforo na parte aérea e

radicular das plantas, segundo metodologia de Sarruge e Haag (1974). Através de análises de variância, teste Tukey e de correlação dos dados obtidos foram estudados os efeitos dos tratamentos.

Resultados e Discussão

Na Tabela 1 são apresentados os resultados obtidos para produção de matéria seca (g/vaso), teor de P e P extraído (mg/vaso) da parte aérea. Quanto à parte radicular, são apresentados os dados de matéria seca (g/vaso), teor de P e infecção micorrízica (% MVA). Não foi calculada a quantidade de P contida nas raízes em função das dificuldades que se teve para separá-las do solo, havendo perdas não quantificáveis das mesmas.

Para avaliar o efeito dos tratamentos (fósforo e inóculo) e suas interações, procedeu-se análises de variância dos dados relativos a matéria seca e P extraído da parte aérea e, na parte radicular, dos de % MVA (Tabela 2). Verifica-se na referida Tabela que os

Tabela 2 - Valores de F e coeficiente de variação obtidos na análise da variância.

Símbolos: * = Significativo a 5% de probabilidade; ** = Significativo a 1% de probabilidade; ns = Não significativo.

	Materia seca	P extraído	% VAM
Fuentes de fósforo (P)	576,10**	477,50**	0,91ns
Tipo de inóculo (I)	3,76	4,55*	2,36ns
Atividade (A)	1,18ns	7,17*	15,39**
P x I	2,89*	14,43**	2,43ns
P x A	2,96ns	4,97*	0,38ns
I x A	7,42**	9,45**	0,35ns
P x I x A	0,73ns	1,28ns	0,47ns
Coefficiente de Variação (%)	4,22	9,02	13,09

coeficientes de variações no geral podem ser considerados bons, o que é uma consequência não só do tipo de amostragem quanto da técnica de detecção do fungo.

Em vista das significâncias observadas quanto a matéria seca e P extraído procedeu-se ao estudo dos desdobramentos dos graus de liberdade das interações: adubação fosfatada versus tipo de inóculo (PxI), adubação fosfatada versus atividade (PxA) e tipo de inóculo versus atividade (IxA), com os resultados apresentados na Tabela 3.

Na Tabela 2 está caracterizado que a inoculação afeta significativamente a infecção micorrízica e que não houve efeito dos tipos de inóculos (raízes de *P. notatum* F., de *O. sativa* L. e de *Z. mays* L.) ou de adubação na mesma. Com desdobramento dos graus de liberdade da interação PxI, verifica-se que para matéria seca houve diferença significativa entre P adicionado na forma de superfosfato triplo ($\text{dms} = 1,62$) em relação a P na forma de fosfato natural e a testemunha (sem adição de P), não havendo diferença entre estes dois últimos. Esses resultados indicam que efetivamente o inóculo *P. notatum* L. aumenta o aproveitamento do nutriente disponível. Nesse sentido, embora os níveis de infecção por fungos MVA tenham sido semelhantes nas raízes das plantas doadoras, as de *P. notatum* F. poderiam estar colonizadas com maior frequência, por algum endofito mais efetivo para o milho. Segundo Abbott & Robson (1982), existem variações na efetividade entre fungos de diferentes gêneros e de espécies dentro de um

Tabela 3 - Valores de F obtidos no desdobramento dos graus de liberdade das interações significativas.

Símbolos: * = Significativo a 5% de probabilidade; ** = Significativo a 1% de probabilidade; ns = Não significativo.

	Materia seca	P extraído	% VAM
Idf ₁	223,80**	239,02**	-
RuI ₂	209,16**	191,29**	-
RuI ₃	149,07**	76,05**	-
IdP ₁	2,07ns	7,89**	-
IdP ₂	1,48ns	1,43ns	-
IdP ₃	6,00**	24,09**	-
RdA ₁	-	258,96**	-
RdA ₂	-	223,51**	-
AdP ₁	-	0,80ns	-
AdP ₂	-	12,14**	-
AdP ₃	-	4,18*	-
IuA ₁	1,97ns	0,97ns	-
IuA ₂	9,21**	13,03**	-
AdI ₁	1,02ns	13,27**	-
AdI ₂	0,78ns	3,93ns	-
AdI ₃	14,21**	8,86**	-

mesmo gênero. Observa-se ainda, que possivelmente, o tempo de contato entre fosfato natural e solo tenha sido insuficiente para aumentar o P solúvel no solo, de forma a provocar aumento na produção de matéria seca em relação à testemunha quando se adicionou fosfato natural. Comparando-se os valores observados da matéria seca e P extraído (Tabela 1), verifica-se que, exceção feita ao inóculo *O. sativa* L., a cada aumento de matéria seca do inóculo inativo para ativo ou vice versa, ocorre concomitante aumento no P extraído. A exceção determinada pelo *O. sativa* quando usado como inoculante, aparentemente é devida a uma redução na absorção de P no tratamento testemunha, que de certa forma, acompanha redução observada para produção de matéria seca. No que se refere à micorriza não existem elementos para justificar tal comportamento, uma vez que não se está observando efeito do tipo de inóculo dentro dos tratamentos testemunha e fosfato natural, havendo apenas dentro do superfosfato triplo, tendo ocorrido redução significativa na extração de P quando de usou o *Z. mays* L. como

inoculante.

Ainda, dentro das Tabelas 2 e 3, verifica-se que para a interação PxA houve significância apenas para P extraído, ocorrendo uma redução significativa na quantidade de P extraído quando na presença de inóculo ativo nos tratamentos que receberam fosfato natural ou superfosfato triplo. Ao se considerar a interação Ix A, verifica-se que houve efeito significativo tanto para produção de matéria seca quanto para P extraído. Como característica comum está o fato de que no tratamento inativo não houve efeito do tipo de inóculo enquanto que no ativo, o que, em linhas gerais, levou a maior produção e extração foi o inóculo *P. notatum* F.

Ao se proceder à análise de correlação linear entre os dados de matéria seca e de P extraído, matéria seca e % MVA e P extraído e % MVA encontrou-se respectivamente os valores 0,943; 0,059 e 0,046, não havendo portanto correlação entre MS e % MVA e P extraído e % MVA.

No geral, consegue-se que o inóculo de *P. notatum* F., aumenta o aproveitamento do fosfato solúvel presente no solo, sendo o inóculo mais promissor entre os estudados. Conclue-se ainda que a técnica de inoculação testada, isto é, a adição de "cama" de fragmentos de raízes logo abaixo da linha de deposição das sementes é adequada.

Summary

Effect of inocula of vesicular arbuscular Mycorrhiza obtained from distinct plants on corn

Three sources of inocula of VAM (*Paspalum notatum* Flugge, *Oryza sativa* Lineu and *Zea mays* Lineu) were studied with respect to their effectiveness and method of application on a bed of fresh roots's bits infected with VAM were applied under the seed of *Zea mays* L. Favorable results were obtained with this method. The inoculum obtained from *P. notatum* F. has shown better results than other plants used to produce inocula. The use of two sources of phosphorus showed that *P. notatum* inoculum enhanced the plants capacity in

absorbing available phosphorus rather than solubilizing insoluble phosphate.

Referências

- Abbott, L.K. & Robson, A.D. - The role of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in agriculture and selection of fungi for inoculation. *Aust. J. Agr. Res.*, 33:389-408, 1982.
- Crush, J.R. - The effect of *Rhizophagus tenuis* mycorrhizas on ryegrass, cocksfoot and sweet vernal. *New Phytol.*, 72:965-973, 1973.
- Giovannetti, M. & Mosse, B. - An evolution of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.*, 84:489-500, 1980.
- Hayman, D.S. - Endomycorrhizal. In: Y.R. Dommergues & S.V., Krupa - Interactions between non-pathogenic soil microorganisms and plants. Amsterdam, Elsevier, 1978. p.401-442.
- Hayman, D.S. & Mosse, B. - Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. I. Growth of Endogone-inoculated plants in phosphate-deficient soils. *New Phytol.*, 70:19-27, 1971.
- Hayman, D.S. & Mosse, B. - Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. III. Increased uptake of labile P from soil. *New Phytol.*, 71:41-47, 1972.
- Mosse, B. & Hayman, D.S. - Plant growth response to vesicular-arbuscular mycorrhiza. II. In unsterilized fields soils. *New Phytol.*, 70:29-34, 1971.
- Mosse, B. & Hayman, D.S. & Arnold, D.J. - Plant growth response to vesicular-arbuscular mycorrhiza: V. Phosphate uptake by three plant species from P-deficient soils labelled with ³²P. *New Phytol.*, 72:809-815, 1973.
- Mosse, B.; Hayman, D.S. & Ide, G.J. - Growth responses of plant in unsterilized soil to inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Nature*, 224:1031-1032, 1969.
- NYE, P.B. - The rate-limiting step in plant nutrient absorption from soil. *Soil Sci.*, 123:229-297, 1977.
- Phillips, J.M. & Hayman, D.S. - Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection.

- Trans. Br. Mycol. Soc., 55:158-161,
1970.
12. Powell, C.L. - Inoculation of white
clover and ryegrass seed with
mycorrhizal fungi. New Phytol.,
83:81-85, 1979.
13. Raij, B. van & Quaggio, J.A. -
Métodos de análise de solo para
fins de fertilidade. Instituto
Agronômico, Campinas, 1983. 31p.
(Boletim técnico, 81).
14. Ross, J.P. - Effect of phosphate
fertilization on yield of
mycorrhizal and non-mycorrhizal
soybeans. Phytopathol.,
61:1400-1403, 1971.
15. Ross, J.P. & Gilliam, J.W. - Effect
of *Endogone* mycorrhiza on
phosphorus uptake by soybeans from
inorganic phosphates. Soil Sci.
Soc. Am. Proc., 37:237-239, 1973.
16. Sarruge, J.R. & Haag, H.P. -
Análises químicas em plantas.
Piracicaba, Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", 56p.
(mimeografado), 1974.
17. Smith, D.C. - Symbiosis in the
microbial world. In. J.R. Norris &
M.H. Richmond. Essays in
microbiology. Chichester, John
Wiley, 1978. p.15/2 - 15/32.
18. Waugh, D.L. & Fitts, J.W. - Estudos
para interpretação de análises de
solo de laboratório e em vasos.
Raleigh International Soil Testing.
1966. 33p. (Boletim Técnico nº 3).

Recebido para publicação em 1/06/88

"TINEA CAPITIS" POR TRICHOPHYTON VERRUCOSUM - RELATO DE UM CASO

Maria do Rosário Rodrigues Silva
 Simone de Paula e Silva
 Dinazaide de Faria C. Duarte Moraes
 Orionalda de Fátima Lisboa Fernandes

Deptº de Microbiologia
 Seção de Micologia
 Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
 Universidade Federal de Goiás
 Rua Olinda Rezende, s/nº - Setor Universitário
 Caixa Postal 131
 74210 Goiânia GO

Resumo

É descrito um caso de tinea do couro cabeludo por *Trichophyton verrucosum*, em menina de 11 anos. Essa localização do dermatófito é considerada relativamente rara em nosso meio. O tratamento com griseofulvina mostrou-se eficaz.

Introdução

Trichophyton verrucosum produz lesões inflamatórias, supurativas no couro cabeludo denominadas kerion (3, 5).

Trabalhos descritos, no Brasil, não citam *T. verrucosum* como agente comum de tinea capititis (2, 5). A rara ocorrência deste fungo observada em nosso meio, foi o motivo do relato do caso.

Caso clínico - N.C.S. sexo feminino, 11 anos, residente em fazenda no município de Porangatu - Go.

As lesões começaram há um ano com a formação de placas eritemato-descamativas localizadas no corpo e face. Após 4 meses, teve inicio uma reação inflamatória e supurativa, com queda de cabelo, no couro cabeludo (Figura 1). As lesões do corpo e face desapareceram com a aplicação tópica de Hebrim (Searle).

O pai da paciente relatou que seu irmão e várias outras crianças da região possuíam lesões semelhantes, mas não chegaram a procurar o especialista, tratando-se provavelmente de microepidemia por *T.*

verrucosum.

Estudo micológico - O exame direto dos pêlos do couro cabeludo com hidróxido de potássio mostrou arthroconídios grandes, tipo ectotrixe (Figura 2). Pêlos retirados do couro cabeludo foram cultivados em agar Sabouraud com cloranfenicol e em agar Mycosel (BBL). Após 25 dias de incubação desenvolveram-se colônias brancas, enruggadas com pregas profundas (Figura 3). Colônias gigantes em agar Sabouraud em placa incubadas durante 15 dias com as mesmas características foram observadas (Figura 4).

Hifas distorcidas e cadeias de clamidoconídios foram visualizadas em preparações microscópicas com lactofenol azul de algodão (Figura 5).

Microcultivo em lâmina, seguindo a técnica de Riddel evidenciou a mesma morfologia.

Os aspectos macro e microscópicos observados são características de *T. verrucosum*.

Tratamento - Foi administrado griseofulvina por via oral numa concentração de 12mg/kg/dia durante 45 dias, tendo início a cicatrização e

repilação no local da lesão do couro cabeludo. A paciente não retornou para controle clínico e micológico. Segundo informações de seu pai, a repilação foi total.

Discussão

O fato da paciente residir em zona rural é considerado de suma importância para a aquisição da micose. Londero & Cols. (6) relataram 29 casos de dermatofitose por *T. verrucosum*, no período compreendido de 1960 a 1969, levantando-se a hipótese de ser o Rio Grande do Sul, zona de indústria leiteira, o estado brasileiro de maior frequência da micose.

Kaplan & Cols. (4) consideram este agente como importante causa de "tinea capititis" supurativa, em indivíduos de zona rural e o principal agente de tinhas do gado bovino, nos Estados Unidos, ocorrendo ocasionalmente em outras espécies animais.

Trabalhos mais recentes não mostram *T. verrucosum* como agente comum de dermatofitose no couro cabeludo (1, 2).

A infecção relatada foi considerada curada com o uso de griseofulvina, cuja eficácia tem sido comprovada para tratamento de "tinea capititis" (3, 7).

Figura 1 - Paciente portador de lesões inflamatórias tipo Kerion Celsi.

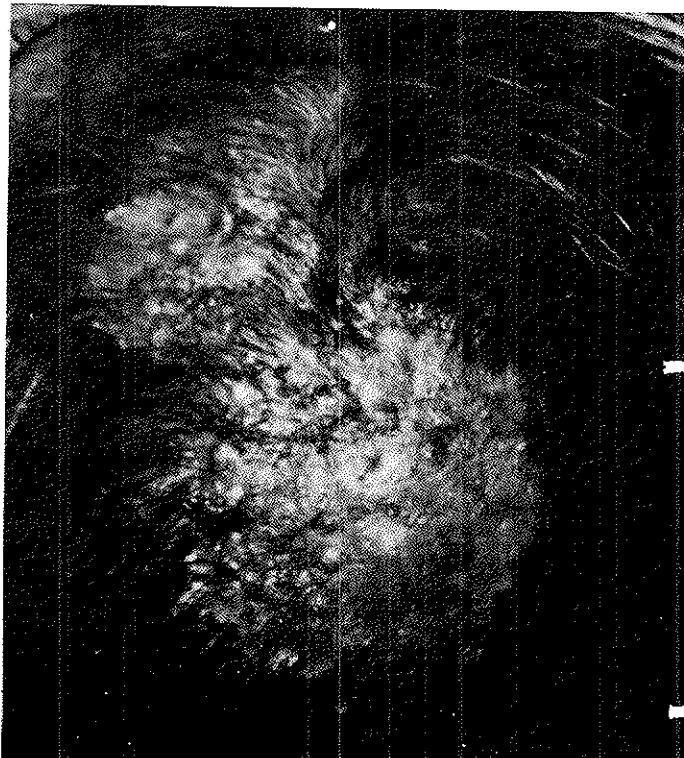
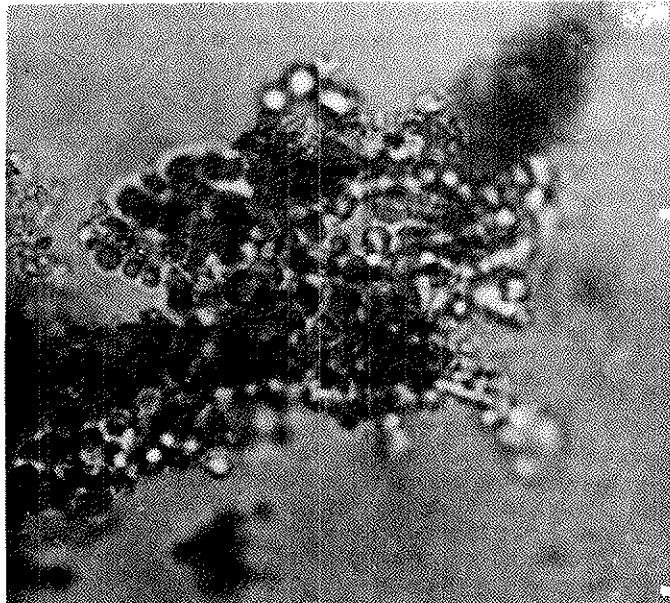


Figura 2 - Pelo parasitado por arthroconídios de dermatófitos.



Summary

"Tinea capititis" by *Trichophyton verrucosum*-Case reported

A case of tinea capititis by *Trichophyton verrucosum* is reported in an eleven years old girl. This localization of the dermatophyte is relatively rare in our population. The treatment with griseofulvin was well successful.

Figura 3 - Colônias pregueadas em ágar Sabouraud de *Trichophyton verrucosum*.

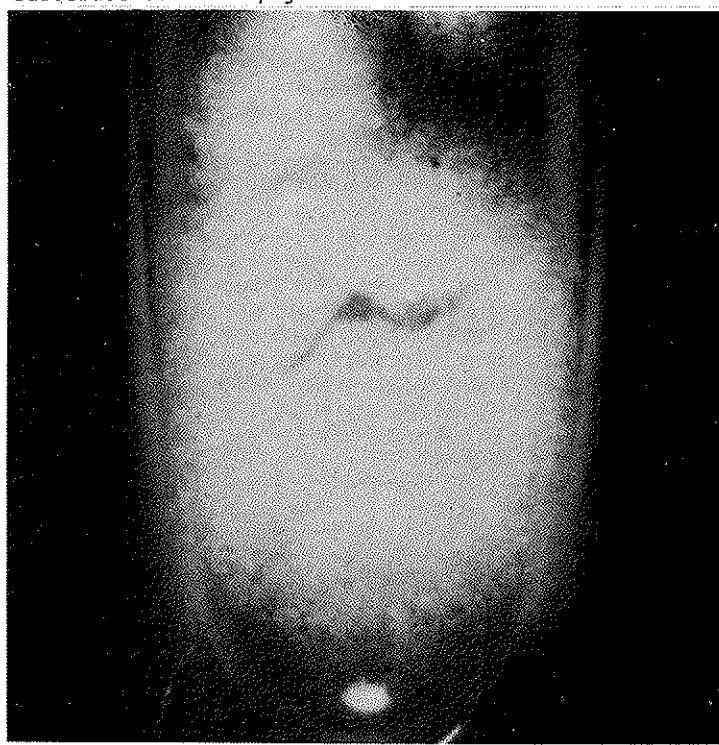


Figura 4 - Colônias gigante em placa de ágar Sabouraud de *Trichophyton verrucosum*.

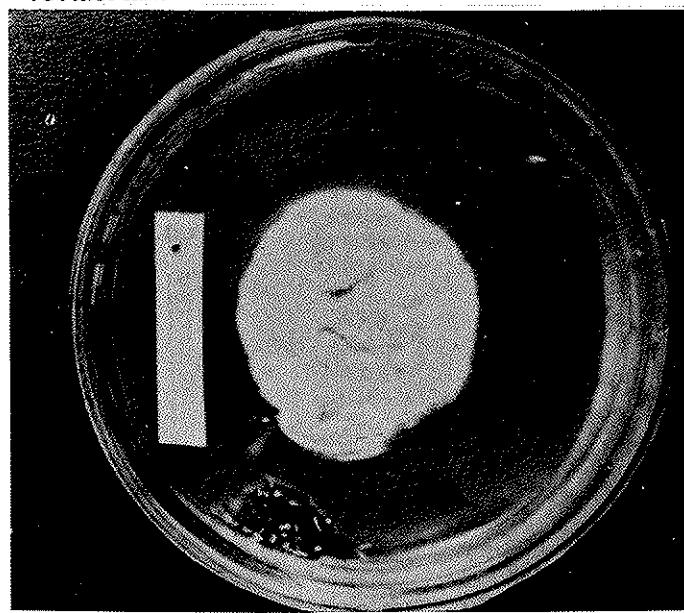


Figura 5 - Aspecto microscópico da colônia de *Trichophyton verrucosum*.



Referências bibliográficas

1. Ali-Shtaych, M.S. & Arda, H.M. - A study of tinea capitis in Jordan. J. Trop. Med. Hyg., 89:137-141, 1986.
2. Furtado, M.S.S.; Ihara, L.T. & Marja, M.F. - Tinea capitis na cidade de Manaus - AM. An. Bras. Dermatol., 60(5):315-318, 1985.
3. Galimberti, R.L.; Negroni, R. & Stringa, O.J. - Tinas de cuero cabelludo tratados com Ketoconazol. Arch. Arg. Dermatol., 22:253-257, 1982.
4. Kaplan, W.; Georg, L.K. & Ajello, L. - Recent developments in animal ringworm and their public health implications. Ann. N.Y. Acad. Sci., 70:639-649, 1958.
5. Londero, A.T.; Ramos, C. & Lauda, P. - Os dermatófitos no interior do Rio Grande do Sul. O Hospital (Rio de Janeiro) 61(1):161-165, 1962.
6. Londero, A.T.; Ramos, C. & Lopes, J.S. - A ten year survey of the cutaneous mycoses in the state of Rio Grande do Sul (Brasil) I. Dermatophytoses. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 12(5):339-342,
- 1970.
7. Vanthaya, N. Gan; Preruska Mary & Ginsburg, C.M. -- Epidemiology and treatment of tinea capitis. Ketoconazole as griseofulvin. The Ped. Inf. Dis. J., 6:46-49, 1987.

Recebido para publicação em 25/08/88

CULTIVO DE A. NIGER E A. ORYZAE EM VINHAÇA DE MADEIRA PARA A PRODUÇÃO DE BIOMASSA

Dilza Aparecida Nalin
& Choiti Kiyan

Deptº de Bioquímica - UNESP
"Campus" de Rio Claro
Caixa Postal 178
13500 Rio Claro SP, Brasil

Resumo

Foi utilizada vinhaça de madeira para produção de biomassa com a paralela redução do índice poluidor desse resíduo. Foram escolhidos *Aspergillus niger* I.Z.9 e *A. oryzae* I.Z.133. As maiores produções de biomassa, proteína bruta, lipídios totais, fósforo total e redução da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) foram obtidas com *A. oryzae* em meio de vinhaça suplementados com o fertilizante NPK e melaço.

Introdução

O crescente aumento da população mundial e da industrialização exigiram pesquisas de novas fontes energéticas, de suplementos alimentares e do aproveitamento de resíduos gerados.

Em relação à suplementação alimentar, alguns países tem utilizado determinados microrganismos como fonte de proteína, a partir de rejeitos agroindustriais, produzindo em grande escala biomassa ou SCP-Single-Cell Protein (1, 2, 4, 16, 23, 25).

Por outro lado, a crescente demanda de energia associada a grande disponibilidade de celulose tem estimulado estudos e projetos visando a produção de etanol a partir de substratos renováveis.

A produção de álcool a partir de madeira pode-se realizar por processo fermentativo do hidrolisado da mesma, gerando um resíduo denominado vinhaça. Para cada litro de álcool produzido nesse processo são gerados 49 litros de vinhaça (6).

A vinhaça, pela sua riqueza em matéria orgânica, apresenta um elevado índice de DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), exigindo um tratamento para seu descarte em curso d'água.

O objetivo deste trabalho foi verificar a possibilidade do uso da vinhaça de madeira para o desenvolvimento de fungos visando a

produção de biomassa e simultânea redução do índice poluidor desse resíduo.

Material e Métodos

Vinhaça de madeira - Obtida de hidrolisado ácido de eucalipto e fornecida pela Coalbra S.A., Uberlândia, M.G. A vinhaça era esterilizada sob pressão a 120°C, durante 15 minutos.

Microrganismos - Foram utilizados os fungos filamentosos *Aspergillus niger* van Tieghem I.Z.9 e *Aspergillus oryzae* I.Z.133, ambos da coleção do Instituto Zinotécnico "Prof. Jayme Rocha de Almeida" da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, Piracicaba, S.P.

Aspergillus flavus NRRL 3251 - Como fungo controle nos ensaios de aflatoxina, proveniente da Universidade Federal de São Carlos, S.P.

As culturas permaneceram a temperatura ambiente, mantidas por transferências mensais em meio de Borzaní (5% de peptona, 10% de glicose, 3% de extrato de carne, 1,8% de agar, modificado pela adição de 0,003% de rosa bengala, segundo Kiyan (15)).

Suplementação dos meios - Foram utilizados melaço de cana-de-açúcar,

fertilizante NPK (10:10:10) e diversos sais.

Suplementação com NPK e melaço - Foram utilizados 3%, 4% e 5% de solução de NPK e 2,5% de melaço, para o cultivo de *A. niger* e *A. cryzae*.

Suplementação com sais e melaço - Foram usados 1% de um único sal em cada meio, acrescido de 1,25 e 2,5% de melaço, para o cultivo de *A. niger*.

Preparo dos meios de cultivo

1. Preparo da solução de NPK. O fertilizante encontra-se sob a forma de grânulos contendo 10% de nitrogênio, 10% de solução de fósforo solúvel de citrato neutro de amônio hidratado, 10% de K₂O solúvel e 70% de material inerte (calcário).

A solução era preparada tritando-se o fertilizante a seco e a seguir com água. Após autoclavagem (aumento da solubilização dos sais) o sobrenadante era coletado e o precipitado desprezado.

Preparo do inóculo - Foram utilizados frascos Erlenmeyer de 500ml contendo 100ml de vinhaça com 5% de melaço e 5% de esporos (V/V). Preparou-se uma suspensão de 107 esporos/ml com Tween 40 USP a 1%, sendo feita a contagem em câmara de Neubauer. Os cultivos permaneceram em mesa rotativa a 250 rpm e temperatura de 27±2°C, durante 48 horas.

Inoculação nos meios de cultivo - Frascos Erlenmeyer contendo 200ml de meio devidamente suplementados receberam 5% de inóculo ("pelletes") que foi transferido com o uso de uma pipeta de ponta larga.

Processamento da biomassa - O micélio foi separado em papel de filtro Whatman nº 1, por filtração à vácuo e lavado 3 vezes com água destilada. A secagem da biomassa consistiu de uma pré-secagem a 60°C, durante 24 horas, seguida de 105°C, até peso constante.

Os resultados foram submetidos a teste estatístico U de Mann-Whitney (21).

Métodos Analíticos

1. Análise físico-química da vinhaça
 - Sólidos sedimentáveis, totais, minerais e orgânicos (22).
 - pH determinado em potenciômetro. Nitrogênio total, segundo Fontana (9).
 - Açúcares Redutores Totais (ART), segundo Hostettler, Borel & Devel (13).
 - Fósforo total - segundo Fiske & Subbarow (8).
 - Demanda Química de Oxigênio (DQO) e Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) segundo Silva (22).

2. Análise da Biomassa Seca

- Produtividade = $\frac{X_2 - X_1}{t} = \text{g/l.h.}$

sendo: X₁ = Biomassa seca inicial (g/l)
 X₂ = Biomassa seca final (g/l)
 t = tempo de cultivo (h)

- Proteína bruta - obtida a partir do nitrogênio total (11) multiplicando-se pelo fator de conversão 6,25.
- Lipídios totais, segundo Pedersen (19), modificado com um tempo de extração para 6 horas.
- Fósforo total, segundo Fiske & Subbarow (8).
- Detecção de Aflatoxina - Obtida com o cultivo dos fungos em meio sólido de coco (7) sob revelação em luz ultra violeta a 250nm, após 1 e 2 semanas de cultivo.

Resultados e Discussão

Composição físico-química da vinhaça de madeira - É caracterizada como um líquido escuro, ácido e com baixa turbidez, apesar de apresentar partículas grosseiras, as quais rapidamente se precipitam, daí um elevado índice de sólidos sedimentáveis, (Tabela 1). Nota-se que o principal constituinte da vinhaça é a matéria orgânica. Pode-se ressaltar ainda, o elevado teor de ART representados principalmente pela xilose, que representa até 1% dos açúcares dessa vinhaça, Coalbra (4). Por outro lado, apresenta baixo teor de nitrogênio e quantidade ainda menor de fósforo. Essa deficiência exigiu a suplementação dos meios de cultivo.

Produção de Biomassa - A produção máxima

(10,25g/l) foi obtida com *A. oryzae*, em meio enriquecido com 3% de NPK e melaço após 72 horas de cultivo, enquanto o *A. niger*, em condições similares, produziu 8,8g/l de biomassa (Figura 1) e, em meios suplementados com 1% de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e melaço, produziu (9,95g/l) (Figura 3) equiparando-se a *A. oryzae*.

Estudos prévios demonstraram que o *A. oryzae* em meio suplementado com diversos sais apresentou produção de biomassa inferior a de *A. niger* e, consequentemente, optou-se pelo cultivo deste último, visando viabilizar o processo com o uso mínimo de sais.

A biomassa de *A. niger* em meio suplementado com sais de Cohrane (Figura 3) foi semelhante à obtida em meio com 3% de NPK. Assim aqueles meios contendo 0,48% de sais associados foram ainda superiores a várias suplementações contendo 1% de um sal, tais como: NH_4Cl , MgSO_4 , H_3PO_4 ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Essa superioridade pode ser atribuída ao fósforo, potássio, enxofre, magnésio, nitrogênio, elementos básicos para desenvolvimento fúngico (5). Comparando-se os meios A e B (contendo 1,25 e 2,5% de melaço, respectivamente), acrescidos de diferentes nutrientes encontrou-se um aumento médio de 17,5% na produção de biomassa de *A. niger*.

Verificou-se em estudos preliminares que a produção de biomassa aumentou em cerca de 30% quando se substituiu a inoculação direta de esporos por "pellette". Esse aumento era esperado uma vez que se suprime a fase de germinação dos esporos (normalmente lenta) e diminui o período de adaptação prévia ao meio de cultivo.

A biomassa obtida com fungos filamentosos foi superior a de *Torula utilis* que produziu em meio de vinhaça de madeira com suplementação de nutrientes aproximadamente 3,0g/l de biomassa, após 18 a 20 horas de cultivo em fermentador (11). Essa mesma levedura produziu 4,0g/l em processo aeróbio contínuo (17).

Produtividade média - A produtividade de *A. oryzae* foi ligeiramente maior que a de *A. niger* em vários meios de cultivo. Estudos paralelos em vinhaça de cana, mostraram que *A. oryzae* foi bastante superior a *A. niger*,

Tabela 1 - Composição Físico-química da vinhaça de madeira.

Símbolos: * = g/l; ** = ml/l.

Pârametros	Médias
* Sólidos totais	17,5
* Sólidos minerais	4,0
* Sólidos orgânicos	13,5
** Sólidos sedimentáveis	11,5
pH	4,5
* ATP	10,4
* Nitrogênio total	0,3
* Fósforo total (P_2O_5)	0,1
* DCO	26,0
* DBO	10,5

apresentando o dobro da produtividade obtida em vinhaça de madeira. Essa vinhaça reduziu e tornou semelhante a produtividade desses fungos, devido à sua composição química conter inibidores de crescimento, como provavelmente o furfural.

Proteína Bruta - O teor proteíco de *A. niger* e *A. oryzae* em meio sem qualquer suplementação foi baixo, por se tratar de um substrato pobre em nitrogênio, elemento essencial na formação das proteínas (5). Assim, meios enriquecidos com 4% de NPK e melaço proporcionaram os maiores teores de proteína (36, 32 e 37,5%) nesses fungos, com decréscimo na produção de biomassa. A produção de proteína bruta foi maior com 48 horas de cultivo e o *A. oryzae* apresentou maiores teores proteicos que o *A. niger*. Esses teores não diferiram estatisticamente somente nos meios de vinhaça pura e com 5% de NPK após 48 horas de cultivo e nos meios com 4% de NPK após 72 horas de cultivo.

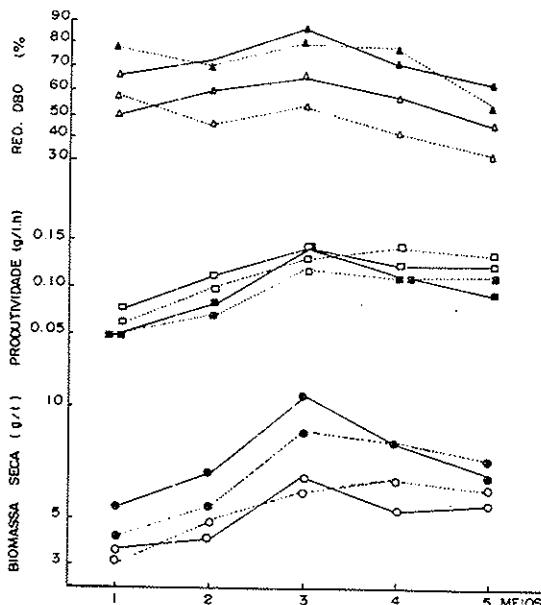
A porcentagem de proteína variou de acordo com o tamanho dos "pelletes" que depende dos nutrientes do meio de cultivo. Os meios contendo NPK, NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ apresentaram "pelletes" pequenos com maior teor proteíco que os maiores obtidos em meios de vinhaça pura ou com melaço. Já foi constatada a importância do controle da morfologia de crescimento para obtenção de proteína (12).

Lipídios totais - As maiores porcentagens de lipídios de *A. niger* e *A. oryzae* (próximo de 20%) foram obtidas

Figura 1 - Biomassa, produtividade e redução da DBO, obtidas com *A. niger* e *A. oryzae* em meios de vinhaça com suplementações de NPK e melaço, após 48 e 72 horas de cultivo.

Símbolos: ○, □, ▽, //, =, Δ = 48 horas; = *A. niger*; ●, ■, ▼, //, —, ▲ = 72 horas; — = *A. oryzae*.

Meios de cultivo: 1. vinhaça pura; 2. vinhaça + 2,5% de melaço; 3. vinhaça + 2,5% de melaço + 3% de NPK; 4. vinhaça + 2,5% de melaço + 4% de NPK; 5. vinhaça + 2,5% de melaço + 5% de NPK.



em meios sem qualquer suplementação. Esses meios proporcionaram uma reduzida taxa de crescimento o que induz a um maior acúmulo de lipídios (26). Além disso, o baixo teor de nitrogênio da vinhaça lhe confere uma alta relação de C:N, que é considerada em muitos casos, como um pré-requisito para a produção de lipídios (5, 26). A presença de xilose pode também ter estimulado essa produção (10).

A máxima produção de lipídios (22,82%) foi obtida com *A. oryzae* em meio contendo 3% de NPK e melaço, o que representaria 2,34g/l de lipídios totais, que poderiam ser explorados

comercialmente, pois a maioria dos fungos filamentosos são ricos em esteróis que podem ser úteis na indústria farmacêutica de ergosterol ou como precursores de outros insumos importantes (18).

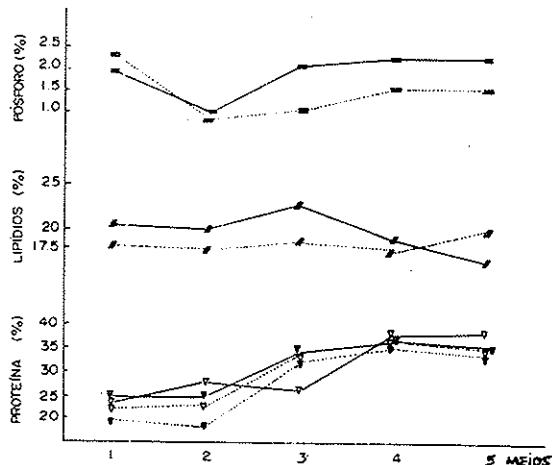
Fósforo total - Pouco tem sido estudado sobre o fósforo em fungos filamentosos, mas sabe-se que no fosfato orgânico dos micélios fúngicos incluem-se ortofosfatos e fosfatos orgânicos condensados (5).

O teor máximo de fósforo total (2,3%, ou seja, 5,27% de P₂O₅) foi obtido com *A. niger* em meio de vinhaça pura, no qual a produção de biomassa foi

Figura 2 - Proteína bruta, lípidos e fósforo totais de *A. niger* e *A. oryzae* em meios de vinhaça com suplementação de NPK e melaço após 48 e 72 horas de cultivo.

Símbolos: O, □, ▽, //, =, Δ = 48 horas; = *A. niger*; ●, ■, ▼, //, -, ▲ = 72 horas; — = *A. oryzae*.

Meios de cultivo: 1. vinhaça pura; 2. vinhaça + 2,5% de melaço; 3. vinhaça + 2,5% de melaço + 3% de NPK; 4. vinhaça + 2,5% de melaço + 4% de NPK; 5. vinhaça + 2,5% de melaço + 5% de NPK.



reduzida. A suplementação com $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ proporcionou o maior teor de fósforo (2,8%) no micélio de *A. niger*. Em *A. oryzae*, a variação do teor de fósforo foi ao redor de 2% decaindo apenas em meio de vinhaça com melaço.

Detectação da presença de aflatoxina - De acordo com os testes realizados, *A. niger* I.Z.9 a *A. oryzae* I.Z.133 não apresentaram sinais de produção de aflatoxina, ou seja, fluorescência sob luz ultra violeta, ao contrário do *A. flavus*. Já foi constatado que algumas linhagens de *A. niger* e *A. oryzae* produzem aflatoxina (2).

Redução da DBO - Foi proporcional ao tempo de cultivo do *A. niger* e *A. oryzal* nos meios de vinhaça.

O meio de vinhaça com 3% de NPK e melaço proporcionou a maior redução da DBO efetuada pelo *A. niger* (80%) e *A.*

oryzae (85%) em consequência da maior produção de biomassa. Assim, a adição de nutrientes ao meio, numa porcentagem adequada, otimiza a produção de biomassa de tal forma que conduz à uma maior redução final da DBO. Por outro lado, quando se deseja somente a despoluição biológica, sem aproveitamento da biomassa, a suplementação do meio torna-se desnecessária, como no caso do *A. niger*.

A bioconversão obtida com esses fungos filamentosos (na faixa de 80-85%) foi bastante superior à obtida com leveduras. Em meios similares, *Torula utilis* reduziu em 36% a DBO (17) e outra linhagem dessa levedura reduziu de 25 a 30% a DBO (20).

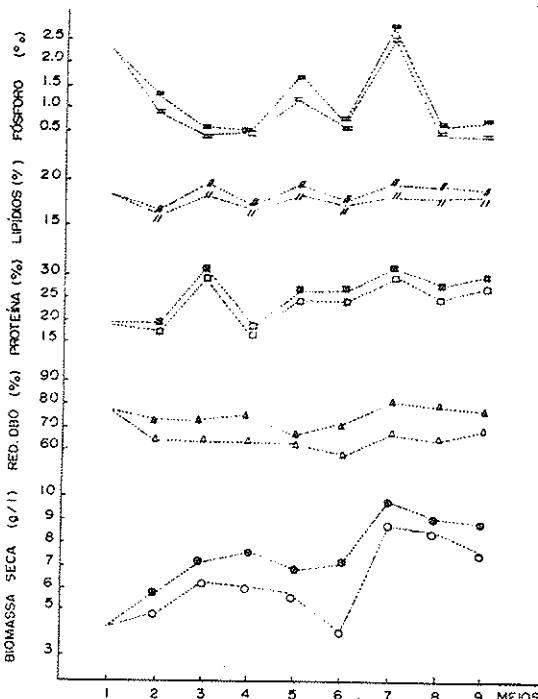
Summary

Cultivation of A. niger and A. oryzae on wood vinasse for biomass production

Figura 3 - Biomassa, redução da BBO, proteína, lípidos e fósforo totais de *A. niger* em meios de vinhaça suplementados, após 72 horas de cultivo.

Símbolos: O, □, //, Δ, = = 1,25% de melaço; ●, ■, //, ▲, - - = 2,5% de melaço; = *A. niger*.

Meios de cultivo: 1. vinhaça pura; 2. vinhaça + melaço; 3. vinhaça + melaço + NH₄Cl; 4. vinhaça + melaço + MgSO₄; 5. vinhaça + melaço + H₃PO₄; 6. vinhaça + melaço + (NH₄)₂SO₄; 7. vinhaça + melaço + (NH₄)₂HPO₄; 8. vinhaça + melaço + NH₄OH; 9. vinhaça + melaço + MgSO₄(0,75g/l) + (NH₄)₂SO₄ (2,0g/l) + K₂HPO₄ (1,5g/l).



Wood vinasse was used for biomass production, with the simultaneous reduction of pollutant capability of this residue. *Aspergillus niger* I.Z.9 and *Aspergillus oryzae* I.Z.133 were chosen. The greatest productions of biomass, crude protein, total lipids, total phosphorus and BOD (Biochemical Oxygen Demand) reduction were obtained with *A. oryzae* on vinasse media supplemented with fertilizer NPK and sugar cane molasses.

Referências Bibliográficas

1. Araújo Neto, J.S. & Pinto, G.F. - Nucleic acid an single-cell protein utilization in human feeding: a Review. Archivos Latinoam de Nutricion. 25(20):105-18, 1975.
2. Camargo, R. - Proteínas de Microrganismos: "substratos e microrganismos. In: Tecnologia dos Produtos agropecuários Alimentos. Camargo, R.; Fonseca, H.; Graner, M.;

- Prado Filho, L.G. do; Caruso, J.G.B.; Andrade, M.O. de; Nogueira, J.N.; Cantarelli, P.R.; Lima, U.A.; Oliveira, A.J. & Moreira, L.S. Livraria Nobel, São Paulo, 1984, p.285-98.
- 3.Chastukin, V.L.; Goncharova, L.A. & Golubchina, R.N. - Mass cultures of mycelial fungi for producing fodder proteins, Mikro. 361-66, 1957.
- 4.Coalbra - Coque a alcool de madeira S.A. Cardenos Coalbra 1 - Produção de Etanol de Madeira. Brasília, 1983, p.118.
- 5.Cochrane, V.W. - The composition of fungus cells inorganis. In: Physiology of Fungi. New York, John Wiley & Sons, 1958. v.1, chapter 2, pp.35-54.
- 6.Cunha, V.C.S.S. - Reciclo de Vinhoto na produção de etanol de materiais ligno-celulósicos. Informativo do INT, 15(30)24-8, set/dez. 1982.
- 7.Davis, N.D.; Iyer, S.K. & Diener, U.L. - Improved method of screening for aflatoxin with a coconut agar medium. Applied and Environmental microbiology, 1593-5, july, 1987.
- 8.Fiske, C.H. & Subbarow, Y. - The determination of phosphorus. J. Biol. Chem., 50:375-85, 1925.
- 9.Fontana, P. - Considerações sobre a dosagem de nitrogênio pelo método kjeldahl. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 51:277-88, 1953.
- 10.Garrido, J.K. & Walker, T.K. - Mycological formation of fat II Synthesis of fat from various carbohydrates in surface cultures of *Aspergillus nidulans*, *Penicillium javanicum*, *P. spinulosum* and the synthesis of fat from glucose. Journal of the Science of Food and Agr., 7:233-7, 1956.
- 11.Harris, E.E.; Salman, J.F.; Marquardt, R.R.; Hannan, M.L. & Rogers, S.C. - Fodder yeast from wood hydrolyzates and still residues. Industrial and Engineering Chemistry, 40(7):220-3, 1948.
- 12.Hofsten, B.V. & Ryden, A. - Submerged cultivation of a thermotolerant basidiomycete on cereal flours and other substrates. Biotech. and bioeng., 7:1183-97, 1975.
- 13.Hostettler, F.; Borel, E. & Devel, H. - Chim Acta, 34:2132, 1951. In: H.V. Bergmeyer and K Gawehn (Eds) Methods of Enzymatic Analysis, Academic Press, New York, vol.2, p.885, 1972.
- 14.Killberg, R. - The microbe as a source food, Ann. Rev. microbiol., 26:427-66, 1972.
- 15.Kiyan, C. - Contribuição ao conhecimento do fungo marron isolado de ninhos de formigas cortadeira do gênero Atta. Fac. de Filosofia, Ciências e Letras de Rio Claro, 1973, 110p. Tese (Dout).
- 16.Litchfield, J.H. Single-cell Proteins. Science, 219:740-6, feb. 1983.
- 17.MIC/STI - Resíduos e subprodutos dos processos. In: Estado da arte da produção de etanol a partir de madeira. Coletânea Tecnologia da produção de etanol a partir de materiais celulósicos. Brasília, 1981, v.1, cap. 7, p.74-84.
- 18.Monteiro, R.T.R. & Hunter, M.I.S. - Lipid class composition of *Aspergillus nidulans*. Rev. Microbiol., São Paulo, 17(2):99-101, abr./jun., 1986.
- 19.Pedersen, T.A. - Lipid formation in *Cryptococcus terriculus* III Extraction and purification of lipids. Acta Chem Scand, 16:374-84, 1962.
- 20.Serra, G.E. & Viotti, A.V. - Tratamento e Aproveitamento de resíduos líquidos. In: Tecnologia de Hidrolise Ácida da madeira para produção de etanol e sub-produtos. Coalbra S.A., Brasília, 1982. cap.9, p.81.
- 21.Siegel, S. - A prova U de Mann-Whitney - : Estatística não paramétrica: para ciência do comportamento. Trad. A. Alves de Farias, MacGraw Hill, São Paulo, 1975, p.130-45.
- 22.Silva, M.O.S.A. - Análise Físico-química para controle das estações de tratamento de esgoto. CETESB, São Paulo, 1977, 225p.
- 23.Snider, H.E. - Microbial sources of protein. Adv. Food Res., 18:85-140, 1970.
- 24.Souza, P.R. & Serra, G.E. - Alcool de madeira: perspectivas no Brasil. Alcool e Açúcar, 1:40-2, nov. 1981.
- 25.Tuse, D. - Single-cell protein: Current status an future prospects. Rev. Foo Sci. Nutr., 19(4), 273-326, 1984.
- 26.Weete, J.D. - Fungal lipid biochemistry total lipids. Plenum Press. New York & London, 1974, 558pp.

Recebido para publicação em 1/09/88

EFFECT OF VARIOUS CONDITIONS ON THE *CHRYSONILIA SITOPHILA* "TFB 27441" GROWTH

André Ferraz
 & Nelson Durán

Instituto de Química
 Biological Chemistry Laboratory
 Universidade Estadual de Campinas
 Caixa Postal 6154
 13081 Campinas SP, Brasil

Resumo

Efeito de várias condições no crescimento de Chrysonilia sitophila "TFB 27441"

Foram estudados os efeitos de diferentes condições de crescimento sobre o fungo celulolítico e ligninolítico *Chrysonilia sitophila* "TFB 27441", utilizando celulose como única fonte de carbono no meio de cultura. Foi aplicado o método do tubo horizontal, no qual o avanço da fronteira micelial da cultura sobre um meio sólido apropriado é medido contra o tempo. Este método mostrou uma resposta linear entre 20 e 150 horas de crescimento. Condições ótimas de crescimento foram obtidas utilizando meio de Fries-celulose em pH 6,0 a 28°C e numa concentração de nitrogênio de 50 mEq N/l. Foi observado crescimento em níveis constitutivos de nitrogênio, assim como mudança desprezível no crescimento na presença de biotina. Culturas agitadas e semi-sólidas utilizando α-celulose como única fonte de carbono mostraram cerca de 6% de proteína no resíduo seco após 8 dias de crescimento.

Introduction

Rapid increases in the world-wide population and higher quantities of lignocellulosic materials in the world are problems constantly reported (1, 3, 12). Utilization of lignocellulosic materials as a renewable carbon source for single-cell protein production has been extensively studied. However, few lignocellulolytic microorganisms have been utilized in the direct production of single-cell protein, since the protein contents of the cellulolytic microorganisms are generally low (13).

Chrysonilia sitophila "TFB 27441" strains is a teleomorphic state of *Neurospora sitophila* (2) which exhibits high protein content, cellulolytic and high ligninolytic activities (4). Applications of this ascomycete has been reported on studies of single cell protein production from pre-treated rice hull

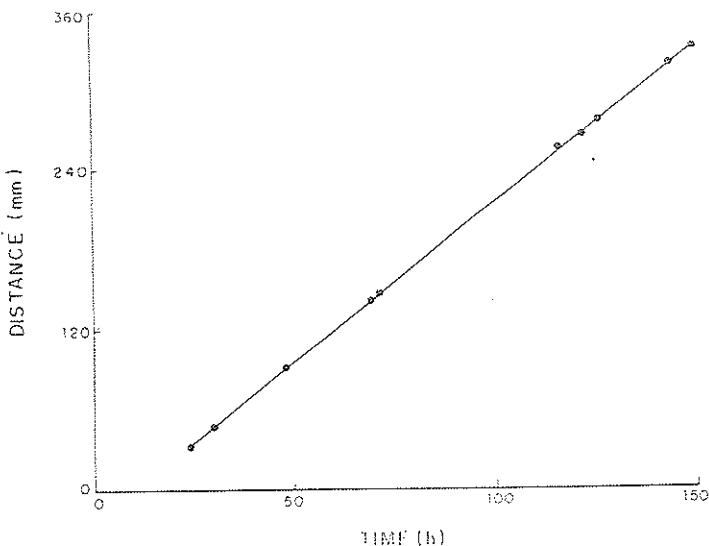
and photochemical pre-treated cellulose (5). Different strains of *Neurospora sitophila* (NRRL 2884 and ATCC 14151) have been utilized in production of indonesia "ontjon" for human food (7, 10).

This work proposes an elucidation of principal parameters that influence the growth of *C. sitophila* "TFB 27441" using cellulose as carbon source and applying the horizontal growth method (tube method) (11).

Material and Methods

Fungus - *Chrysonilia sitophila* "TFB 27441" strain was isolated from xylophagous insect *Tribolium ferrugineum* as previously described (22). Stock cultures were maintained in Fries-sucrose modified medium at 5°C (11).

Figure 1 - Mycelial frontier advancement of *C. sitophila* "TFB 27441" strain versus time, using a Fries-cellulose modified medium at 37°C and pH 5.6, in a 40cm horizontal tube.



Horizontal growth method (tube method)

- Standard tubes were adapted and made with 40cm of lengths, 11mm of internal bore diameter, with terminal segments bent up at an angle of 45°C and stopped with cotton at the end of the tubes. Culture medium and tubes were sterilized separately at 121°C for 15 minutes; then 10ml of medium were added to each tube and allowed to stand at room temperature overnight. Inoculum was applied to the terminal tube. The advancement in mycelial frontier (distance from the application point) was measured at convenient intervals of time, and a linear response was obtained. The slope of the curve was denominated as the rate of growth and expressed in millimeters per hour. All the experiments were made by this method (except for cases specifically mentioned) in triplicate. Standard deviations were calculated for each case (see text values and figures).

Fries modified medium - This culture medium was adapted from Ryan & Col. (11): $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ (ammonium tartrate)

5.0g/l, NH_4NO_3 1.0g/l, KH_2PO_4 1.0g/l, MgSO_4 0.5g/l, NaCl 0.1g/l, CaCl_2 0.1g/l, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.10mg/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.20mg/l, MnSO_4 0.02mg/l, ZnCl_2 0.15mg/l, α -cellulose SIGMA 15g/l and agar 15g/l.

Czaapeck modified medium - NaNO_3 3.0g/l, K_2HPO_4 1.0g/l, MgSO_4 0.5g/l, KCl 0.5g/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g/l, α -cellulose SIGMA 15g/l and agar 15g/l.

Minimal medium with NO_3^- - KH_2PO_4 1.0g/l, MgSO_4 0.5g/l, CaCl_2 0.1g/l, NaCl 0.1g/l, NaNO_3 3.0g/l, α -cellulose SIGMA 15g/l and agar 15g/l.

Minimal medium with NH_4^+ - The same conditions as in minimal medium with NO_3^- , but $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ 3.25g/l as the single nitrogen source.

Effect of temperature, pH, tartrate ions, compositions salts and nitrogen concentration - Fries modified medium was adequately altered in each case, inoculated and incubated in microbiological incubator (for details see figure legends).

Growth in stationary, agitated liquid culture and semi-solid culture - Stationary liquid cultures were made in 125ml Erlenmeyer with 300mg of α -cellulose and 20ml of medium culture (Fries modified buffer biphthalate 0.05M pH 6.0 medium) and later inoculated with fungi (a homogeneous inoculum was used for all the cases). The flaks were incubated at 28°C and the experiments were made in triplicate.

Agitated liquid cultures were made as described for stationary liquid culture, but incubated at 80 rpm and 28°C (New Brunswick Scientific Co.).

Semi-solid cultures were made in 125ml Erlenmeyer with 300mg of α -cellulose and 5ml of medium culture (Fries modified buffer biphthalate 0.05M pH 6.0 medium) later inoculated with fungi and incubated at 28°C. All the experiments were followed by measurements of protein content in dry residue (after extraction with NaOH 1.0M at 100°C for 10 minutes) by the Biuret method (9).

Results and Discussion

Linearity on horizontal growth method - Linearity of advancement in mycelial frontier *versus* time in 150 hours of growth at different conditions was observed (as example see Figure 1). An homogeneous mycelium inoculum from stock plates was used for all cases.

The horizontal growth method was applied to the study of culture conditions of the *C. sitophila* "TFB 27441" strain, but it was found that each series of experiments must be simultaneously carried out or at least standard experiments must be made (in this case the Fries modified medium in pH 6.0 was used as a standard). This led us to normalize our results.

Effect of temperature, pH, tartrate ions, composition salts and nitrogen concentration - The results showed that the optimal temperature was 28°C, but fungal growth in the range of 28-37°C was not largely affected (28°C/2.68±0.05; 30°C/2.41±0.06; 35°C/2.44±0.07; 37°C/2.37±0.02mm/h respectively). This is a very interesting result for large scale growth, since no rigid temperature

control is needed.

Ryan & Col. (11) have demonstrated that buffering of medium in the tube method is not needed. Then the optimal pH observed was 6.0 and a narrow range of 5.6 to 6.3 was observed (Figure 2). This is an indication of the necessity of pH control for liquid medium cultures. Biphthalate buffer was useful for this purpose in liquid and semi-solid cultures, showing a narrow pH decrease to 5.7-5.9 in cultures filtrates after 8 days of growth.

Ammonium tartrate salt showed no interference in growth rate as compared to ammonium sulfate salt (2.68±0.04 and 2.67±0.05mm/h respectively), indicating that the *C. sitophila* "TFB 27441" strain did not use this ion as carbon source.

Results on composition salts showed a growth rate in the minimal medium with NO_3^- (2.22±0.05mm/h) and NH_4^+ (2.31±0.24mm/h) indicating that *C. sitophila* "TFB 27441" strain can use NO_3^- or NH_4^+ as nitrogen source. This lead us to use either NO_3^- or NH_4^+ available in a substrate material.

Figure 3 shows that *C. sitophila* "TFB 27441" strain grew in constitutive nitrogen level and exhibited a maximum growth on 50 milliequivalents of nitrogen per liter. Growth in the constitutive nitrogen level is an interesting fact, since ligninase production is stimulated in low nitrogen concentration, e.g. on *Phanerochaete chrysosporium* (8). These results shows that the ascomycete *C. sitophila* "TFB 27441" strain has the ability to recycle its own nitrogen. In the case of Basidiomycetes this behaviour is well known (8). In this curve, it is observed a lower growth in the Fries modified medium than Czapeck medium at same nitrogen concentration (35 mEq N/l).

Effect of biotin - Biotin in the range of 0-30 $\mu\text{g}/\text{l}$ did not show any significant change in the *C. sitophila* "TFB 27441" strain growth. In contrast to the others *Neurospora* specimens reported by Ryan & Col. (11) (e.g. 0.0 $\mu\text{g}/\text{l}$ / 2.68±0.13; 2.0 $\mu\text{g}/\text{l}$ / 2.87±0.14; 4.0 $\mu\text{g}/\text{l}$ / 2.74±0.13; 8.0 $\mu\text{g}/\text{l}$ / 2.82±0.13; 8.0 $\mu\text{g}/\text{l}$ / 2.82±0.10; 30.0 $\mu\text{g}/\text{l}$ / 2.76±0.03mm/h respectively).

Growth in stationary, agitated liquid culture and semi-solid culture - The results are exhibited in Figure 4. Agitation in liquid culture has a larger

Figure 2 - Effect of pH on *C. sitophilae* "TFB 27441" strain growth rate, in Fries-cellulose modified medium at 28°C (adjustments of pH values of 2.7, 3.0 and 4.9 were made after autoclaving).

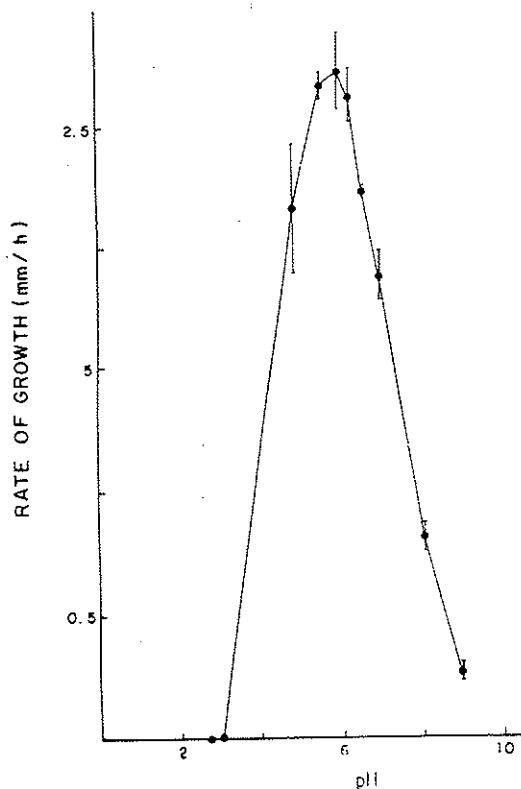


Figure 3 - Effect of nitrogen concentration on *C. sitophilae* "TFB 27441" strain growth rate, in Fries-cellulose modified medium, pH 6.0 at 28°C and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ as single nitrogen source.

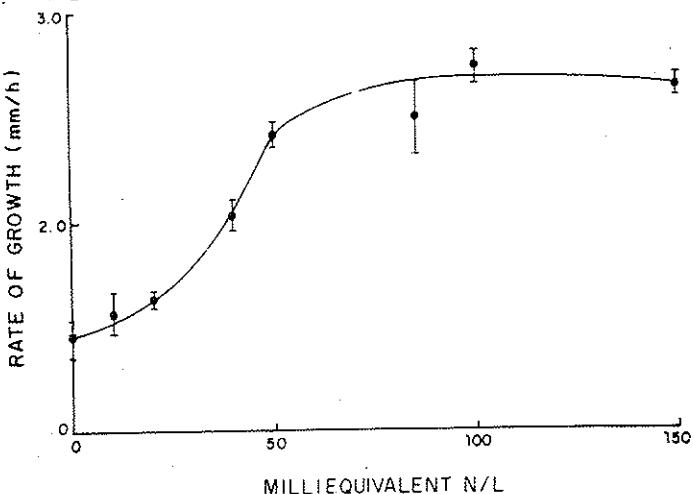
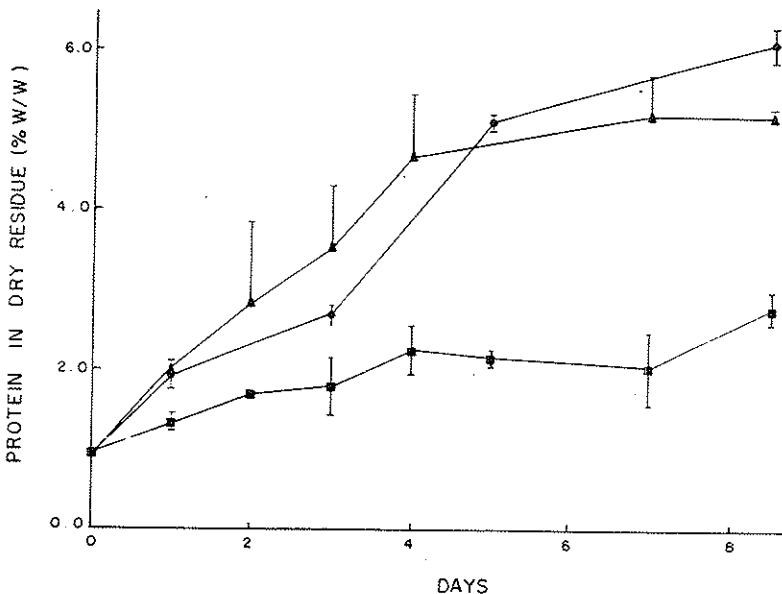


Figure 4 - Growth of *C. sitophila* "TFB 27441" strain in stationary (-■-), agitated liquid cultures (-●-) and semi-solid cultures (-▲-) in Fries-cellulose medium, biphthalate buffer 0,05M at pH 6,0 and 28°C.



effect on *C. sitophila* "TFB 27441" strain growth, than in non agitated conditions (6.1% and 3.2% of protein on the dry residue, respectively). In semi-solid culture, a good protein content on the residue was observed (5.2% of protein on the dry residue). Agitated liquid culture or semi-solid culture conditions for this strain are necessary to obtain large quantities of fungal growth in batch cultures.

The mycelial chemical composition of *C. sitophila* "TFB 27441" as well as single-cell protein production from sugar cane bagasse are in currently advances in our group.

Summary

The effects of different conditions on the growth of a cellulolytic and ligninolytic fungus, *Chrysonilia sitophila* "TFB 27441" strain, using cellulose as single carbon source on culture medium were studied. The horizontal tube method, which relates the advancement of the mycelial frontier culture along the surface of

a suitable solid medium was applied, showing a linear response in 20 to 150 hours of growth. Optimal growth conditions in Fries-cellulose modified medium in pH 6.0 at 28°C and a nitrogen concentration of 50 mEq N/l were observed. Growth in the constitutive nitrogen level and a negligible change in the biotin presence were found. Agitated and semi-solid cultures using α-cellulose as single carbon source showed a 6% of protein production on dry residue, after 8 days of growth.

Acknowledgments

This work was supported by FAPESP, CNPq, FINEP, PADCT Program and OAS Program.

References

1. Anonymous - Costs Probed for Fuel, Feed from Corn Waste. Chem. Eng. News, 63:59-60, 1985.
2. Campos, V.; Salas, E.; Durán, N.; Rodríguez, J. & Baeza, J. - Isolation

- of cellulolytic *Chrysonilia sitophila* from *Tribolium ferrugineum*. Bol. Micol. (Chile), 2:161-165, 1986.
3. Coughlan, M.P. - Cellulases: Production, Properties and Applications. Biochem. Soc. Trans., 13:405-406, 1985.
4. Durán, N.; Rodríguez, J.; Ferraz, A. & Campos, V. - *Chrysonilia sitophila* (TFB 27441): A Hyperlignolytic strain. Biotechnol Lett., 9:357-360, 1987.
5. Durán, N.; Reyes, J.L.; Baeza, J. & Campos, V. - Biomass Photochemistry-XII: Chemical and Photochemical pre-treatment of Rice Hull and its fungal degradation. Biotechnol. Bioeng., 32:564-568, 1988.
6. Durán, N.; Rodríguez, J.; Gómez, E.; Campos, V. & Baeza, J. - Biomass Photochemistry-XI Photochemical Pretreatment of Cellulose and its Fungal Degradation. Biotechnol. Bioeng., 31:215-219, 1988.
7. Fardiaz, D. & Markakis, P. - Oligosaccharides and Protein Efficiency Ratio of Oncom (Fermented Peanut Press Cake). J. Food. Sci., 46:1970-1971, 1981.
8. Leisola, M.S.A. & Fiechter, A. - News Trends in Lignin Biodegradation. Adv. Biotechnol. Process., 5:59-89, 1985.
9. Plummer, D.T. - "An Introduction to Practical Biochemistry" McGraw Hill, London, 1971, p.156.
10. Quinn, M.R.; Beuchat, L.R.; Miller, J.; Young, C.T. & Worthington, R.E. - Fungal Fermentation of Peanut Flour: Effects on Chemical Composition and Nutritive Value. J. Food Sci., 40:470-474, 1975.
11. Ryan, F.J.; Beadle, G.W. & Tatum, E.L. - The Tube Method of Measuring Growth Rate of Neurospora. Amer. J. Bot., 30:784-799, 1943.
12. Shay, L.K. & Wegner, G.H. - Improved Fermentation Process for Producing Torula Yeast. Food Technol., 39:61-67, 1985.
13. Tanaka, M. & Matsuno, R. - Conversion of Lignocellulosic Materials to Single-cell Protein (SCP): Recent Developments and Problems. Enzyme Microbiol. Technol., 7:197-206, 1985.

Recebido para publicação em 5/12/88

CASSAVA RESIDUES INDUCE HIGH PRODUCTION OF CELLULOLYTIC ENZYMES

Gustavo Henrique Goldman

Bolsista da FAPESP

Deptº de Genética - ESALQ USP Piracicaba

Maria Helena P. Fungaro

Deptº de Biologia Geral - Centro de Ciências Biológicas

Universidade Estadual de Londrina PR

Marney Pascoli Cereda

Deptº de Tecnologia dos Produtos Agropecuários

Faculdade de Ciências Agronômicas UNESP Botucatu SP

& João Lúcio de Azevedo

Deptº de Genética - ESALQ USP Piracicaba

Caixa Postal 83

13400 São Paulo SP

Resumo

Resíduos de mandioca induzem uma alta produção de enzimas celulolíticas

O objetivo deste trabalho foi verificar a produção de celulase a partir do uso de dois resíduos de processamento da mandioca (a casca e o farelo). Esta produção foi comparada com a produção em farelo de trigo, um resíduo tradicionalmente usado pelas indústrias na produção de enzimas. Os resultados mostram que a casca de mandioca induziu cerca de 40% maior produção de celulase (FPA) do que o farelo de trigo.

Introduction

Cassava is an important agricultural culture in tropical countries. In Brazil, there are several useful food products derived from cassava, e.g., its flour, starch and fermented starch ("polvilho azedo"). In the process of industrialization of these products, some residues are formed. Cassava factories produce, among others, the following wastes: a liquid one called "manipueira", and two solid, one consisting of cassava peel and another called bran or mass. Several papers have appeared in the literature concerning to the biotechnological utilization of these

residues (1, 2, 5, 7) but until now there is only limited interest in using them as media to induce the production of microbial enzymes. Considering the high ratios of starch and lignocellulose present in these residues, they could be interesting as substrates in the industrial production of amylase and/or cellulase.

The objective of this work was to verify the production of cellulolytic enzymes by two industrial microorganisms in cassava residues (peel and bran). This production of enzymes was compared with a traditional residue used in the industries of enzymes, wheat bran.

Material and Methods

Species - *Trichoderma reesei* QM 9414 and *Aspergillus niger* NRRL-337.

Cultivation on semi-solid medium (8) - Five grams of wheat bran, cassava medium I (a mixture of dry peels), and cassava medium II (peel or bran) plus respectively 5.0 in the first two and 10.0ml in the last one of distilled water were separately mixed and autoclaved at 120°C for 20 minutes in 125ml erlenmeyer flasks. The sterilized media were inoculated each one with one ml of 1.0×10^7 conidia of *T. reesei* or *A. niger* and incubated at 28°C for 5 days. The fungal culture was extracted with 30.0ml of distilled water at 4°C for 4 hs and filtered through gauze in a glass filter.

Enzyme Assay - Filter paper assay (FPA) activity (4) was determined in a tube assay system containing 1.0ml of 0.05M citrate buffer (pH 4.8 and 0.5ml of culture filtrates; 50.0mg of filter paper Whatman number 1 (1 x 6cm strip) was added to this system and it was incubated for hour at 50°C. After this period, 0.5ml of dinitrosalisylic acid (DNS) was added to each tube. Then, after 5 minutes in boiling water 8.0ml of distilled water were added and absorbance read in 540nm according to a glucose standard curve ($r=0.99$). The amount of the enzyme which formed one mg of glucose from the substrate per hour under the assay conditions described above was taken as one unit.

Results and Discussion

Tabel I shows the cellulolytic activity of *T. reesei* and *A. niger* in different media. Both species presented a greater enzymatic activity in cassava medium I than in wheat bran or cassava medium II. *A. niger* showed a better cellulolytic activity in cassava medium II than in wheat bran, while in *T. reesei* the enzymatic activity was better in wheat bran than in cassava medium II. Probably this difference was due to the effect of the content of nitrogen in the media (2.10% dry weight in cassava medium I against 0.24% dry weight in cassava medium II) on the growth and/or cellulase

Table 1 - Cellulolytic activity (FPA)¹ of *T. reesei* and *A. niger* in different media (data are media of three experiments each one with three replicates).

Symbols: ¹ = Activity is expressed in micromoles of reducing sugars per gram of used substrate; ² = Enzymatic activity with the same letter do not differ by the 5% level of Tukey test.

	<i>T. reesei</i> ²	<i>A. niger</i> ²
wheat bran	0.64±0.09 b	0.35±0.01 c
cassava medium I (peel)	1.08±0.14 a	1.03±0.29 a
cassava medium II (bran)	0.12±0.01 c	0.70±0.26 b

production in *T. reesei*.

Our results show that cassava medium I induced about 40% more of cellulase production than wheat bran. This latter residue is routinely used in industries that produce microbial enzymes, also being used in some papers to induce cellulase (3, 6, 9). To our knowledge, this is one of the first reports about a good induction of cellulase by cassava residues. The next objectives of this work will be the variation of the production of each enzyme in the cellulolytic complex, as well, to evaluate the potential of "manipueira" to induce cellulolytic enzymes.

Summary

The objective of this work was to verify the production of cellulolytic enzymes in two industrial cassava residues (peel and bran). This production of enzymes was compared with a traditional residues used in the industries of enzymes, wheat bran. Our results show that peel induced about 40% more of cellulase (FPA) production than wheat bran.

References

1. Akpan, I.; Ikenebomoh, M.J.; OBUEKWE, C.O. - Production of ethanol from cassava whey. *Acta Biotechnologica*, 8:39-46, 1988.
2. Fioretto, A.M.C. & Cereda, M.P. - Cultivo de *Trichosporon* sp. em meio semi-sólido elaborado com resíduos de indústrias de processamento de

- mandioca. Energia, Botucatu, 3:23-31, 1988.
- 3.Goldman, G.H. - Estudos genéticos e produção de celulase em *Aspergillus niger*. Tese de Mestrado, 153p., 1988 - ESALQ - USP.
- 4.Mandels, M.; Andreotti, R.; Roche, C. - Measurement of saccharifying cellulase. Biotechnology and Bioengineering Symposium, 6:21-33, 1976.
- 5.Motta, L.C. - Utilização de resíduos de indústrias de farinha de mandioca em digestão anaeróbia. Tese de Mestrado - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Botucatu, 1985, 119p.
- 6.Sternberg, D.; Vijayakumar, P.; Reese, E.T. - Beta-glucosidases: microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. Canadian Journal of Microbiology, 23:139-47, 1977.
- 7.Takahashi, M.' - Aproveitamento de manipueira e de resíduos do processamento da mandioca. Informe Agropecuário - Belo Horizonte, 13:63-8, 1987.
- 8.Yoshioka, H.; Ankaru, S.I.; Hayashida, S. - Production and purification of a novel type of CMCcase from *Humicola grisea* var *thermoidea* YH-78. Agricultural and Biological Chemistry, 46:75-82, 1982.
- 9.Zhu, Y.S.; Wu, Y.Q.; Chen, W.; Tan, C.; Gao, J.H.; Fei, J.X.; Shih, C.N. - Induction and regulation of cellulase synthesis in *Trichoderma mutants* EA 3 867 and N 2-78. In: Hollaender, A., Ed. Trends in the biology of fermentations for fuels and chemicals. Plenum Press, p.554-5, 1981.

Recebido para publicação em 13/12/88

ATIVIDADE DE DERIVADOS IMIDAZÓLICOS CONTRA ESPÉCIES DE CANDIDA ISOLADAS DE PACIENTES COM CÂNCER

Arlete Emily Cury
 & Marisa Porta Miche

Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP
 Depto de Análises Clínicas e
 Toxicológicas
 Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - B. 17
 Cidade Universitária
 05508 São Paulo SP, Brasil

Resumo

Foram avaliadas as atividades fungicida e fungistática de quatro derivados imidazólicos contra espécies de *Candida*, isoladas de pacientes com câncer e submetidos à quimioterapia ou à radioterapia. Embora a atividade antifúngica desses antibióticos tenha variado conforme a espécie estudada, a 8 μ g/ml o cetoconazol foi o agente inibidor mais efetivo, agindo sobre 90,3% das leveduras, enquanto o clotrimazol foi o menos efetivo, agindo sobre 26,4%. O nitrato de econazol e o nitrato de miconazol foram fungistáticos para, praticamente, a mesma percentagem de leveduras (63,8 e 63,4%, respectivamente), porém, assim como os outros imidazólicos, foram incapazes de exercer ação fungicida contra a maioria delas.

Introdução

Em trabalho anterior verificamos a atividade fungistática e fungicida de antibióticos poliênicos contra espécies de *Candida* isoladas de pacientes com câncer e sob radioterapia ou quimioterapia antineoplásica (2). Dando continuidade a esse tipo de estudo, e com base no conhecimento de que os derivados imidazólicos atualmente desempenham importante papel no tratamento das micoses (6, 7), incluindo prevenção e cura da candidíase em pacientes imunocomprometidos (1), elaboramos o presente trabalho, a fim de avaliar alguns destes agentes frente àquelas leveduras.

Material e Métodos

Derivados imidazólicos - Foram avaliados o cetoconazol e o nitrato de econazol (Aché Laboratórios Farmacêuticos S/A), o clotrimazol (Bayer do Brasil S/A) e o nitrato de miconazol (Johnson & Johnson Indústria

e Comércio S/A), gentilmente fornecidos, sob forma de pó, pelas respectivas indústrias que comercializam o produto.

Leveduras, inóculo e determinação das concentrações inibitória e fungicida mínimas - As amostras de *Candida*, os métodos e os procedimentos empregados neste estudo, foram os mesmos do trabalho previamente realizado com antibióticos poliênicos (2).

Definição de agente efetivo - O agente imidazólico foi considerado efetivo contra a levedura avaliada, quando a concentração inibitória mínima e/ou a concentração fungicida mínima foram $\leq 8\mu$ g/ml.

Resultados

Os resultados da atividade antifúngica dos imidazólicos, avaliados frente a diferentes espécies de *Candida*, isoladas de pacientes com câncer e submetidos a tratamento antineoplásico imunossupressor, encontram-se resumidos nas Tabelas 1 a 4.

Tabela 1 - Sensibilidade de *Candida* ao cetoconazol.

Símbolos: * CIM = Concentração inibitória mínima; CFM = Concentração fungicida mínima.

Levedura (nº de isolamen- tos)		Teste de sensibi- lidade *	Percentagem acumulada de amostras sensíveis à concentração (ug/ml) de:							
			≤0,25	0,5	1	2	4	8	16	≥32
<i>C. albicans</i> (175)	CIM	2,3	3,4	10,4	65,8	92,9	88,6	92,9	100	
	CFM	0	0	0	1,1	5,5	12,5	28,5	100	
<i>C. famata</i> (2)	CIM	0	0	0	100	100	100	100	100	
	CFM	0	0	0	0	0	0	0	100	
<i>C. guilliermondii</i> (6)	CIM	33,3	100	100	100	100	100	100	100	
	CFM	0	0	0	33,3	66,6	66,6	66,6	100	
<i>C. krusei</i> (8)	CIM	25,0	50,0	50,0	75,0	75,0	75,0	100	100	
	CFM	0	25,0	25,0	50,0	50,0	50,0	50,0	100	
<i>C. parapsilosis</i> (12)	CIM	50,0	66,6	83,3	83,3	100	100	100	100	
	CFM	0	0	16,6	16,6	16,6	16,6	33,3	100	
<i>C. pseudotropicalis</i> (6)	CIM	33,3	33,3	33,3	33,3	100	100	100	100	
	CFM	0	0	0	0	0	33,3	100	100	
<i>C. tropicalis</i> (18)	CIM	22,2	33,3	55,5	77,7	88,8	100	100	100	
	CFM	0	0	0	0	11,1	33,3	44,4	100	

Tabela 2 - Sensibilidade de *Candida* ao nitrato de econazol.

Símbolos: * CIM = Concentração inibitória mínima; CFM = Concentração fungicida mínima.

Levedura (nº de isolamen- tos)		Teste de sensibi- lidade *	Percentagem acumulada de amostras sensíveis à con- centração (ug/ml) de:							
			≤0,25	0,5	1	2	4	8	16	≥32
<i>C. albicans</i> (175)	CIM	2,3	12,6	18,3	44,0	49,7	60,0	76,3	100	
	CFM	0	0	0	19,4	26,2	28,5	29,6	100	
<i>C. famata</i> (2)	CIM	0	0	0	100	100	100	100	100	
	CFM	0	0	0	100	100	100	100	100	
<i>C. guilliermondii</i> (6)	CIM	0	100	100	100	100	100	100	100	
	CFM	0	0	0	100	100	100	100	100	
<i>C. krusei</i> (8)	CIM	25,0	50,0	75,0	75,0	100	100	100	100	
	CFM	25,0	25,0	25,0	75,0	75,0	75,0	75,0	100	
<i>C. parapsilosis</i> (12)	CIM	16,6	49,8	49,8	66,4	66,4	66,4	66,4	100	
	CFM	0	0	0	16,6	16,6	16,6	16,6	100	
<i>C. pseudotropicalis</i> (6)	CIM	33,3	73,3	73,3	66,6	66,6	100	100	100	
	CFM	0	0	0	33,3	33,3	33,3	33,3	100	
<i>C. tropicalis</i> (18)	CIM	0	11,1	22,2	33,3	55,5	55,5	77,7	100	
	CFM	0	0	0	11,1	22,2	22,2	33,3	100	

Tabela 3 - Sensibilidade de *Candida* ao nitrato de miconazol.

Símbolos: * CIM = Concentração inibitória mínima; CFM = Concentração fungicida mínima.

Levedura nº de isolamen- tos	Teste de resisti- lidade *	Percentagem acumulada de amostras sensíveis à concentração (ug/ml) de:						
		0,25	0,5	1	2	4	8	16
<i>C. albicans</i> (175)	CIM	4,6	9,2	22,9	45,7	50,3	59,5	93,2
	CFM	0	0	2,3	9,1	15,9	21,6	25,0
<i>C. famata</i> (2)	CIM	0	0	0	0	100	100	100
	CFM	0	0	0	0	0	0	100
<i>C. guilliermondii</i> (6)	CIM	0	0	100	100	100	100	100
	CFM	0	0	0	100	100	100	100
<i>C. krusei</i> (8)	CIM	25,0	25,0	50,0	50,0	50,0	50,0	75,0
	CFM	0	0	0	0	0	25,0	25,0
<i>C. parapsilosis</i> (12)	CIM	16,6	16,6	75,1	75,1	83,4	83,4	100
	CFM	0	0	16,6	16,6	16,6	16,6	49,8
<i>C. pseudotropicalis</i> (6)	CIM	0	33,3	100	100	100	100	100
	CFM	0	0	0	0	33,3	33,3	100
<i>C. tropicalis</i> (18)	CIM	11,1	11,1	33,3	33,3	33,3	66,6	88,8
	CFM	11,1	11,1	11,1	11,1	22,2	33,3	33,3

Tabela 4 - Sensibilidade de *Candida* ao clotrimazol.

Símbolos: * CIM = Concentração inibitória mínima; CFM = Concentração fungicida mínima.

Na concentração de 8 μ g/ml, o cetoconazol inibiu o crescimento da maior parte (90,3%) das leveduras, mas foi letal somente para 17,6%. Entre as espécies isoladas, apenas 20 amostras de *C. albicans* e 2 de *C. krusei* demonstraram resistência à ação inibitória desse imidazólico. Entretanto, com exceção de 66,6% das amostras de *C. guilliermondii* e 50% das de *C. krusei*, a maioria das cepas das diferentes espécies foi resistente à ação letal do cetoconazol (Tabela 1).

O nitrato de econazol e o nitrato de miconazol, em concentrações de 8 μ g/ml, inibiram, praticamente, a mesma percentagem de leveduras (63,8 e 63,4%, respectivamente), porém, o primeiro agente foi letal para 31,7% delas, enquanto o segundo o foi para 24,6%. Tal diferença foi devida a um maior número de amostras de *C. albicans*, *C. famata* e *C. krusei*, sensíveis ao nitrato de econazol (Tabelas 2 e 3).

O clotrimazol foi fungistático para 26,4% das leveduras, que não incluiram as amostras de *C. famata* e *C. krusei*, e fungicida para 0,8%, representados apenas por 2 amostras de *C. albicans* (Tabela 4).

Discussão

Neste estudo, o cetoconazol foi o fungistático mais ativo, agindo contra a maioria das leveduras estudadas, seguindo-se o nitrato de econazol e o nitrato de miconazol. Entretanto, em termos de atividade específica, esses 3 agentes foram potencialmente ativos na inibição do crescimento de *C. famata*, *C. guilliermondii* e *C. pseudotropicalis*. O nitrato de econazol foi também fungicida para *C. famata* e, assim como o nitrato de miconazol e, em menor grau, o cetoconazol, para *C. guilliermondii*. O cetoconazol inibiu a maior parte das amostras de *C. albicans* e todas as amostras de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, porém, como os demais imidazólicos estudados, foi incapaz de exercer ação fungicida contra a maior parte destas leveduras.

O nitrato de econazol e, em menor grau, o cetoconazol e o nitrato de miconazol foram fungistáticos para *C.*

krusei, mas, apenas o primeiro agente foi fungicida para a maioria das amostras desta espécie.

Alguns desses resultados são discordantes dos obtidos nos poucos estudos, até agora realizados, objetivados a avaliar a atividade de alguns derivados imidazólicos contra leveduras isoladas de indivíduos imunocomprometidos.

Para alguns autores, o nitrato de miconazol foi mais efetivo que o cetoconazol na inibição de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, isoladas de pacientes com câncer (5). Para outros, a atividade antifúngica do nitrato de miconazol contra *Candida* só foi verificada em elevadas concentrações deste agente (4).

No presente trabalho, o clotrimazol foi o agente menos efetivo, mostrando-se incapaz de exercer ação antifúngica contra a maioria das leveduras estudadas. Este achado, sob o ponto de vista clínico, pode representar um problema considerável (3) para os que adotam o clotrimazol como a melhor droga para prevenção ou tratamento de candidíase em pacientes imunocomprometidos (1).

Summary

Imidazole antibiotics activities against Candida species recovered from cancer patients

Fungistatic and fungicidal activities of four imidazole agents against *Candida* species recovered from cancer patients receiving radiotherapy or chemotherapy have been studied. Although the antifungal activity has varied according to the studied species, at the concentration of 8 μ g/ml, ketoconazole was the most effective agent, inhibiting 90.3% of all the yeast strains tested, while clotrimazole was the less effective, inhibiting 26.4%. Econazole nitrate and miconazole nitrate have practically the same percentage of yeast inhibition (63.8% and 63.4%, respectively), but, like the other studied imidazoles, were unable to carry out fungicidal activity against the majority of the yeasts.

Referências Bibliográficas

- 1.Bodey, G.P. (ed.) - Proceedings of a symposium: Candidiasis: a growing concern. Amer. J. Med., 77 (Suppl. 4D), 1-48, 1984.
- 2.Cury, A.E.; Miche, M.P. & Minami, P.S. - Leveduras isoladas de pacientes com câncer: incidência e sensibilidade a antidiárticos poliênicos. Rev. Microbiologia (São Paulo) 20:102-107, 1989.
- 3.Fisher, J.F. & Henson, D.M. - Amphotericin B resistance in *Candida*. Ann. Intern. Med., 102:563-564, 1985.
- 4.Ghannoum, M.A.; Sharif, H.F. & Grarreer, H. - Sensitivity of clinical yeast isolates in Kuwait against a number of antifungal agents. Mykosen, 27:402-410, 1983.
- 5.Moody, M.R.; Young, V.M.; Morris, M.J. & Schimpff, S.C. - In vitro activities of miconazole, miconazole nitrate, and ketoconazole alone and combined with rifampin against *Candida* spp. and *Torulopsis glabrata* recovered from cancer patients. Antimicrob. Agents Chemother., 17:871-875, 1980.
- 6.Odds, F.C. - Laboratory evaluation of antifungal agents: a comparative study of five imidazole derivatives of clinical importance. J. Antimicrob. Chemother., 6:749-761, 1980.
- 7.Saag, M.S. & Dismukes, W.S. - Azole antifungal agents: emphasis on new triazoles. Antimicrob. Agents Chemother., 32:1-8, 1988.

Recebido para publicação em 24/02/89

TIPOS ELETROFORÉTICOS, DE ROTAVÍRUS BOVINO

José Antonio Jerez
 José Alberto Neves Candeias
 Edison Luiz Durigon
 & Maria Lúcia Rácz

Deptº de Microbiologia
 Instituto de Ciências Biomédicas USP
 Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
 Cidade Universitária
 05500 São Paulo SP, Brasil

Resumo

Em 27 amostras de material fecal de bezerros com diarréia, positivas para rotavírus através de ensaio imunoenzimático, estudou-se as características de migração eletroforética do ARN viral, em comparação com a amostra padrão Compton-England. Quatro tipos eletroforéticos, ou eletroferótipos, foram observados e denominados, ao acaso, "A", "B", "C" e "D". Encontrou-se 14 eletroferótipos "D", 6 "C", 4 "A" e 3 "B". As principais diferenças foram observadas nas posições relativas dos segmentos das classes I, II e III. Nenhuma diferença pode ser observada nos segmentos da classe IV, embora fossem diferentes das da amostra padrão Compton-England. Estudo de maior número de amostras de rotavírus necessita ser realizado para se avaliar o significado das variações do ARN viral.

Introdução

Estudos dos rotavírus bovino, em algumas regiões do Estado de São Paulo, foram iniciados com a pesquisa de anticorpos: em 353 amostras de soro de bezerros foi verificado que 172 (48%) eram positivas, sugerindo, assim, possível participação dos rotavírus na etiologia de diarréias (5).

Posteriormente foi verificado que em 120 amostras de material fecal de bezerros com diarréia, 35 (29%) foram positivas para rotavírus através de ensaio imunoenzimático (6).

Na presente investigação procurou-se estudar as características de migração eletroforética do ARN viral, através de eletroforese em gel de poliacrilamida, em algumas dessas amostras positivas.

Material e Métodos

Fezes - 27 amostras de material fecal positivas para rotavírus, através de

ensaio imunoenzimático, obtidas de bezerros com quadro clínico de diarréia e colhidas em diversas fazendas de criação de gado bovino localizadas em 8 Municípios do Estado de São Paulo.

Antígeno padrão - Amostra Compton-England de rotavírus bovino, adaptada em cultura de células da linhagem MA104 (rim fetal de macaco Rhesus).

Preparo do material fecal - Utilizou-se os procedimentos anteriormente descritos (6).

Extração do ARN - Utilizou-se o método preconizado por Hering & Col. (4), com algumas modificações. Em 0,4ml de material fecal, previamente preparado, foram adicionados 100µl de SDS 10% e submetido à temperatura de 37°C durante 30 minutos. À seguir, adicionou-se 0,5ml de fenol (destilado) e 0,5ml de cloroformio, homogeneizando a mistura, submetendo-a à uma centrifugação moderada (2.000 a 3.000 rpm durante 5

minutos).

O sobrenadante foi transferido para outros tubos, nos quais adicionou-se 100 μ l de NaCl 20% e 2,5ml de etanol. As misturas foram incubadas à -20°C durante uma noite e submetidas à uma centrifugação a 20.000g (em centrifuga refrigerada) durante 30 minutos. O sobrenadante foi desprezado e ao sedimento foram adicionados 100 μ l de uma mistura dissociante de ácido nucleíco e submetido à temperatura de 37°C durante 30 minutos. As amostras assim preparadas estavam prontas para serem utilizadas na reação de E.G.P.A.

Eletroforese em gel de poliacrilâmida

Utilizaram procedimentos preconizados por Laemmli (10) e Pereira & Col. (12), com algumas modificações. As placas de vidro tinham dimensões de 15x16,5cm; os separadores 1,5mm de espessura e o "pente" era formado por 21 depressões de 3x15mm, espaçadas de 2mm. O gel inferior era usado na concentração de 7,5% e o gel superior 3,5%. Na corrida eletroforética era usado tampão TRIS/glicina com pH=8,3. Do material de extração do ARN coletava-se, com auxílio de uma microseringa, 40 μ l de cada amostra e adicionava-se às depressões do "pente", sendo que a primeira depressão à esquerda era preenchida com a amostra padrão. A corrida era realizada a 40mA durante, aproximadamente, 4 horas e meia.

A coloração do gel era feita com nitrato de prata, segundo o método preconizado por Herring & Col. (4).

Resultados e Discussão

As características de migração do ARN eram lidas, analisadas e tomado-se como padrão a estirpe Compton-England, as nossas amostras eram denominadas ao acaso "A", "B", "C" e "D", conforme as diferenças encontradas no perfil eletroforético ou eletroferótico. A Figura 1 ilustra os eletroferótipos observados.

Das 27 amostras estudadas, 14 pertenciam ao eletroferótipo "D", 6 ao "C", 4 ao "A" e 3 ao "B".

Na Tabela 1 encontramos os resultados das amostras analisadas segundo os Municípios onde se localizavam as propriedades de criação

Figura 1
Diagrama ilustrativo do perfil eletroforético da amostra Compton-England (Pad.) e dos tipos "A", "B", "C" e "D".

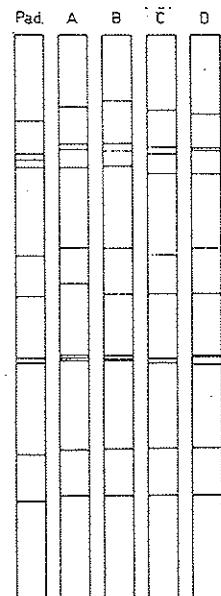


Tabela 1 - Amostras de fezes de bezerros, positivas para rotavírus, segundo os municípios onde se localizavam as propriedades de criação visitadas e os resultados dos tipos eletroforéticos observados, São Paulo, 1988.

Municípios	Nº de amostras	Tipos eletroforéticos			
		"A"	"B"	"C"	"D"
Batatais	2	-	-	-	2
Bragança Paulista	1	-	-	1	-
Comipinas	8	1	-	2	5
Itapetininga	3	3	-	-	-
Jacareí	1	-	-	1	-
Lins	4	-	-	1	3
São Carlos	5	-	-	1	4
Sorocaba	3	-	3	-	-
Total	27	4	3	6	14

visitadas e os eletroferótipos observados.

As principais diferenças encontradas nas características de migração dos 11 segmentos do ARN viral foi verificada com relação a posição relativa dos segmentos das classes I, II e III. Na classe IV não houve praticamente, diferença de migração entre os eletroferótipos observados, todavia, todos apresentaram mobilidade eletroforética menor de que os segmentos correspondentes da amostra Compton-England. Diferença no comportamento eletroforético em amostras de rotavírus bovino foi verificado por vários autores (1, 13, 14, 16, 17 e 20) e a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida vem sendo reconhecida como uma técnica importante para se poder distinguir diferenças entre amostras de campo evidenciadas (16).

Embora tenha sido verificado que em amostras com diversidade de comportamento eletroforético nos segmentos 1, 5, 10 e 11 não seriam suficientes para se poder caracterizar possíveis variações antigênicas (1), algumas observações acerca das funções de alguns segmentos do ARN viral merecem ser analisados à luz dos trabalhos realizados com anticorpos monoclonais, translação "in vitro" do ARN viral, recombinação genética e sequência de aminoácidos dos polipeptídeos estruturais, principalmente no que se refere aos segmentos da classe III (2, 3, 7, 8, 9, 11, 16, 19 e 21).

Como os segmentos 8 e 9 co-migram na eletroforese, um deles deve ser o responsável pela atividade neutralizante (7, 8, 9 e 11). Amostras que apresentaram diferença na sequência de nucleotídeos do segmento 9, apresentaram, também, diferença na sequência de aminoácidos do produto transladado (15). Cinco amostras sugestivas de diferentes sorotipos exibiram diferenças na região hidrofóbica do polipeptídeo VP7 (2) e a proteção cruzada em bezerros gnotobióticos só ocorria com amostras do mesmo sorotipo (21), sendo que em bovinos já se verificou a existência de, pelo menos, 3 sorotipos (18).

Assim, até que possa ser definitivamente esclarecido se as diversidades de migração

eletroforética, principalmente dos segmentos que compõe a classe III, possam ou não estar relacionadas com a diferença no comportamento antigênico, achamos conveniente que se continue a aplicar a técnica de eletroforese em gel poliacrilamida, a fim de que maior número de amostras de rotavírus bovino possam ser analisadas em maior número de regiões do Estado de São Paulo, visando, sobretudo, futuros programas profiláticos envolvendo escolha adequada de amostras vacinais.

Summary

Electrophoretic types of bovine rotaviruses

27 fecal samples from calves with diarrhea, positive for the presence of rotavirus through Enzyme Linked Immunosorbent Assay, have been analysed by RNA electrophoresis in comparison with the Compton-England strain as a pattern. Four electrophoretic categories - "A", "B", "C", and "D" - could be observed by the electrophoretic behaviour of their genome segments. 14 were "D", 6 "C", 4 "A", and 3 "B". Several differences were apparent in the relative positions of bands cluster I, II, and III. No differences could be seen in bands cluster IV, although in this bands cluster all samples were distinct from Compton-England strain.

Referências Bibliográficas

- Clarke, I.N. & Mc Crae, M.A. - Structural analysis of electrophoretic variation in the genome profiles of rotavirus field isolates. *Infect. Immun.*, 36:492-7, 1982.
- Glass, R.I.; Keith, J.; Nakagomi, O.; Nakagomi, T.; Askar, J.; Kapikian, A.Z.; Chanock, R.M.; Flores, J. - Nucleotide sequence of the structural glycoprotein VP7 gene of Nebraska calf diarrhea virus rotavirus: Comparison with homologous genes from four strains of human and animal rotaviruses. *Virology*, 141:292-8, 1985.
- Grunert, B.; Streckert, H.J.; Liedtke, W.; Houly, C.; Mietens, C.; Werchau, H. - Development of a monoclonal antibody specific for serotype 3 rotavirus strains. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, 6:136-41, 1987.
- Herring, A.J.; Inglis, N.F.; Ojeh,

- C.K.; Snodgrass, D.R.; Menzies, J.D. - Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Clin. Microbiol.*, 473-7, 1982.
- 5.Jerez, J.A.; Candeias, J.A.N.; Durigon, E.L.; Rácz, M.L.; Ribeiro, L.C. - Anticorpos anti-rotavírus em bovinos. *Rev. Microbiol. (São Paulo)*, 18:371-4, 1987.
- 6.Jerez, J.A.; Candeias, J.A.N.; Rácz, M.L.; Durigon, E.L.; Ribeiro, L.C. - Evidenciação de rotavírus através de ensaio imunoenzimático em fezes diarréicas de bezerros. *Rev. Microbiol. (São Paulo)*, 18:201-4, 1987.
- 7.Kalica, A.R.; Greenberg, H.B.; Wyatt, R.G.; Flores, J.; Sereno, M.M.; Kapikian, A.Z.; Chanock, R.M. - Genes of human (strain Wa) and bovine (strain UK) rotaviruses that code for neutralization and subgroup antigens. *Virology*, 112:385-90, 1981.
- 8.Kalica, A.R.; Flores, J.; Greenberg, H.B. - Identification of the rotaviral gene that codes hemagglutination and protease-enhanced plaque formation. *Virology*, 125:194-205, 1983.
- 9.Kantharidis, P.; Dyall-Smith, M.L.; Holmes, I.H. - Completion of the gene coding assignments of SA11 rotavirus: gene products of segments 7,8 and 9. *J. Virol.*, 48:330-4, 1983.
- 10.Laemmli, U.K. - Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-5, 1970.
- 11.Mason, B.B.; Graham, D.Y.; Estes, M.K. - Biochemical mapping of the simian rotavirus SA11 genome. *J. Virol.*, 46:413-23, 1983.
- 12.Pereira, H.G.; Azeredo, R.S.; Leite, J.P.C.; Candeias, J.A.N.; Rácz, M.L.; Linhares, A.C.; Gabbay, Y.B.; Trabulsi, J.R. - Electrophoretic study of the genome of human rotaviruses from Rio de Janeiro, São Paulo and Pará, Brazil. *J. Hyg.*, 90:117-26, 1983.
- 13.Pocock, D.H. - Characterization of rotavirus isolates from sub-clinically infected calves by genome profile analysis. *Vet. Microbiol.*, 13:27-34, 1987.
- 14.Pocock, D.H. - Isolation and characterization of two group A rotaviruses with unusual genome profiles. *J. Gen. Virol.*, 68:653-60, 1987.
- 15.Richardson, M.A.; Iwamoto, A.; Ikegami, N.; Nomoto, A.; Furuichi, Y. - Nucleotide sequence of the gene encoding the setotype-specific antigen of human (Wa) rotavirus: comparison with the homologous genes from simian SA11 and UK bovine rotaviruses. *J. Virol.*, 51:860-2, 1984.
- 16.Rodger, S.M. & Holmes, I.H. - Comparison of the genomes of simian, bovine, and human rotaviruses by gel electrophoresis and detection of genomic variation among bovine isolates. *J. Virol.*, 30:839-46, 1979.
- 17.Sabara, M.; Deregt, D.; Babiuk, L.A.; Misra, V. - Genetic heterogeneity within individual bovine rotavirus isolates. *J. Virol.*, 44:813-22, 1982.
- 18.Snodgrass, D.R.; Ojeh, C.K.; Campbell, I.; Herring, A.J. - Bovine rotavirus serotypes and their significance for immunization. *J. Clin. Microbiol.*, 20:342-6, 1984.
- 19.Taniguchi, K.; Hoshino, Y.; Hishikawa, K.; Green, K.Y.; Maloy, W.L.; Morita, Y.; Urasawa, S.; Kapikian, A.Z.; Chanock, R.N.; Gorziglia, M. - Cross-reactive and serotype-specific neutralization epitopes on VP7 of human rotavirus: nucleotide sequence analysis of antigenic mutants selected with monoclonal antibodies. *J. Virol.*, 62:1870-74, 1988.
- 20.Verly, E. & Cohen, J. - Demonstration of size variation of RNA segments between different isolates of calf rotavirus. *J. Gen. Virol.*, 35:583-6, 1977.
- 21.Woode, G.N.; Kelso, N.E.; Simpson, T.F.; Gaul, S.K.; Evans, L.E.; Babiuk, L.A. - Antigenic relationships among some bovine rotaviruses: serum neutralization and cross-protection in gnotobiotic calves. *J. Clin. Microbiol.*, 18:358-64, 1983.

Recebido para publicação em 13/01/89

INFORMAÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA SBM

Clinical Application of Interferons and their Inducers. 2º ed. Dale A. Stringfellow, Marcel Dekker, Inc. New York and Basel 1986.

O Prof. Dale A. Stringfellow, Diretor do Programa de Pesquisa Anti-Câncer da Bristol-Myers Company, Connecticut-USA, fornece, nesta 2º edição do seu livro Clinical Application of Interferons and their Inducers, uma exposição muito atual a respeito da pesquisa básica e aplicada sobre o interferon e sua utilização clínica.

Investiga controvérsias existentes entre o interferon e seus indutores. Trata objetivamente da pesquisa tecnológica baseada na informação básica da molécula e da sua ação nas interações com o metabolismo celular, além da tecnologia recombinante e da modulação imunitária. Explora problemas encontrados nas aplicações clínicas dos interferons e de seus indutores. Discute de forma crítica os resultados das pesquisas de campo e dos interferons como agentes anti-virais e anti-tumorais, alcançados nos USA, na Europa e no Japão.

Finalmente, apresenta mais de 1000 referências bibliográficas, que visam facilitar o planejamento e a realização de novas pesquisas na área.

Prof. Dr. Klaus Eberhard Stewien
Deptº de Microbiologia - ICB/USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
Cidade Universitária USP
05508 São Paulo SP

FAPERJ garante recursos à pesquisa fluminense

Oito anos após sua criação, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ, afinal, pode prestar contas de suas atividades exibindo um relatório de real interesse à comunidade científica fluminense, que será impresso para

distribuição às principais instituições do setor. Reestruturada pela Secretaria de Estado de Ciência e Tecnologia em 1987, a FAPERJ, de cujo histórico não constava qualquer concessão de apoio financeiro a projetos de pesquisa ou bolsa de estudo a pesquisadores fluminenses, inverteu o quadro que frustava a comunidade científica do Estado: recebeu, de novembro de 1987 a dezembro de 1988, mais de 1 mil e 100 solicitações, representando uma demanda de NCz\$ 1,2 milhão, e concedeu 466 auxílios a projetos e 172 bolsas de estudo, totalizando NCz\$ 614 mil.

Com isso pôde beneficiar mais de 30 instituições fluminenses, das tradicionais universidades federais (UFRJ, UFF, UFRRJ e UNIRIO), Estadual (UERJ) e Católica (PUC) à Colônia Juliano Moreira, Espaço Ciência Viva ou à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Os auxílios foram concedidos a todas as grandes áreas do conhecimento, e serviram para apoiar pesquisas tão diferenciadas quanto o desenvolvimento de um traçador gráfico para a indústria têxtil ou uma pesquisa sobre a obra do compositor Caetano Veloso.

Num ano em que o Governo Federal e suas instituições de fomento à pesquisa se viram em dificuldades para manter a concessão de auxílios e bolsas, a atuação da FAPERJ no Estado do Rio foi um verdadeiro desafogo. Embora também a FAPERJ tenha enfrentado um orçamento para fomento à pesquisa, com perturbações no fluxo de caixa que chegaram a provocar atrasos na liberação de recursos, a partir deste ano o "desafogo" ganha estabilidade. Isso graças a mensagem enviada pelo executivo estadual à Assembléia Legislativa, aprovando a vinculação de 0,75% da receita tributária do Estado à FAPERJ em 1989 e 1,5% a partir de 1990. Com isso, o Secretário de Ciência e Tecnologia, José Pelúcio Ferreira, e o Diretor Superintendente da FAPERJ, Luiz Fernando Salgado Candiota, esperam poder garantir a continuidade no processo de apoio à pesquisa fluminense.

Articulação - A FAPERJ procurou, também, articular-se com outros órgãos de fomento à pesquisa e à formação científica, nacionais e internacionais, conseguindo viabilizar convênios de

**XV Congresso Brasileiro de
Microbiologia**

O Congresso Brasileiro de Microbiologia será realizado entre 16 a 20 de julho de 1989 no campus da USP - Ribeirão Preto. O referido congresso, patrocinado pela SBM, tem por objetivos propiciar a aquisição de conhecimentos, divulgação de pesquisas e o intercâmbio de informações entre profissionais das diversas áreas da

Microbiologia (Agrícola, Alimentos, Ambiental, Básica, Industrial, Médica Humana, Médica Veterinária e Microbiologia Oral).

Para maiores informações entrar em contato com a Secretaria Executiva do XV Congresso Brasileiro de Microbiologia.

Dra. Claudia Maffei
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP
Deptº de Microbiologia
Tel: (016) 633-3035 R. 139 ou 276
14049 Ribeirão Preto SP