

# Revista de Microbiologia



**SBM**

Sociedade  
Brasileira de  
Microbiologia

São Paulo — Brasil

Volume 20 Número 3 Jul.-Set. 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 milímicro ( $n\mu$ ) e micromicro ( $\mu\mu$ ). Comprimentos devem ser expressos em micrômetro ( $\mu m$ ;  $10^{-6}m$ ), ao invés de micro ( $\mu$ ); nanômetro ( $nm$ ;  $10^{-9}m$ ), ao invés de milímicro ( $m\mu$ ); e Angstroms ( $\text{\AA}$ ;  $10^{-10}m$ ). Partes por milhão (ppm) devem ser expressas como microrganismos por milímetros ( $\mu g/ml$ ) ou microlitros por litro ( $\mu l/litro$ ). A Revista se reserva o direito de adaptar os manuscritos ao estilo adotado.

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

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

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

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

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

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** — No texto, as referências devem ser citadas por número. Os sobrenomes de dois autores devem ser separados por &; quando houver mais de dois autores, a separação é feita por um ponto e vírgula e o último por &. Na 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 comprehensíveis, sem necessidade de consulta ao texto. São permitidas notas explanativas de rodapé indicadas por asteriscos, mas não descrições pormenorizadas dos experimentos. Materiais e métodos utilizados para a obtenção dos resultados devem ser incluídos na secção correspondente.

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

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

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

## PROGRAMA DE APOIO A PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS



CNPq





## 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 Micologia Virologia	Maria Therezinha Martins Claudete Rodrigues Paula 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 PRODICA Gráfica e Editora Ltda

## **Sociedade Brasileira de Microbiologia**

<b>Diretoria</b>	<b>Presidente</b> Maria Therezinha Martins Inst. de Ciências Biomédicas - USP Deptº de Microbiologia Av. Prof. Lineu Prestes, 1.374 05508 - São Paulo - SP	<b>Vice-Presidente</b> Walderez Gambale Inst. de Ciências Biomédicas - USP Deptº de Microbiologia Av. Prof. Lineu Prestes, 1.374 05508 - São Paulo - SP
	<b>Secretaria Geral</b> Lúcia Martins Teixeira Inst. de Microbiologia - UFRJ Centro de Ciências da Saúde - Bl.1 Ilha do Fundão 21944 - Rio de Janeiro - RJ	<b>Tesoureiro</b> Leonardo Perego Jr. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP Conjunto das Químicas Cidade Universitária 05508 - São Paulo - SP
<b>Coordenadores de Programas da SBM</b>	Microbiologia de Alimentos (Sebastião Timo 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); Infeções Hospitalares (Carlos Emílio Levy - FMRP).	
<b>Objetivos</b>	A Sociedade Brasileira de Microbiologia, fundada em 28 de setembro de 1956, é sociedade civil, sem fins lucrativos, dedicada a agremiar microbiologistas brasileiros; a promover o desenvolvimento da microbiologia através do estímulo à pesquisa científica e suas aplicações, melhorar as qualificações profissionais dos microbiologistas; e manter intercâmbio e fazer aproximação com entidades que visem objetivos semelhantes. Organiza, a cada dois anos, na última semana do mês de julho, o Congresso Brasileiro de Microbiologia e edita a Revista de Microbiologia, com distribuição trimestral. Para informações sobre a SBM, escrever para qualquer membro da Diretoria.	
<b>Endereço</b>	Av. Prof. Lineu Prestes, 1.374 05508 - São Paulo - SP Brasil Fone: (011) 813-9647 TELEX 11 35085	

**REVISTA DE MICROBIOLOGIA**  
**PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA**  
**VOLUME 20 JULHO-SETEMBRO 1989 NÚMERO 3**  
**REV. MICROBIOL. (S. PAULO), 20(3)**

**CONTEÚDO-CONTENTS**

**PAG.**

Nader Filho, A.; Rossi Jr., O.O.; & Schocken-Iturriño, R.P. Avaliação das características microbiológicas do leite tipo "C" e das embalagens plásticas utilizadas no envase, em uma usina de beneficiamento do Estado de São Paulo, Brasil	261
Cañas, P.; Joyas, A.; Robeson, J. & Campos, V. Antibiotic and heavy metal resistance associated to plasmids in clinical isolates of <i>Klebsiella pneumoniae</i> in Chile	267
Franco, B.D.G. de M.; & Bergamo, T. Análise microbiológica de misturas prontas destinadas ao tempero de alimentos ("Tempero pronto") Microbiological quality of ready-to-use food seasonings	272
Martins, M.T.; Gambale, W.; Paula, C.R.; Pellizari, V.H.; Matsumoto, E.F.; Ribeiro, G.; Malateaux, S.; & Mayer, M.H. Utilização de bactérias e fungos como indicadores na avaliação de fatores fisiográficos que interferem nos processos de auto-depuração de um córrego sub-tropical Utilization of bacteria and fungi as indicators in the evaluation of physiographic factors that interfere in the self-depuration process in a subtropical stream	278
Leite, D. da S.; Garcia, M.; Yano, T.; & Castro, A.F.P. de Detecção da adesina FY em amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de bezerros com diarréia no Brasil Detection of FY adhesin in strains of <i>Escherichia coli</i> isolated from calves with diarrhea in Brazil	292
Liberal, M.H.T. Detecção de rebanhos bovinos portadores de micoplasmoses através do isolamento de <i>Mycoplasma bovis</i> de exsudatos nasais de bezerros Detection of mycoplasmoses carriers in bovine herds by the isolation of <i>Mycoplasma bovis</i> from calves' nasal exudates	296
Filgueiras, A.L.L.; & Hofer, E. Ocorrência de <i>Campylobacter</i> termofílico em diferentes pontos de uma estação de tratamento de esgotos na cidade do Rio de Janeiro, RJ Occurrence of thermophilic <i>Campylobacter</i> in different points of a sewage treatment station in Rio de Janeiro, R.J.	303
Magalhães, M.; Magalhães, V.; Leão, G.C.; & Galvão, L.P.R. Susceptibilidade do <i>Campylobacter pylori</i> a nove agentes antimicrobianos Susceptibility of <i>Campylobacter pylori</i> to nine antimicrobial agents	309
Moreira, Y.K.; Reis, J.H.; & Rocha, O.A. Surto de cromomicose sistêmica em rãs ( <i>Rana catesbeiana</i> , Shaw 1802), causado pelo <i>Cladosporium</i> sp., Minas Gerais, Brasil An outbreak of systemic chromomycosis in frogs ( <i>Rana catesbeiana</i> , Shaw 1802) caused by <i>Cladosporium</i> sp	313
Campos-Takaki, G.M.; Dietrich, S.M.C; & Manocha, M.S. Influência da idade da cultura na composição química da parede celular de <i>Ellisomyces anomalus</i> The influence of culture age on the chemical cell wall of <i>Ellisomyces anomalus</i>	321

Carvalho, A. de; Santiago, I. da S.T.; & Molinari, R. Produção de substâncias que absorvem luz ultravioleta por <i>Aspergillus oryzae</i> em meios complexos Production of UV light adsorbing substances by <i>Aspergillus oryzae</i> in complex media	327
Mendes, C.M.F.; Francisco, W.; Siqueira, L.F. de G. & Silveira, M.J. Sorogrupagem de <i>Cryptococcus neoformans</i> , nota epidemiológica <i>Cryptococcus neoformans</i> serogrouping, epidemiologic note	333
Resende, M.A. de; Franco, M.V.G.; & Hamdan, J.S. Metabolismo oxidativo de células levedouriformes de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Oxidative metabolism of yeast cells of <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	337
Corrêa, B.; Gambale, W.; Paula, C.R.; Reche, N.O.C.; & Purchio, A. Aplicação do método fluorescente (solução de diacetato de fluoresceína e brometo de etidio) no estudo da viabilidade de <i>Metarrhizium anisopliae</i> Fluorescent method (fluorescein diacetate and ethidium bromide) for the viability study of <i>Metarrhizium anisopliae</i>	341
Ioneda, T.; Niigaki, N.T.; Almeida, E.T. de; & Levy, C.E. Microlato de trehalose: principal componente lipídico dotado de propriedade tóxica em nocardias isoladas de casos clínicos Occurrence of trehalose mycolate as the major lipidic component carrying toxic property in clinical nocardia isolates	345
Corrêa, B.; Purchio, A.; Gambale, W.; Paula, C.R.; Framil, V.M.S. Método fluorescente para estudo da viabilidade de células fúngicas em materiais clínicos Fluorescent method to study the viability of fungi cells in clinical materials	349
Oliveira, I.C. de; Kroon, E.G.; Ferreira, P.C.P.; & Golgher, R.R. Produção de interferon humano de membranas amnióticas em microtécnica Production of human amniotic interferon by microtechnique	358
Linhares, A.C.; Mascarenhas, J.D.P.; Gabbay, Y.B.; Freitas, R.B. de A possible fifth human rotavirus serotype and an unusual serotype 2, subgroup II rotavirus strain	363
Zanin, G.M.; & Moraes, F.F. de Atividade e energia de ativação da amiloglicosidase na forma solúvel e imobilizada Activity and energy of activation of soluble and immobilized amylglucosidase	367
Oliveira, E.G. de; & Morais, J.O.F. de Influência da taxa de diluição sobre a produtividade e a eficiência da fermentação alcoólica contínua com <i>Zymomonas mobilis</i> Influence of dilution rate on the productivity and yield of continuous alcoholic fermentation with <i>Zymomonas mobilis</i>	372
Giordano, R. de L.C.; & Schmidell, W. Estudo cinético da hidrólise enzimática de amido: inibição pela glicose Kinetic study of starch enzymatic hydrolysis: glucose inhibition	376
Leon, W.; & Barros, D.I.M. O ensino da microbiologia: Um desafio! Teaching microbiology: A challenge	382
Informação Técnico-Científica SBM	387

# AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DO LEITE TIPO "C" E DAS EMBALAGENS PLÁSTICAS UTILIZADAS NO ENVASE, EM UMA USINA DE BENEFICIAMENTO DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL

Antonio Nader Filho  
Oswaldo Durival Rossi Júnior

Deptº de Medicina Veterinária Preventiva  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária UNESP  
Campus de Jaboticabal  
Rodovia Carlos Tonnani, Km 5  
14870 Jaboticabal SP, Brasil

& Ruben Pablo Schocken-Iturrino

Deptº de Microbiologia  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

## Resumo

Foram submetidas à contagem de microrganismos mesófilos, pesquisa de coliformes totais, coliformes fecais e de *Staphylococcus aureus*, 88 amostras de leite tipo C e 22 amostras das embalagens plásticas utilizadas no envase deste produto, colhidas em uma usina de beneficiamento localizada no Estado de São Paulo. Os resultados obtidos evidenciaram que 31,8% das amostras de leite e das embalagens plásticas, situaram-se fora dos padrões microbiológicos estabelecidos pelo Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal. Tais achados sugerem a provável existência de falhas de higienização dos equipamentos que entram em contato com o leite e/ou a manutenção do produto em temperaturas superiores à recomendada no referido regulamento.

## Introdução

Nos últimos anos, frequentemente tem sido levadas à público, inúmeras denúncias sobre a qualidade do leite pasteurizado distribuído ao consumo. Embora alguns autores questionem os objetivos e a validade de determinadas denúncias (13), os poucos trabalhos publicados em nosso meio, tem evidenciado a ocorrência de elevado número de amostras fora dos padrões microbiológicos legais, tanto a nível de usina de beneficiamento (5, 11), quanto de comércio varejista (3, 5, 10, 11, 12, 14).

As falhas ocorridas durante o processo de beneficiamento (5, 11), aliadas às elevadas temperaturas de conservação do leite a nível de

comércio varejista (5, 11, 12), são fatores que tem contribuído significativamente para a comercialização de um produto com características microbiológicas fora dos referidos padrões regulamentares (3, 5, 10, 14).

Tendo em vista o exposto e considerando a importância que o leite representa na alimentação humana, realizaram-se estudos com o objetivo de avaliar as características microbiológicas do leite tipo C e das embalagens plásticas utilizadas no envase deste produto, em uma usina de beneficiamento do Estado de São Paulo.

## Material e Métodos

Foram colhidas 88 amostras de leite

tipo C cru e pasteurizado, bem como 22 amostras das embalagens plásticas utilizadas para o acondicionamento deste produto, em uma usina de beneficiamento localizada no Estado de São Paulo.

**Obtenção das amostras de leite** - As amostras de leite foram colhidas em quatro pontos do processo de beneficiamento, representados pelo tanque de estocagem de leite cru, saída da seção de resfriamento do pasteurizador, tanque de estocagem de leite pasteurizado e saída da máquina de envase. Deste modo, foram colhidas, de acordo com as normas de assepsia propostas por Veisseyre (19), 22 amostras de 250ml de leite em cada um dos três primeiros pontos do processo de beneficiamento, e 22 de 1000ml (embalagem comercial) no último.

Após o acondicionamento em caixas de material isotérmico (isopor), contendo cubos de gelo, as amostras eram transportadas para os laboratórios da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias "Campus" de Jaboticabal (FCAVJ/UNESP), onde realizavam-se a contagem de microrganismos mesófilos e a pesquisa de *Staphylococcus aureus* para as de leite "in natura" e, também, a pesquisa de coliformes totais e de coliformes fecais, somente para as de leite pasteurizado.

**Obtenção das amostras das embalagens plásticas** - As amostras das embalagens plásticas utilizados para o acondicionamento do leite pasteurizado, eram colhidas na saída da máquina de envase, após a interrupção do fluxo de leite, de modo a obter somente a embalagem vedada e vazia. Assim, foram colhidas 22 amostras, as quais eram acondicionadas em caixas de material isotérmico (isopor), contendo cubos de gelo, sendo transportadas para os laboratórios da FCAVJ/UNESP.

Nos referidos laboratórios, as amostras das embalagens plásticas eram injetadas com 30ml de água peptonada a 0,1%, com o auxílio de seringas esterilizadas. A partir desta solução de lavagem, efetuavam-se a contagem de microrganismos mesófilos, pesquisa de coliformes totais, coliformes fecais e de *Staphylococcus aureus*.

#### **Contagem de microrganismos mesófilos**

(APHA 1) - Para a execução desta prova, após a homogeneização das amostras de leite "in natura" e pasteurizado, obtidas nos diferentes pontos estudados, assim como da solução de lavagem das embalagens plásticas, preparavam-se diluições de  $10^{-1}$  até  $10^{-7}$ , empregando-se como diluente solução de peptona a 0,1%. Em seguida, 1ml de cada diluição era colocado em placas de Petri esterilizadas, em duplicita, vertendo-se, a seguir, cerca de 10ml de ágar padrão (Merck), previamente fundido e resfriado a 43/45 °C.

Após a homogeneização e solidificação do ágar em temperatura ambiente, as placas eram incubadas em estufa a 32°C por 48 horas, quando se efetuava a contagem das colônias. O número de colônias contado em placa, contendo entre 30 e 300 colônias, era multiplicado pelo fator de diluição correspondente e o resultado obtido expressava o número de microrganismos por mililitro.

**Pesquisa de coliformes totais (APHA 1; Ministério da Agricultura 8)** - Para o leite obtido na saída da seção de resfriamento do pasteurizador, após a homogeneização das amostras, procedia-se a inoculação de 1ml da amostra não diluída, em duplicita, em tubos correspondentes contendo caldo lactose-bile-verde brilhante e tubos de Durham invertidos.

Com relação às amostras de leite pasteurizado colhidas no tanque de estocagem e na saída do envase, depois de sua homogeneização, eram inoculados, em duplicita, volumes de leite não diluído, de 0,5, 0,2 e 0,1ml em tubos contendo caldo lactose-bile brilhante e tubos de Durham invertidos.

Para a pesquisa de coliformes totais nas amostras das embalagens plásticas, eram inoculados volumes de 10,1 e 0,1ml da solução de lavagem proveniente das embalagens, em triplicata, em tubos contendo caldo lactose-bile-verde brilhante e tubos de Durham invertidos.

Todos os tubos inoculados eram incubados em estufa a 37°C por 24 a 48 horas. Consideravam-se as provas positivas para coliformes totais, quando ocorria a produção de gás.

**Pesquisa de coliformes fecais (APHA 1; Ministério da Agricultura 8)** - A partir

de cada um dos tubos com caldo lactose-bile-verde brilhante que apresentavam positividade para a pesquisa de coliformes totais, transferia-se uma alçada para tubos de ensaio contendo 10ml de caldo EC e tubos de Durham invertidos. Após a incubação em banho maria a 44,5°C por 24 horas, efetuava-se a leitura, sendo a prova considerada positiva, quando ocorria evidente turvação do meio, acompanhada da presença de gás no tubo invertido.

**Pesquisa de *Staphylococcus aureus*** - Depositava-se na superfície de ágar Baird-Parker em placas, 0,1ml das amostras de leite "in natura" e pasteurizado, e da solução de lavagem das embalagens plásticas. Em seguida, o inóculo era espalhado em toda a superfície do meio, utilizando-se bastões de vidro em "L" esterilizados. As placas assim semeadas, eram incubadas a 37°C por 24 a 48 horas (ICMSF 7).

Após a incubação, eram contadas, separadamente, as colônias negras, brilhantes, com zona de precipitação ao redor e circundadas ou não por halo claro, bem como as que se apresentassem somente negras e brilhantes. O número de colônias contado era multiplicado, separadamente, por 10 e os resultados obtidos eram somados, a fim de se determinar o número presuntivo de *Staphylococcus aureus* por mililitro de leite ou de solução de lavagem das embalagens plásticas.

A seguir, 3 a 5 colônias de cada tipo, eram submetidas a verificação microscópica em esfregaços corados pelo método de Gram. A partir das colônias que se revelassem com cocos Gram positivos, agrupados em forma de cachos, efetuava-se a identificação bioquímica, através das provas de produção da catalase (b), fermentação e oxidação da glicose (1), produção de DNase (7) e de coagulase livre (7).

Após a realização destas provas, caracterizava-se como sendo de *Staphylococcus aureus*, as cepas que apresentavam, fundamentalmente, a prova positiva para a produção de coagulase livre (16). Em seguida, o resultado obtido na contagem presuntiva era confirmado ou corrigido.

#### Resultados e Discussão

A Tabela 1 mostra a distribuição das contagens de microrganismos mesófilos em amostras de leite tipo C "in natura", colhidas no tanque de estocagem de uma usina de beneficiamento do Estado de São Paulo. As elevadas contagens constantes desta Tabela, talvez possam ser atribuídas às precárias condições higiênicas de obtenção deste tipo de leite, à ausência de refrigeração do produto e/ou ao largo intervalo de tempo decorrido desde a ordenha até a chegada na usina de beneficiamento.

Tabela 1 - Distribuição das contagens de microrganismos mesófilos em amostras de leite tipo C crú, colhidas no tanque de estocagem de uma usina de beneficiamento do Estado de São Paulo.

Microrganismos Mesófilos x 1000/ml	Leite tipo C crú		
	Nº	%	Total
10.000	20.000	6	27,3
20.000	30.000	3	13,6
30.000	40.000	1	4,6
40.000	50.000	5	22,7
50.000	60.000	2	9,1
60.000 / cu	+	5	22,7
			Total 22 100,0

Apesar das contagens de microrganismos mesófilos terem sido bastante elevadas, de modo a determinar uma média aritmética da ordem de  $4,5 \times 10^7$  microrganismos mesófilos/ml, esta média, ainda foi inferior às obtidas por Moreira (9) em Santa Maria/RS e Nascimento (11) em João Pessoa/PB, cujos valores foram de  $6,9 \times 10^7$ /ml e  $6,1 \times 10^7$ /ml, respectivamente. Acredita-se que tais variações possam ser justificadas pelo agravamento das precárias condições higiênicas e obtenção e/ou pela manutenção do produto em ausência de refrigeração por um intervalo de tempo ainda maior.

A pesquisa de *Staphylococcus aureus* efetuada nas amostras de leite tipo C "in natura", revelou a presença deste microrganismo em 9 (40,1%). Wilson (20) em Paraibuna-SP, Santos & Col. (15) em Juiz de Fora-MG e Araújo (2) em Pirassununga-SP, verificaram índices superiores, ou seja, 88,7%, 46,9% e 50,0%, respectivamente. Este fato talvez possa ser atribuído a uma menor prevalência da mastite bovina causada por este microrganismo no rebanho leiteiro da região objeto desta investigação.

**Tabela 2 - Distribuição das contagens de microrganismos mesófilos em amostras de leite tipo C pasteurizado, colhidas na saída do pasteurizador, tanque de estocagem e na saída do envase, em uma usina de beneficiamento do Estado de São Paulo.**

Símbolos: (\*) = Amostras fora dos padrões legais.

Microrganismos Mesófilos/ml	Pontos					
	Saída do Pasteurizador		Tanque de estocagem		Saída do envase	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
1	56.000	9	40,9	5	22,7	3 13,6
50.000	100.000	8	36,4	6	27,3	5 22,7
100.000	150.000	1	4,6	5	22,7	7 31,8
150.000	200.000	4*	18,2	4*	18,2	4* 18,2
200.000	250.000	-	-	1* 4,6	1* 4,6	
250.000	ex	-	-	1* 4,6	2* 9,1	
Total		22	100,0	22	100,0	22 100,0

**Tabela 3 - Distribuição das amostras de leite tipo C pasteurizado, fora dos padrões do Ministérios da Agricultura, colhidas na saída do pasteurizador, tanque de estocagem e na saída do envase em uma usina de beneficiamento ro Estado de São Paulo, segundo as contagens de microrganismos mesófilos, pesquisas de coliformes totais e coliformes fecais.**

Microrganismos	Amostras fora dos padrões Ministério da Agricultura					
	Saída pasteurizador		Tanque de estocagem		Saída do envase	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Mesófilos	4	16,2	4	18,2	5 22,7	
Mesófilos + coliformes totais	-	-	1	4,6	1 4,6	
Mesófilos + coliformes totais + Coliformes fecais	-	-	1	4,6	1 4,6	
Total	4	16,2	6	27,3	7 31,8	

A relação entre a média aritmética das contagens de microrganismos mesófilos nas amostras de leite tipo C "in natura" (45.122.727/ml) e nas de leite tipo C colhidas na saída do pasteurizador (76.708/ml), evidenciou que percentual de redução destes microrganismos foi de 99,83%. Esta determinação foi semelhante às efetuadas por Spreer (17), Behmer (4) e Nascimento (11), cujos valores foram de 99,50%, 99,98% e 99,21%, respectivamente.

A Tabela 2 mostra a distribuição das contagens de microrganismos mesófilos em amostras de leite tipo C pasteurizado, colhidas na saída do pasteurizador, tanque de estocagem e na saída do envase. Verifica-se que as

referidas contagens foram crescentes desde a saída do pasteurizador até a saída do envase. Este resultado já era esperado, uma vez que a temperatura de refrigeração aplicada ao produto é capaz de reduzir a proliferação dos microrganismos banais que sobrevivem à pasteurização, porém, é insuficiente para impedir a sua multiplicação durante o intervalo de tempo decorrido entre a pasteurização, estocagem e envase. Além disto, as prováveis falhas na execução das medidas de higienização dos equipamentos que entram em contato com o leite pasteurizado, talvez tenham também contribuído para a recontaminação deste produto.

A análise dos resultados constantes da Tabela 2, evidencia, ainda, que das

22 amostras de leite pasteurizado colhidas na saída do envase, 7 (31,8%) apresentaram-se com contagens de microrganismos mesófilos acima do permitido pelos padrões fixados pelo Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Este achado foi superior aos obtidos por Borges & Col. (5) em Belo Horizonte-MG, Tibana & Leitão (18) no Rio de Janeiro-RJ e Nascimento (11) em João Pessoa-PB, cujos valores foram de 26,4, 2,1% e 3,9%, respectivamente.

Das amostras de embalagens plásticas utilizadas para o envase do leite tipo C pasteurizado, 7 (31,8%) mostraram-se com contagens acima do permitido pelo RIISPOA, ou seja, superiores 100 microrganismos mesófilos/ml. Este achado sugere a possibilidade de que as referidas embalagens tenham contribuído para a elevação do número de microrganismos mesófilos por ml de leite, entre as amostras colhidas na saída do envase.

A Tabela 3 mostra a distribuição das amostras de leite tipo C pasteurizado fora dos padrões fixados pelo RIISPOA, colhidas na saída do pasteurizador, tanque de estocagem e na saída do envase, segundo as contagens de microrganismos mesófilos, pesquisas de coliformes totais e coliformes fecais. Observa-se que das 22 amostras colhidas na saída do envase, 7 (31,8%) apresentaram-se fora dos referidos padrões. Este achado foi inferior aos obtidos por Borges & Col. (5) em Belo Horizonte-MG e Nascimento (11) em João Pessoa-PB, cujos valores foram de 53,8% e 98,3%, respectivamente.

A análise dos resultados inseridos na Tabela 3, evidencia, ainda, que das 7 amostras de leite pasteurizado colhidas na saída do envase que apresentaram-se fora dos padrões estabelecidos pelo RIISPOA, 5 (22,7%) mostraram-se contaminadas apenas por microrganismos mesófilos, 1 (4,6%) por microrganismos mesófilos e coliformes totais e 1 (4,6%) por microrganismos mesófilos, coliformes totais e coliformes fecais. Nascimento (11) analisando 51 amostras de leite tipo C pasteurizado em uma usina de beneficiamento de João Pessoa/PB, verificou a ocorrência de 50 (98,3%) amostras fora dos padrões microbiológicos legais, das quais 26 (50,98%) mostraram-se acima dos limites fixados para coliformes totais, 11 (21,57%) para mesófilos e coliformes

totais, 5 (9,80%) para psicrófilos e coliformes totais, 5 (9,80%) para mesófilos, psicrófilos e coliformes totais, 2 (3,92%) para mesófilos e 1 (1,96%) para mesófilos e psicrófilos.

A pesquisa de *Staphylococcus aureus* realizada nas amostras das embalagens plásticas, bem como nas amostras de leite tipo C pasteurizado colhidas na saída do pasteurizador, tanque de estocagem e saída do envase, revelou a ausência deste microrganismo. Por outro lado, as amostras das embalagens plásticas mostraram-se negativas às pesquisas de coliformes totais e coliformes fecais.

Santos & Col. (15) analisando 49 amostras de leite pasteurizado destinado a produção de queijo tipo "Minas", em um estabelecimento industrial de Juiz de Fora-MG, verificaram a ocorrência de 3,(6,12%) amostras contaminadas por *S. aureus*.

Embora as amostras de leite tipo C colhidas na usina de beneficiamento objeto desta investigação tenham apresentado menor índice de contaminação do que as colhidas em outros estabelecimentos industriais, os resultados obtidos são preocupantes. Tais resultados, sugerem a existência de falhas de higienização dos equipamentos que entram em contato com o leite e/ou a manutenção do produto em temperaturas superiores à indicada pelo RIISPOA, de modo a determinar a ocorrência de amostras fora do padrão microbiológico, ainda na própria usina de beneficiamento.

Diante do exposto, parece lícito propor no Serviço de Inspeção, maior rigor na fiscalização do correto cumprimento das medidas higiênicas-sanitárias a nível de usina de beneficiamento, com o intuito de obter um produto com características microbiológicas compatíveis com os padrões legais.

#### Summary

Eighty eight samples of type "C" milk and twenty two plastic bags used for packaging, were collected in a milk processing plant in the State of São Paulo, Brazil, and submitted to mesophytic bacterial counts, and search for fecal coliform, total coliform and *Staphylococcus aureus*. The results showed that 31,8% of the milk and of the containers were out of the established patterns of the Industrial

and Sanitary Inspection For Products of Animal Origin. These results suggest the existence of failures in the higienization process of equipments that have contact with the milk and/or the product was not stored at the correct temperature.

#### Referências Bibliográficas

1. American Public Health Association - Committee on microbiological methods for foods. Compendium of methods for microbiological examination. Washington, 1976.
2. Araújo, W.P. - *S. aureus* em leite cru. Produção de enterotoxina e caracterização da origem provável humana ou bovina, a partir das cepas isoladas. São Paulo, 1984. (Tese de Doutoramento - Faculdade de Saúde Pública da USP).
3. Baruffeldi, R.; Penna, T.C.U.; Machoshivili, I.A. & Abe, L.E. - Condições higiênico-sanitárias do leite pasteurizado tipo B vendido na cidade de São Paulo, SP (Brasil), no período de fevereiro a agosto de 1982. Rev. Saúde Pùbl., São Paulo, 18:367-374, 1984.
4. Behmer, M.L.A. - Tecnologia do leite. 10.ed. São Paulo, Nobel, 1980.
5. Borges, M.S.; Oliveira, J.S. & Melo, A.M. - Comparison of the quality of two types of milk at two sources in the Belo Horizonte, Brazil market. J. Food Protec., 41(9):739-742, 1978.
6. Harrigan, W.F. & McCance, M. - Laboratory methods in microbiology. 4.ed. New Jersey Prentice-Hall, 1969.
7. International Commission on Microbiological Specifications For Foods. Microorganisms in foods. 1. Their significance and methods of enumeration. 2.ed. Toronto, University of Toronto Press, 1978.
8. Ministério da Agricultura - Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. Brasília, Métodos Microbiológicos; 1981.
9. Moreira, W.S. - Da necessidade de pasteurização do leite fornecido à população. Santa Maria, RGS. Rev. Cent. Ciênc. Rurais, Sta. Maria, 1(3):105-112, 1971.
10. Nader Filho, A.; Amaral, L.A.; Rossi Júnior, O.D.; Schocken-Iturrino, R.P. & Martucci, R. - Bacterial analysis of comercial pasteurized type C milk distribuited in town of Jaboticabal-SP (Brasil). Ars Veterinária, 2(2):263-268, 1986.
11. Nascimento, D. - Contribuição ao conhecimento das condições bacteriológicas de amostras de leite tipo C, antes e após a pasteurização, vendido na cidade de João Pessoa, PB, 1977/78. São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, 1982. (Tese de Doutoramento).
12. Oliveira, J.S. & Borges, S.F. - Qualidade do leite pasteurizado. Hig. Alim., São Paulo, 2(3):113-116, 1983.
13. Panetta, J.C.; Borelli, V.; Soldado, D.D. & Da Silva, G.D. - Posição dos Médicos Veterinários sobre a questão da qualidade do leite. Boletim do CRMV4, São Paulo, 18:3-5, 1983.
14. Rossi Júnior, O.D.; Nader Filho, A.; Faleiros, R.R.; Lopes, J.L.; Schocken-Iturrino, R.P. - Análise das condições físico químicas e bacteriológicas do leite oferecido ao comércio em Jaboticabal-SP. Rev. Inst. Când. Tostes, 220(37):15-19, 1982.
15. Santos, E.C.; Genigeorgis, C. & Farver, T.B. - Prevalence of *S. aureus* in raw and pasteurized milk used for comercial manufacturing of Brasilian Minas Cheese. J. Food Protec., 44(3):172-176, 1981.
16. Sperber, W.H. & Tatini, S.R. - Interpretation of the tube coagulase test for identification of *S. aureus*. Appl. Microb., 29:502-505, 1975.
17. Spreer, E. - Lactologia Industrial. 2.ed. Zaragoza. Acribia, 1975.
18. Tibana, A. & Leitão, M.F.F. - Avaliação da qualidade microbiológica do leite tipo C consumido na cidade do Rio de Janeiro. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 4º, Rio de Janeiro, 1980.
19. Veissayre, R. - Lactologia Técnica. Zaragoza (España), Acribia, 1972.
20. Wilson, D. - Pesquisa de *S. aureus* em leite a ser pasteurizado. Rev. Saúde Pùbl., São Paulo, 11:1-11, 1977.

# ANTIBIOTIC AND HEAVY METAL RESISTANCE ASSOCIATED TO PLASMIDS IN CLINICAL ISOLATES OF KLEBSIELLA PNEUMONIAE IN CHILE

Pamela Cañas  
 Alejandro Joyas  
 James Robeson  
 & Victoriano Campos

Instituto de Biología  
 Universidad Católica de Valparaíso  
 Avda. Brasil, 2950  
 Valparaíso, Chile

## Resumo

Resistência a antibióticos e metais pesados associada a plasmídio em isolados clínicos de *Klebsiella* de origem hospitalar no Chile. Isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* de origem hospitalar apresentaram resistência múltipla para antibióticos e metais pesados associada à presença de plasmídio.

## Introduction

*Klebsiella pneumoniae* is a bacterium widely distributed in the natural environment (17, 22). Furthermore it is an opportunistic pathogen for animals and man and is frequently isolated from lung, urinary tract and wound infections as well as from septicemias (20, 24, 25).

In recent years, the genus *Klebsiella* has been a matter of concern in Public Health because strains resistant to both antibiotics and heavy metal salts have emerged (5, 15, 19, 23). These, of course, represent a health hazard for immuno-supressed patients in the nosocomial environment.

In fact, nosocomial infections due to *K. pneumoniae* have been reported as early as 1966 in the USA and 1967 in Britain (10); also, there are reports of nosocomial infections due to *K. pneumoniae* in Chile. The first one dates back to 1969 (6); later, nosocomial infections have been reported that affect mainly premature and undernourished children (13, 14, 24, 25) and adults recovering from surgery in care wards (6). Normally *Klebsiella* is disseminated via hands of hospital personnel, improperly sterilized devices and contaminated food (8).

On the other hand, multiresistance to antimicrobial agents in *Klebsiella* has been shown to be plasmid mediated (2, 3, 11, 18). Therefore we decided to investigate patterns of resistance to antimicrobial agents and their genetic bases among recent isolates of *K. pneumoniae* recovered from nosocomial infections in Chile.

In this preliminary communication we report the occurrence in Chile of clinical isolates of *K. pneumoniae* exhibiting resistance to antibiotics and heavy metal salts associated to the presence of plasmids.

## Materials and Methods

*K. pneumoniae* strains examined were of nosocomial origin, and identification of this strains according to the CDC Bulletin on enteric bacteria. Other properties are listed in Table 1. Antibiotic resistance was determined by the agar diffusion technique, (1) in Muller Hinton Agar (Difco, Detroit, Michigan, USA), using sensidisks (Difco).

Resistance to heavy metal salts (Merck, Darmstadt, Germany) was determined by the tube dilution method according to the Manual of Methods for General Bacteriology (12) in Muller

Table 1 - Features of nosocomial *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in Chile.

Symbols: (a) (u.t.i.) = Urinary tract infection; (b) A = Ampicillin 10mcg.; C = Chloramphenicol 30mcg.; S = Streptomycin 10mcg.; G = Gentamycin 10mcg.; K = Kanamycin 30mcg.; SXT = Sulfaemetoxazol-trimetoprin 25mcg.; T = Tetracycline 30mcg.; NF = Nitrofuran toin; NA = Nalidixic acid 30mcg.; (c) = Maximal concentration (ppm) at which growth was observed, (-) no growth; (d) = Plasmid DNA present (+), or absent (-). See text for further information.

Strain Origin (a) No	Pattern of Antimicrobial Resistances (b)	Pb (II)	Hg (II)	Cd (II)	Zn (II)	As (III)	Ag (I)	Plasmid DNA (d)
19 peritonitis	A,S,T.	—	—	62,5	125	250	—	+
283 pleural secretion	A,C,S.	500	1,9	62,5	125	250	—	+
361 broncho-pneumonia	A,C,S,G,K,SXT,T.	1000	3,9	31,2	62,5	500	—	+
412 pyloric ulcer	A,C,S,G,K.	500	1,9	31,2	250	500	—	+
513 u.t.i.	A,C,S,G,K,SXT,T.	125	7,8	7,8	250	1000	—	+
542 u.t.i.	A,C,S,G,K,SXT,T.	1000	1,9	15,6	250	1000	—	+
587 thoracotomy secretion	A,C,S.	125	15,6	31,2	62,5	125	3,9	+
813 sepsis	A,C,S,C,K,SXT,T.	62,5	—	15,6	62,5	125	—	+
1643 broncho-pneumonia	A,C,S,G,K,SXT,T,NF.	31,2	7,8	31,2	125	250	1,9	+
2225 broncho-pneumonia	A,C,S,G,SXT.	31,2	—	31,2	1000	3,9	7,8	+
2344 sepsis	A,G,X,SXT,NF.	15,6	1,9	1,9	31,2	125	—	—
2338 vesicle secretion	A,C,S,G,K,SXT,NF.	31,2	1,9	15,6	1000	1000	—	+
2429 u.t.i.	A,C,S,G,K,SXT,T,NA.	15,6	—	15,6	1000	62,5	—	+
2724 vesicle secretion	A,C,S,G,K,SXT,T.	31,2	3,9	31,2	62,5	62,5	—	+
3020 sepsis	A,C,G,X	15,6	1,9	31,2	15,6	62,5	—	+

Hinton Broth (Difco) inoculating 0.1ml of exponentially growing cultures of a density equivalent to tube n° 1 of the Mc. Farland Standard<sup>1</sup> (Difco). In the above determinations results were read after 24 h. of incubation at 37°C.

Genetic crosses to determine transmissibility of resistance markers were performed essentially as described (13). Equal volumes (1ml) of midlog phase cultures of donor and recipient were mixed and brought to 10ml on Müller Hinton Broth. After 2 h. incubation at 37°C, 0,1ml. Samples of donor-recipient mixes and separate control cultures of the parental strains were plated onto selective media, i.e. Müller Hinton Agar supplemented with the appropriate antibiotics. (All from Sigma, St. Louis, Mo. USA).

Plasmid DNA was analysed using the alkaline lysis procedure of Kado and Liu (1981) followed by agarose gel electrophoresis (8, 16).

## Results

Results indicating resistance to antimicrobial agents and plasmid content of *K. pneumoniae* strains are summarized in Table 1.

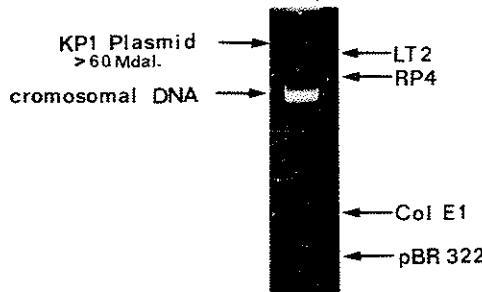
All *K. pneumoniae* strains showed multiresistance to antimicrobial agents and contained plasmid DNA; only strain 2344 was plasmid-less. A plasmid DNA species of high molecular weight (>60 Mdal) was of common occurrence in most strains; however, strain 412 contained a single plasmid species (36 Mdal.) and strains 813 and 2338 showed a plasmid band of lower molecular weight in addition to the >60 Mdal. plasmid.

To test whether antibiotic and heavy metal resistance markers were associated to a transmissible plasmid we chose *K. pneumoniae* strain 2724 as donor in a genetic cross with *Escherichia coli* K-12. Transconjugants were recovered that contained a high molecular weight plasmid (Figure 1) and became resistant to antimicrobial agents. The plasmid band observed in the gel corresponds in size to a plasmid band present in *K. pneumoniae* 2724 (data not shown). On the other hand, *E. coli* x 1553 does not contain plasmid DNA.

We have also detected transfer of the 36 Mdal. plasmid in *K. pneumoniae* 412 to another *K. pneumoniae* strain (data not shown).

The strain analysed is a transconjugant from a *K. pneumoniae* 2724-E. *coli* x 1553 cross, and is

Figure 1 - Plasmid KP1 from *Klebsiella pneumoniae* 2724 transferred to *Escherichia coli* -12 x 1553.



resistant to (A, S, C, G, K, SxT, [Cu(II), Hg(II), Cd(II), Pb(II)]) NA. *E. coli* x 1553 was obtained from Dr. Roy Curtiss III, Dept<sup>o</sup> of Biology, Washington University, St. Louis, n° 63130 USA, and is F<sup>-</sup> mina 1 pure 41 supE 42 - pdxC3 his53 gyrA28 metC65 ilv 277 cycB2 cycA1 hsdR2. The gyrA marker in *E. coli* x 1553 allows selection against the *K. pneumoniae* 2724 donor which is sensitive to nalidixic acid. LT2 (60 Md), RP4 (36 Md), Col EI (4,2 Md), pBR322 (2,8 Md) are plasmid molecular weight markers that run as indicated in the gel (0,7% agarose, Tris-Acetate buffer, pH 8,0); markers are contained in *E. coli* strains from the collection of one of us (J. Robeson).

### Discussion

Our results indicating multiresistance to antibiotics in the strains of *K. pneumoniae* analysed are in agreement with data of Guerrero & Col. (12) who found similar patterns of resistance in *Klebsiella* isolated from neonatal units in Chile and those of Perduca & Col. (21) who examined clinical isolates in Italy. However, resistance to heavy metal salts had not been previously reported for *K. pneumoniae* isolated in Chile. Furthermore, our results indicate genetic linkage in a plasmid unit between antibiotic and heavy metal

resistance markers. This situation has also been described by Foster (11).

We note that multiresistance in strain 2344 (Table 1) does not correlate with the presence of plasmid DNA. This might represent a case of integration of an R-factor into the bacterial chromosome as for plasmid RP4 (2).

The multiresistance observed taken together with the fact that the R-factor KP1 from *K. pneumoniae* 2724 is transferred intergenerically, points out *K. pneumoniae* as considerable health hazard in our nosocomial environment. First, the microorganism is difficult to control when implicated as an opportunistic pathogen and second it might represent an instance of propagation of R factors to other Enterobacteriaceae.

Therefore all preventive measures should be enforced within hospitals to curtail infections by *Klebsiella pneumoniae*. We sought to investigate resistance to antimicrobials in nosocomial isolates of *K. pneumoniae* in Chile. Our results suggest a plasmid associated joint resistance to antibiotics and heavy metal salts among the strains examined. This implicates *K. pneumoniae* as health hazard in our hospitals.

### Acknowledgments

We thank Maria Eugenia Pinto, at the

Microbiology Laboratory, Medical School of Chile University, San Juan de Dios Hospital, for providing the strain of *K. pneumoniae*, as well as the technical assistance of Vitalia Henríquez and Bernardo Prado at the Catholic University of Valparaíso.

### Summary

Clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from nosocomial origin in Chile, exhibit joint multiresistance to antibiotics and heavy metal associated to the presence of plasmids.

### References

1. Bauer, A.W.; Kirby, M.M.; Sherris, J.C. and Turck, M. - Antibiotic susceptibility testing by a standardized single Disk Method. The Amer. Jour. of Clin. Patol. Vol. 45(4):493-496, 1966.
2. Broda, P. - Plasmids. W.H. Freeman and Company. Oxford and San Francisco, 1979.
3. Casewell, M.W.; Phillips, I. - Aspects of the Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance and Epidemiology of *Klebsiella* Species. The Am. Jour. of Medicine, 70:559-462, 1981.
4. CDC. Bulletin "Enteric Section and Bacteriology Training Branch del CDC de Atlanta. Georgia USA".
5. Campos, V.; Robeson, J.; Cañas, P.; Joyas A. y Prado, B. - Multiresistencia a antibióticos y tolerancia a Metales pesados en *Klebsiella* de origen hospitalario. Programa resumos. Noveno Congresso Latino Americano de Microbiología. 168/345 pp.255, 1983.
6. Chaparro, E.; Andrade, S.; Acevedo, J.; Quesney, L. - Estudio de brote de infecciones intrahospitalarios por *Klebsiella*. Hosp. Clínico Universidad Católica. Arch. Soc. Cir. Chile. Vol. 11(1):55-58, 1969.
7. Cooke, E.M.; Sazegar, T.; Edmonson, A.S.; Brayson, J.C. and Hall, D. - *Klebsiella* species in hospital food and kitchens: a source of organisms in the bowel of patients. J. Hyg., Camb. 84:97-101, 1980.
8. Cross, J.H. and Falkow, S. - Plasmids, p.266-282. In: P. Gerhaedt, R.G. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Kried and G.B. Phillips (eds) Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1981.
9. Curtiss, II, R. - Gene Transfer, p.243-265. In: Gerhardt, R.G. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Rieg and G.B. Phillips (eds) Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1981.
10. Falkow, S. - Infections Multiple Drug Resistance, Pion Limited, London, 1975.
11. Foster, J.P. - Plasmid determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. Microbiol. Rev., 47:361-409, 1983.
12. Gerhardt, P.; Murray, R.G.; Costilow, R.N.; Nester, W.W.; Wood, W.A.; Kried, N.R. and Phillips (eds) Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1981.
13. González, M.; Pandolfi, E.; Award, J.; Mamani, R.; Villar, A. del; Araya, C.A.; Sanchez, E.; Araya, B. Experiencia de Sepsis a *Klebsiella* en el Servicio de Pediatría del Hospital "Dr. Juan Noé C." Rev. Chil. Ped., 51(5):332-336, 1980.
14. Guerrero, D.P.; Francote, N.; Pino, M.; y Vaisman, S. - Infección intrahospitalaria por *Klebsiella pneumoniae* en un brote de Sepsis en recién nacidos. Rev. Chil. Ped., 52(4):306-312, 1981.
15. Iverson, W.; P. Beikman - Microbial Metabolism of Heavy Metals. In: R. Mitchel, Water Pollution Microbiology. Editor USA Vol.2, 1978.
16. Kado, C.I. and Liu, S.T. - Rapid procedure for detection and isolation of Large and Small Plasmids, J. Bacteriol., 154:1365-1375, 1981.
17. Knittel, M.D.; R.J. Seidler, E.; Cheis, L.M. Cabe - Colonization of the Botanical Environment by *Klebsiella* Isolates of Pathogenic Origin. Appl. and Env. Microbiol., pp.557-563, 1977.
18. Markowitz, S.M.; Veazey, J.M.; Acrina, F.L.; Mayhail, G.C.; Lamb, V.A. - Sequential Outbreak of

- Infection due to *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal Intensive Care Unit: Implication of a Conjugative R. Plasmid. The Journal of Inf. dis., 142(1):106-112, 1980.
19. Mitsuhashi, S.; Hashimoto, H.; Iyobe, S. and Inonúe, M. - Formation of Conjugative Drug Resistance (R) Plasmid. In: Bukhari, A.I.; Shapiro, J.A.; Adhya, S.L. DNA. Insertion Elements, Plasmids and Episomes. 139-146, 1977.
20. Orskov, I. - The genus *Klebsiella* (medical aspect). En: Starr, M.; Stolp, H.; Truper, H.; Balows, A.; Schegel, H. The Prokaryotes. Springer-Verlag. Berlín, 1160-1165, 1981.
21. Perduca, M.; E. Romero, A. Turano. - Prevalenza e Transmissibilità del carattere lac<sup>+</sup> plasmidico in Stipiti Di. "Klebsiella" sp. con fenotipo Lac<sup>+</sup> Forte. Ann. Sclavo., 21(1):58-62, 1979.
22. Seidler, R.J. - The genus *Klebsiella* (non medical aspectis). In: Starr, M., H. Stelp, H. Truper, A. Balows, H. Schegel. The Prokaryotes. Springer-Verlag. Berlín. 1166-1172, 1981.
23. Summers, A.O. and Silver, S. - Microbial Transformation of Metals. Ann. Rev. Microbiol., 32:637-672, 1978.
14. Yañez, M.J.; Zamorano, M.; Díaz, C.; Guerra, P. - Análisis de la septicemia bacteriana en el neonato los Últimos cinco años en el Servicio de Pediatría del Hospital Regional Leonardo Guzmán, de Antofagasta, Rev. Chil. Ped., 52(3):213-217, 1981.
25. Zelada, M.; Ross, L.; Bosch, M.; Mayorga, C.; Marchant, E. - Infección Neonatal por *Klebsiella*, Estudio Clínico y Epidemiológico. Bol. Hosp. San Juan de Dios., 25(3):130-134, 1978.

Recebido para publicação em 28/06/88

# ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE MISTURAS PRONTAS DESTINADAS AO TEMPERO DE ALIMENTOS ("TEMPERO PRONTO")

Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco  
& Nanci Thoni Bergamo\*

Universidade de São Paulo  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Deptº de Alimentos e Nutrição  
Experimental  
Av. Prof. Lineu Prestes, 580  
Caixa Postal 30786  
01051 São Paulo SP, Brasil

## Resumo

Cinquenta amostras de misturas prontas destinadas ao tempero de alimentos, denominadas "Tempo pronto", à venda nos supermercados da cidade de São Paulo, foram submetidas à análise microbiológica para verificação da presença de bactérias causadoras de toxinfecções alimentares e para determinação dos níveis de contaminação por microrganismos deteriorantes. Estes produtos são compostos principalmente de cebola, alho, tomate, óleo, salsinha, pimentão e diversos condimentos (sal, pimenta do reino, orégano, entre outros). Em nenhuma das amostras foi detectada a presença de *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (como também coliformes fecais) e clostrídios sulfito-redutores. *Bacillus cereus* e bolores e leveduras foram detectados em 5 amostras, em níveis inferiores à 300 UFC/g. Bactérias esporulantes aeróbias termófilas do tipo flat-suor e bactérias esporulantes anaeróbias também não foram observadas. As bactérias aeróbias mesófilas variaram entre  $10^1$  e  $10^5$  UFC/g, as bactérias aeróbias termófilas e as bactérias esporulantes aeróbias mesófilas entre  $10^1$  e  $10^4$  UFC/g.

## Introdução

A necessidade de constante modernização das pequenas e grandes cozinhas tem provocado o surgimento, no mercado, de diversos tipos de produtos "prontos para uso", cuja finalidade principal é a simplificação da tarefa de preparar alimentos. Entre estes produtos incluem-se os "temperos prontos", que são misturas preparadas contendo os componentes mais comumente utilizados para temperar alimentos, ou seja, cebola, alho, salsa, tomate, pimentão, óleo e condimentos (pimenta do reino, sal, paprica, orégano e muitos outros). Diversas marcas comerciais podem ser encontradas no mercado, contendo variadas composições

destes componentes.

Embora estes "temperos prontos" contenham elementos desfavoráveis à proliferação microbiana, mesmo reduzidos níveis de contaminação podem assumir papel importante, uma vez que estes "temperos prontos" são destinados principalmente à alimentos perecíveis, como carnes, que são meios propícios ao desenvolvimento de microrganismos. Se a qualidade microbiológica do "tempo pronto" utilizado for insatisfatória, o alimento ao qual foi adicionado poderá ser o causador de uma toxinfecção alimentar, ou mesmo, deteriorar-se antes do previsto.

Este estudo pretendeu avaliar a qualidade microbiológica dos "temperos prontos" encontrados à venda em São

\*Bolsista de Iniciação Científica (FAPESP)

**Quadro 1 - Características das amostras de "tempero pronto" estudadas.**  
**Símbolos:** a = Dado encontrado no rótulo da embalagem; b = Determinado para uma amostra, utilizando-se o aparelho Novasina Mod. EEJA-3; c = Não determinada (esta marcada desapareceu do mercado durante o andamento da pesquisa).

Marca	Composição <sup>a</sup>	pH	Aa <sup>b</sup>	Nº de Amostras estudadas
A	cebola, alho, óleo de soja, louro, colorífico, pimenta do reino, coentro	3,33	0,929	14
B	cebolinha, óleo de soja, sal, alho, louro, pimenta do reino branca, orégano, paprica e coentro	3,86	0,937	6
C	cebola, alho, salsa, pimentão, vinagre, óleo, pimenta do reino, sal	3,23	0,823	6
D	desconhecida	3,16	0,928	6
E	desconhecida	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>	5
F	cebola, alho, óleo, vegetal, s.s.i., vinagre, condimentos	3,42	0,922	13

Paulo, investindo-se a presença de microrganismos associados a gastroenterites de origem alimentar e de microrganismos responsáveis por processos de deterioração. Pretendeu-se, desta forma, conhecer o potencial destes produtos como fonte de contaminação microbiana dos alimentos aos quais são destinados.

#### Material e Métodos

**Obtenção das amostras** - 50 amostras de "temperos prontos", pertencentes a 6 marcas comerciais distintas, foram adquiridas em supermercados da cidade de São Paulo, no período entre agosto de 1987 e maio de 1988. As amostras estavam acondicionadas em frascos de vidro hermeticamente fechados. No Quadro I são apresentadas algumas características das amostras estudadas.

**Preparo das amostras para análise** - Exceto quando especificado, 25g de amostra foram homogeneizados com 225ml de água tamponada pH 7,2, estéril, utilizando-se um bastão homogeneizador estéril. A partir da diluição 10<sup>-1</sup> assim obtida, procedeu-se à diluição decimal seriada, até 10<sup>-3</sup>, utilizando-se água tamponada pH 7,2 como diluente. As três diluições assim obtidas foram utilizadas em todas as determinações microbiológicas, exceto quando especificado.

#### Análise microbiológica

**1. Pesquisa de *Salmonella* sp** [4]: 25g de produto foram homogeneizados com 225ml de caldo lactosado, paralelamente à outra porção de 25g, que era homogeneizada com 225ml de água peptonada a 1%. Os dois meios de cultura continham 0,5% de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, de acordo com recomendação de Wilson e Andrews (17). Após a incubação de ambos a 35°C durante 24h, 1ml de cada um foi transferido para 10ml de caldo tetratrationato de Kauffman e para 10ml de caldo selenito-cistina, que foram incubados a 35°C. Após 24h, 48h e 5 dias foram realizadas semeaduras em placas contendo agar SS e agar verde-brilhante. Colônias suspeitas foram submetidas aos testes bioquímicos adequados (Enterokit, Probac do Brasil Prod. Bacteriológicos).

**2. Enumeração de clostrídios sulfito-redutores** [4]: Nesta determinação empregou-se a técnica da semeadura em profundidade, utilizando-se agar sulfito polimixina sulfadiazina. Após solidificação da mistura, acrescentou-se uma camada adicional de agar (5ml). A incubação foi realizada a 44°C durante 48h, em anaerobiose (sistema Gaspak). Colônias suspeitas foram submetidas aos testes bioquímicos recomendados.

**3. Enumeração de *Bacillus cereus*** [4]: Empregou-se a técnica de semeadura em

superfície em agar gema de ovo polimixina vermelho fenol, com posterior incubação a 30°C durante 48h. Colônias suspeitas foram identificadas através de testes bioquímicos apropriados.

**4. Determinação do Número Mais Provável de *Staphylococcus aureus* (4):** Foi utilizada a técnica dos tubos múltiplos, empregando-se caldo soja tripticase com NaCl a 10% e incubação a 35°C durante 48h. A partir dos tubos apresentando crescimento bacteriano foram semeadas placas de agar Baird-Parker para isolamento de colônias características. Testes bioquímicos apropriados foram empregados para a identificação de colônias suspeitas. A determinação do Número Mais Provável de *S. aureus* foi realizada empregando-se a Tabela de Hoskins.

**5. Determinação do Número Mais Provável de coliformes fecais (4):** Foi utilizada a técnica dos tubos múltiplos, empregando-se caldo lauril sulfato triptose na etapa correspondente ao teste presuntivo (incubação a 35°C durante 48h) e caldo EC na etapa do teste confirmatório (incubação a 44,5°C durante 24h). A determinação do Número Mais Provável de coliformes fecais foi realizada empregando-se a Tabela de Hoskins.

**6. Pesquisa de *Escherichia coli* (4):** A partir dos tubos contendo caldo EC, utilizados na quantificação de coliformes fecais, que apresentavam turvação, com ou sem gás no interior do tubo de Durham, foram semeadas placas de agar eosina azul de metíleno. Colônias suspeitas foram identificadas utilizando-se testes bioquímicos apropriados (Enterokit, Probac do Brasil Prod. Bacteriológicos Ltda.).

**7. Enumeração de bolores e leveduras (4):** A técnica empregada foi a de semeadura em profundidade, utilizando-se agar batata dextrose acidificado com ácido tartárico a 10% (pH 4,0). A incubação das placas foi feita a 25°C durante 5 dias.

**8. Enumeração de bactérias aeróbias mesófilas (4):** Foi utilizada a técnica de semeadura em profundidade,

empregando-se agar padrão para contagem, com incubação a 35°C durante 48h.

**9. Enumeração de bactérias aeróbias termófilas (4):** Foi utilizada a técnica de semeadura em profundidade, empregando-se agar padrão para contagem, com incubação a 55°C durante 48h.

**10. Enumeração de bactérias esporulantes aeróbias mesófilas (1):** 50g de amostra foram homogeneizados com 450ml de água peptonada a 0,1%, misturando-se, em seguida, porções de 10ml, 1ml e 0,1ml deste homogeneizado com 100ml de agar dextrose triptona fundido. As três misturas foram inicialmente aquecidas a 80°C durante 30min e em seguida, a 45°C por 10min. Cada mistura foi então distribuída em 5 placas de Petri, que foram incubadas a 35°C durante 48h. O número de bactérias esporulantes aeróbias foi determinado efetuando-se a contagem de todas as colônias surgidas nas 5 placas.

**11. Enumeração de bactérias esporulantes aeróbias termófilas do tipo flat-sour (14):** 10ml da diluição 10<sup>-1</sup> da amostra foram misturados à 100ml de agar dextrose triptonada purpura de bromocresol, ainda líquido. Esta mistura foi autoclavada a 5lb/pol<sup>2</sup> durante 10min e então, distribuída em 5 placas de Petri, que foram incubadas a 55°C durante 48h. O número de bactérias esporulantes aeróbias termófilas do tipo flat-sour foi determinado através da contagem de todas as colônias surgidas nas 5 placas.

**12. Enumeração de bactérias esporulantes anaeróbias (14):** 25g de amostra foram homogeneizados com 225ml de água tamponada pH 7,2, sendo esta mistura fervida durante 5min. Diluições decimais desta mistura aquecida foram então preparadas efetuando-se em seguida a semeadura em profundidade, utilizando agar padrão para contagem. A incubação foi feita a 32°C durante 3 dias, em anaerobiose (Sistema Gaspak).

## Resultados

Verificou-se que em nenhuma das 50

amostras de "tempero pronto" estudadas foi possível detectar a presença dos seguintes microrganismos: *Salmonella* sp., coliformes fecais, *Escherichia coli*, clostrídios sulfito-redutores, *Staphylococcus aureus*, bactérias esporulantes aeróbias termófilas (tipo flat-sour) e bactérias esporulantes anaeróbias. *Bacillus cereus* foi detectado em níveis baixos (300 UFC/g) em 5 amostras, o mesmo acontecendo com o grupo dos bolores e leveduras, detectados somente em 5 amostras (300 UFC/g).

Bactérias aeróbias mesófilas, bactérias aeróbias termófilas e bactérias esporulantes mesófilas foram observadas em todas as 50 amostras estudadas, em números que variaram entre  $10^1$  e  $10^5$  UFC/g (Tabela 1). Entre as 6 marcas comerciais estudadas, verificou-se que duas delas (B e E) apresentaram sempre os menores índices de contaminação por estes microrganismos (Tabela 2).

## Discussão

A avaliação da qualidade microbiológica das amostras estudadas precisa ser feita com cuidado. A ausência de microrganismos patogênicos, exceção feita à poucas amostras contendo baixos níveis de *B. cereus*, permite-nos concluir que os "temperos prontos" dificilmente se comportariam como fontes de contaminação por microrganismos causadores de toxinfecções alimentares. Entretanto, a relativa alta freqüência de microrganismos deteriorantes, esporulados ou não, indica que os "temperos prontos" podem carregar cargas microbianas significativas. Embora desfavoráveis à proliferação microbiana, já que são ácidos (pH entre 3,2 e 3,9) e de umidade intermediária ( $\Delta\alpha$  entre 0,82 e 0,92), os "temperos prontos" são destinados à alimentos que, se não processados e/ou conservados adequadamente, após a adição do "tempero pronto" poderão ter vida útil menor do que a esperada (10, 12). Convém ressaltar que boa parte da flora deteriorante detectada encontra-se na forma esporulada, não afetada pela acidez nem pela umidade insuficiente.

São praticamente inexistentes trabalhos de pesquisa nacionais ou

mesmo estrangeiros relativos à produtos destinados ao tempero de alimentos. A maioria dos estudos refere-se à qualidade microbiológica de condimentos (2, 7, 8, 9, 11, 13, 16), e de molhos mexicanos (3). Verifica-se que o nível de contaminação dos condimentos é bastante variável, dependendo de vários fatores, principalmente das condições de produção, sendo frequente o isolamento de patógenos como *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* e *Bacillus cereus*. No caso específico dos "temperos prontos", em cuja formulação são utilizados diversos tipos de condimentos, é possível que os patógenos sejam eliminados pela ação isolada ou conjunta dos componentes antimicrobianos dos condimentos. Entre estes componentes, destacam-se os compostos dissulfidrílicos alifáticos voláteis presentes no alho e na cebola, o carvacrol do orégano, a capsaicina da paprica, entre outros (6, 15). Os componentes dissulfidrílicos do alho e da cebola tem comprovada atividade bactericida para *Salmonella* sp. e *E. coli* (6). Muitos condimentos apresentam efeito inibitório para *Staphylococcus aureus* (13).

Os agentes inibitórios presentes nos "temperos prontos" poderiam ter causado o surgimento de resultados falso-negativos. Na verdade, a ação destes agentes nos diversos meios de cultura utilizados é eliminada pela diluição da amostra (4). Somente no caso de ser necessário misturar grande quantidade de amostra ao meio de cultura, como ocorre na pesquisa *Salmonella* sp., é necessário bloquear a ação inibitória dos componentes químicos, o que pode ser obtido, segundo Wilson e Andrews (17), pela adição de  $Na_2SO_3$  ou  $K_2SO_3$  ao meio de pré-enriquecimento.

Relativamente às normas legais vigentes em nosso país (Portaria 01/87, Ministério da Saúde), ou seja, ausência de *Salmonella* em 25g do produto, coliformes fecais máximo 1 por grama e bolores e leveduras máximo  $5 \times 10^3$  UFC/g, verifica-se que todas as amostras estudadas devem ser consideradas aceitáveis para consumo humano. De acordo com Jay (5), alimentos desta espécie deveriam apresentar contagem total de bactérias inferior a  $10^5$  por grama e ausência de coliformes e de bactérias patogênicas.

Tabela 1 - Níveis de contaminação microbiana de 50 amostras de "tempero pronto".

Símbolos: \* = Unidades formadoras de colônia por grama de amostra.

Nível de contaminação (UFC/g)*	Bactérias aeróbias mesófilas		Bactérias aeróbias termófilas		Bactérias esporulantes aeróbias mesófilas	
	nº de amostras	(%)	nº de amostras	(%)	nº de amostras	(%)
<10 <sup>2</sup>	5	10,0	13	26,0	14	28,0
10 <sup>2</sup> — 10 <sup>3</sup>	16	32,0	32	64,0	18	36,0
10 <sup>3</sup> — 10 <sup>4</sup>	25	50,0	5	10,0	18	36,0
10 <sup>4</sup> — 10 <sup>5</sup>	4	8,0	0	0	0	0
>10 <sup>5</sup>	0	0	0	0	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>50</b>	<b>100,0</b>	<b>50</b>	<b>100,0</b>	<b>50</b>	<b>100,0</b>

Tabela 2 - Análise microbiológica de 50 amostras de "tempero pronto" pertencentes às marcas comerciais, A, B, C, D, E e F.

Símbolos: \* = Unidades formadoras de colônia por grama de amostra.

Microorganismos	UFC/g*	A		B		C		D		E		F	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Bactérias aeróbias mesófilas	<10 <sup>2</sup>	0	0	4	66,7	0	0	1	20,0	0	0	0	0
	10 <sup>2</sup> — 10 <sup>3</sup>	4	28,6	2	33,3	3	50,0	1	16,7	4	80,0	2	15,4
	10 <sup>3</sup> — 10 <sup>4</sup>	10	71,4	0	0	3	50,0	3	50,0	0	0	9	69,2
	10 <sup>4</sup> — 10 <sup>5</sup>	0	0	0	0	0	0	2	33,3	0	0	2	15,4
Bactérias aeróbias termófilas	>10 <sup>5</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	< 10 <sup>2</sup>	2	14,3	5	83,3	2	33,3	1	16,7	3	50,0	0	0
	10 <sup>2</sup> — 10 <sup>3</sup>	10	71,4	1	16,7	4	66,7	5	83,3	2	40,0	10	77,0
	10 <sup>3</sup> — 10 <sup>4</sup>	2	14,3	0	0	0	0	0	0	0	0	3	23,0
Bactérias esporulantes aeróbias mesófilas	> 10 <sup>4</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	< 10 <sup>2</sup>	2	14,3	6	100,0	1	16,7	1	16,7	4	80,0	0	0
	10 <sup>2</sup> — 10 <sup>3</sup>	7	50,0	0	0	5	83,3	3	50,0	3	20,0	2	15,4
	10 <sup>3</sup> — 10 <sup>4</sup>	5	35,7	0	0	0	0	2	33,3	0	0	11	84,6
<b>TOTAL DE AMOSTRAS</b>		<b>14</b>	<b>100,0</b>	<b>6</b>	<b>100,0</b>	<b>6</b>	<b>100,0</b>	<b>5</b>	<b>100,0</b>	<b>5</b>	<b>100,0</b>	<b>13</b>	<b>100,0</b>

Neste caso, 10% das amostras estudadas não se enquadriaram nestas recomendações devido à constatação de *B. cereus*.

Relativamente aos resultados fornecidos pelas amostras pertencentes às 6 marcas estudadas, verificou-se a ausência de diferenças marcantes entre elas. No entanto, as amostras das marcas B e E foram as que apresentaram menores índices de contaminação por bactérias aeróbias mesófilas e termófilas e por bactérias esporulantes aeróbias mesófilas. Curiosamente, estas duas marcas são justamente as que tem menor preço de venda.

#### Summary

#### *Microbiological quality of ready-to-use food seasonings*

The microbiological quality of 50 samples of ready-to-use food seasonings, purchased in supermarkets of the city of São Paulo, Brazil, was assessed. Onion, garlic, tomato, parsley, red pepper, soy oil and spices (black pepper, salt, paprika and others) were the main components of these seasonings. The study comprised

pathogenic bacteria as well as spoilage-associated microorganisms. Results were negative for *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, fecal coliforms and sulfite-reducing clostridia. *Bacillus Cereus* and fungi were observed only in 5 samples (less than 300 UFC/g). Thermophilic aerobic sporeformers and anaerobic sporeformers were not detected. Mesophilic aerobes varied from  $10^1$  to  $10^5$  CFU/g, thermophilic aerobes as well as mesophilic aerobic sporeformers varied from  $10^1$  to  $10^4$  CFU/g.

#### Agradecimentos

À FAPESP, pelo auxílio financeiro (processos nº 87/1627-0 e 87/1628-7), à FRIGOBRÁS, Companhia Brasileira de Frigoríficos, pelas determinações de Aa, e à Mariza Landgraf, pelas valiosas sugestões.

#### Referências Bibliográficas

1. American Public Health Association: Compendium of methods for the microbiological examination of foods 2nd ed. Washington, APHA, 1984.
2. Christensen, G.M.; Fanse, H.A.; Nelson, G.H.; Bates, F. & Mirocha, C.J. - Microflora of black pepper. Appl. Microbiol., 15:622-626, 1967.
3. Draughon, F.A.; Elahi, M. & McCarty, I.E. - Microbial Spoilage of mexican-style sauces. J. Food Prot., 44:284-287, 1981.
4. International Commission of Microbiological Examination of Foods. Microorganisms in foods. 1. Their significance and methods of enumeration, 2nd ed. University of Toronto Press. Toronto, 1978.
5. Jay, J.M. - Modern Food Microbiology. Van Nostrand Reinhold Company, New York, 3rd ed, 1986.
6. Johnson, M.G. & Vaughn, E.H. - Death of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* in the presence of freshly reconstituted dehydrated garlic and onion. Appl. Microbiol., 17:903-905, 1969.
7. Julseth, R.M. & Deibel, R.H. - Microbial profile of selected spices and herbs at import. J. Milk Food Technol., 37:414-419, 1974.
8. Karlson, K.E. & Gunderson, M.F. - Microbiology of dehydrated soups. II. "Adding Machine" approach. Food Technol., 19:86-90, 1965.
9. Leitão, M.F.F.; Delazari, I. & Mazzoni, H. - Microbiologia de alimentos desidratados. Col. ITAL, 5:223-242, 1973/74.
10. Pivnick, H. - Spices. In: International Commission on Microbiological specification of foods. Microbial ecology of foods. Vol. 2. Food commodities. Academic Press, 1980.
11. Powers, E.M.; Lawyer, R. & Masuoka, Y. - Microbiology of processed spices. J. Milk Food Technol., 38:683-687, 1975.
12. Reiman, H. - Foodborne infections and intoxications. Academic Press, New York, 1969.
13. Schwab, A.H.; Harpestad, A.D.; Swartzentruber, A.; Lanier, J.M.; Wentz, B.A.; Duran, A.P.; Barnard, R.J. & Read Jr., R.B. - Microbiological quality of some spices and herbs in retail markets. Appl. Environm. Microbiol., 44:627-630, 1982.
14. Sharf, J.M. - Exame microbiológico de alimentos. Polígono. São Paulo, 1966.
15. Shelef, L.A.; Naglik, O.A. & Bogen, D.W. - Sensitivity of some common food-borne bacteria to the spices sage, rosemary and allspice. J. Food Sci., 45:1041-1044, 1980.
16. Sheneman, J.M. - Survey of aerobic mesophilic bacteria in dehydrated onion products. J. Food Sci., 38:206-209, 1973.
17. Wilson, C. & Andrews, W.H. - Sulfite compounds as neutralizers of spice toxicity for *Salmonella*. J. Milk Food Technol., 39:464-466, 1976.

Recebido para publicação em 22/08/88

UTILIZAÇÃO DE BACTÉRIAS E FUNGOS COMO INDICADORES NA AVALIAÇÃO DE FATORES  
FISIOGRÁFICOS QUE INTERFEREM NOS PROCESSOS DE AUTO-DEPURAÇÃO DE UM CÓRREGO  
SUB-TROPICAL

Maria Therezinha Martins

Walderez Gambale

Claudete Rodrigues Paula

Vivian Helena Pellizari

Deptº de Microbiologia

Instituto de Ciências Biomédicas

Av. Prof. Lineu Prestes, 1374

05508 São Paulo SP, Brasil

Eunice F. Matsumoto

Genê Ribeiro

Bolsista IDRC

Sandra Malateaux

Instituto Adolfo Lutz

& Maria Helena Mayer

Instituto de Pesca

Secretaria da Agricultura

Pesquisa realizada com apoio do CNPq

### Resumo

O estudo de autodepuração de um córrego sub-tropical, Córrego do Agrião, afluente do Rio Jacaré-Pepira, S.P., que recebe esfluentes de resíduos domésticos e pecuários foi efetuado utilizando-se indicadores biológicos: coliformes totais (CT) e fecais (CF), estreptococos fecais (EF), fungos aquáticos e geofungos. O período de estudo abrangeu duas estiagens e um período de chuvas. Foi observada a influência das condições fisiográficas na auto-depuração do curso d'água. A relação CF/EF possibilitou a caracterização da origem dos despejos e constatou-se que o número de leveduras, (U.F.C./ml), foi bom indicador de poluição de origem fecal, o que não ocorreu com bactérias aquáticas e terrestres.

### Introdução

No estudo dos processos de autodepuração de um corpo d'água os parâmetros biológicos, principalmente bactérias e fungos, têm papel preponderante. Do ponto de vista de Saúde Pública, os aspectos sanitários devem ser enfocados estudando-se o comportamento dos indicadores de poluição de origem fecal, sendo mais comumente utilizados os coliformes, principalmente o grupo dos coliformes fecais ou termotolerantes e os

estreptococos fecais (2).

Coliformes fecais têm sido os indicadores de uso mais frequente na avaliação da qualidade da água, quanto ao aspecto sanitário e inclusive é o proposto na legislação vigente em nosso país (3).

Os estreptococos fecais são também excretados nas fezes de humanos, embora em quantidade inferior a *Escherichia coli*, mas ocorrem em número superior aos coliformes fecais nas fezes de outros animais homeotermos. Estudos da relação entre coliformes fecais e

estreptococos fecais visando definir a origem de uma fonte de poluição têm sido realizados em outros países (12), e os resultados obtidos indicam sua utilidade. No Brasil poucas pesquisas foram realizadas sobre este tema (20).

Fungos têm sido propostos também como indicadores biológicos de poluição. Tem sido citado que águas não poluídas apresentam número relativamente elevado de espécies de fungos aquáticos verdadeiros: águas moderadamente poluídas apresentam menor quantidade de espécies destes fungos e maior número de espécies de geofungos; por outro lado, águas intensamente poluídas apresentam grande número de fungos do solo, principalmente leveduras. A associação entre o número e grupos de fungos e a carga orgânica sugere que fungos podem ser bons indicadores de poluição (4, 5). Poucas pesquisas, no entanto, têm sido realizadas no continente americano abordando o tema, porém o Japão e países europeus têm enfocado este assunto com maior intensidade (2).

No Brasil foram realizadas pesquisas para se estudar o comportamento de bolores e leveduras em águas (8, 13, 23, 25) porém os verdadeiros fungos aquáticos não vêm sendo pesquisados.

Nestes estudo procurou-se verificar em um curso d'água subtropical, utilizando como modelo, o córrego do agrião, os níveis de indicadores bacterianos de poluição fecal, de geofungos e fungos aquáticos e a interferência das condições fisiográficas sobre os mesmos.

#### Material e Métodos

**Caracterização da área** - O Córrego do Agrião é formado por três nascentes. A água provinda de uma destas nascentes espraia-se por uma área plana formando um brejo, o qual é mantido em uma faixa relativamente estreita, através de uma drenagem artificial que consiste em uma canaleta de terra. Esta água após percorrer uma distância de aproximadamente 150m, segue um percurso em direção às outras nascentes, encontrando-se 3m à jusante. A drenagem das outras duas nascentes é efetuada através de um sistema de manilhas perfuradas que transportam a água de superfície para reservatório de

alvenaria. O escoamento dos dois reservatórios é realizado através de manilhas com uma distância de 150m. Logo após o encontro das três nascentes, a água sofre uma queda de 15m, formando uma pequena cachoeira sobre rochas basálticas. Após percorrer aproximadamente 23m, onde o leito é coberto por pedras, forma-se outra cachoeira de 15m, e a água cai através de dois degraus que distam aproximadamente 3m um do outro. Continuando o seu percurso por entre pedras grandes entremeadas por outras pequenas e, sobre fundo arenoso, a água percorre aproximadamente 231m, os quais são constituídos por áreas de corredeiras e por pequenas poças represadas pelas rochas. É neste trecho que deságua o efluente doméstico de 58 pessoas residentes na fazenda Bela Vista e de outras, de residência transitória.

A seguir, em uma cachoeira de aproximadamente 50m de altura, a água espalha-se em pequenos filetes sobre um paredão de rochas basálticas clivadas e ligeiramente intemperizadas e novamente, volta a correr por entre fragmentos grandes e pequenos de rochas basálticas sobre fundo arenoso. Nesse trecho, a água de lavagem do curral, onde 170 cabeças de gado são mantidas, é lançada duas vezes ao dia. Após um percurso sinuoso de aproximadamente 400m, o Córrego do Agrião, que corria sob a mata secundária, passa a percorrer uma região de vegetação baixa incluindo uma área de pasto, onde cerca de 80 cabeças de gado alimentam-se naturalmente, atingindo depois de 465m, um brejo recoberto por capim e que tem uma extensão linear de aproximadamente 170m em direção à foz do córrego. A poucos metros da foz a água do Córrego do Agrião volta a formar um canal que, margeando o brejo, atinge o Córrego da Cachoeira e uma altitude de 520m.

Na Tabela 1 estão caracterizados os pontos de amostragem.

**Amostras** - Um total de 270 amostras de água correspondentes a 15 estações de amostragem, previamente demarcadas no Córrego do Agrião - Bacia do Rio Jacaré-Pepira, foram examinadas no período de maio-85 a agosto-86. A coleta foi realizada mensalmente.

Frascos de plástico autoclaváveis, não tóxicos e estéreis, foram

Tabela 1 - Localização dos pontos de coleta de água no Córrego de Agrião.

- 
- Ponto 4 - 2 m a jusante do encontro das três nascentes.  
 Ponto 5 - 25 m a jusante do ponto 1. Pé da cachoeira de 15 m.  
 Ponto 6 - 79 m a jusante do ponto 2, o que corresponde a 20 m a montante da entrada do esgoto doméstico.  
 Ponto 7 - 3 m a jusante da entrada do esgoto doméstico ou seja, 25 m a jusante do ponto 3.  
 Ponto 8 - 30 m a jusante do ponto anterior.  
 Ponto 9 - 80 m a jusante do ponto 5, ou seja, 3 m a montante da cachoeira de 50 m de altura.  
 Ponto 10 - 150 m a jusante da cachoeira.  
 Ponto 11 - 40 m a jusante do ponto anterior. Local da entrada do esgoto pecuário.  
 Ponto 13 - 13 m a jusante do ponto 11.  
 Ponto 14 - 48 m a jusante do ponto 13.  
 Ponto 15 - 140 m a jusante. Término da zona de mata e da parte mais íngreme.  
 Ponto 16 - 250 m a jusante. Término da zona de capoeira; início da região aberta; só lo recoberto por capim.  
 Ponto 17 - 75 m a jusante do ponto 15, próximo à cerca, na região plana, com vegetação rasteira.  
 Ponto 18 - 100 m a jusante do ponto anterior.  
 Ponto 20 - 120 m a jusante, junto à foz do córrego.
- 

utilizados para a coleta. As amostras foram transportadas em caixas de isopor com gelo e examinadas dentro de 24 horas (2).

**Pesquisa de fungos aquáticos** - Sementes de cânhamo (*Cannabis sativa*), cortadas no sentido longitudinal, foram colocadas com a parte cortada para baixo, em placas de Petri estéreis contendo 20ml da amostra. A incubação foi realizada à temperatura ambiente e sob luminosidade normal e as leituras foram realizadas do 2º dia até o 7º dia. A identificação foi efetuada até gênero com auxílio de bibliografia convencional (4).

**Contagem e identificação de bactérias** - Foi utilizada a técnica de incorporação em ágar para contagem e isolamento de bactérias. Adicionou-se 1ml da amostra de ágar Sabouraud-dextrose (Difco) com 100 µg/ml de cloranfenicol. A incubação foi realizada a 27°C durante 5 dias e a identificação foi feita até gênero segundo bibliografia convencional.

**Contagem e identificação de leveduras** - Na contagem e isolamento de leveduras foi empregada a técnica de incorporação em ágar com inóculo de 1,0ml. Os seguintes meios e temperaturas foram utilizados: 1) ágar Sabouraud-dextrose (Difco) acrescido de cloranfenicol (100

µg/ml), acidificado com HCl 0,1N (pH 5,0), incubação a 25°C, durante 5 a 30 dias. 2) ágar peptona, dextrose, extrato de levedura acidificado com ácido lático a 10% (pH 3,5), incubação a 15°C, durante 5 a 30 dias (Symard & Blacwood (28). 3) meio acima com acréscimo de 100µg/ml de cloranfenicol, incubação a 15°C 30 dias. Após incubação, as colônias morfológicamente representativas eram semeadas em tubos contendo ágar Sabouraud dextrose (25°C), sendo as leveduras identificadas segundo critérios de Lodder, 1970 (18) e Kreger-van Rij, 1984 (16).

**Pesquisa de coliformes totais (CT) e coliformes fecais (CF) e estreptococos fecais (EF)** - Foi realizada através da técnica dos tubos múltiplos segundo Standard Methods, 16ª ed. (2).

#### Resultados e Discussão

Bactérias indicadoras de poluição de origem fecal relação CF/EF - Os resultados referentes a estes parâmetros encontram-se nas Tabelas 2 e 3.

Na Tabela 2 pode-se apreciar as variações das médias geométricas de coliformes totais e fecais e de estreptococos fecais, bem como a relação CF/EF, nas épocas de estiagem e

**Tabela 2 - Resultados bacteriológicos - Périodos de chuva e estiagem - Média geométrica.**

Pontos de estiagem	Período de Estiagem-Máis/Séquencia/85				Período de Chuva-Out/Dez/85 à Jan/Mar/86				Período de Estiagem-Abr/Ago/86				Resultado Geral Mai/85 à Ago/86			
	CF	EF	CF/EF	CT	CF	EF	CF/EF	CT	CF	EF	CF/EF	CT	CF	EF	CF/EF	
4	8,2x10 <sup>-3</sup>	3,3x10 <sup>-3</sup>	1,7x10 <sup>-3</sup>	1,9	9,3x10 <sup>-4</sup>	2,4x10 <sup>-4</sup>	3,9x10 <sup>-2</sup>	0,1,5	1,7x10 <sup>-2</sup>	2,6x10 <sup>-2</sup>	1,6x10 <sup>-2</sup>	1,6	2,1x10 <sup>-4</sup>	3,1x10 <sup>-3</sup>	6,8x10 <sup>-2</sup>	4,6
5	7,2x10 <sup>-3</sup>	1,1x10 <sup>-3</sup>	6,0x10 <sup>-2</sup>	1,9	1,4x10 <sup>-5</sup>	3,8x10 <sup>-4</sup>	6,2x10 <sup>-2</sup>	0,2,0	1,4x10 <sup>-5</sup>	2,8x10 <sup>-3</sup>	1,0x10 <sup>-3</sup>	2,7	5,1x10 <sup>-4</sup>	6,6x10 <sup>-3</sup>	6,1x10 <sup>-2</sup>	10,8
6	1,3x10 <sup>-4</sup>	7,8x10 <sup>-2</sup>	1,7x10 <sup>-3</sup>	0,5	9,9x10 <sup>-3</sup>	4,0x10 <sup>-3</sup>	2,3x10 <sup>-3</sup>	1,6	2,3x10 <sup>-4</sup>	4,1x10 <sup>-2</sup>	1,4x10 <sup>-3</sup>	0,3	1,4x10 <sup>-4</sup>	1,0x10 <sup>-3</sup>	1,8x10 <sup>-3</sup>	0,6
7	2,6x10 <sup>-5</sup>	1,0x10 <sup>-3</sup>	7,7x10 <sup>-3</sup>	1,2	1,7x10 <sup>-5</sup>	2,2x10 <sup>-4</sup>	5,6x10 <sup>-3</sup>	4,2	1,2x10 <sup>-4</sup>	5,9x10 <sup>-3</sup>	0,2	7,8x10 <sup>-4</sup>	6,1x10 <sup>-3</sup>	5,9x10 <sup>-3</sup>	1,9	
8	9,8x10 <sup>-4</sup>	1,1x10 <sup>-4</sup>	2,9x10 <sup>-3</sup>	4,0	2,4x10 <sup>-4</sup>	1,5x10 <sup>-4</sup>	5,4x10 <sup>-3</sup>	2,6	2,0x10 <sup>-4</sup>	5,1x10 <sup>-3</sup>	6,9x10 <sup>-3</sup>	0,7	3,5x10 <sup>-4</sup>	6,7x10 <sup>-3</sup>	4,8x10 <sup>-3</sup>	2,0
9	5,0x10 <sup>-4</sup>	1,2x10 <sup>-3</sup>	7,6x10 <sup>-3</sup>	0,2	2,5x10 <sup>-4</sup>	7,0x10 <sup>-3</sup>	1,4x10 <sup>-3</sup>	4,3	1,4x10 <sup>-4</sup>	4,9x10 <sup>-3</sup>	2,5x10 <sup>-3</sup>	1,9	2,6x10 <sup>-4</sup>	4,1x10 <sup>-3</sup>	5,4x10 <sup>-3</sup>	0,8
10	5,4x10 <sup>-3</sup>	6,0x10 <sup>-2</sup>	1,4x10 <sup>-3</sup>	0,5	1,3x10 <sup>-4</sup>	4,0x10 <sup>-3</sup>	4,2x10 <sup>-2</sup>	9,1	7,8x10 <sup>-3</sup>	1,3x10 <sup>-3</sup>	2,1x10 <sup>-3</sup>	0,6	6,6x10 <sup>-3</sup>	1,4x10 <sup>-3</sup>	9,3x10 <sup>-2</sup>	1,6
11	3,4x10 <sup>-4</sup>	6,0x10 <sup>-3</sup>	8,7x10 <sup>-3</sup>	0,7	6,8x10 <sup>-3</sup>	4,2x10 <sup>-3</sup>	1,1x10 <sup>-3</sup>	3,8	1,0x10 <sup>-4</sup>	1,6x10 <sup>-3</sup>	1,6x10 <sup>-3</sup>	1,0	1,3x10 <sup>-4</sup>	2,9x10 <sup>-3</sup>	2,5x10 <sup>-3</sup>	1,2
13	1,9x10 <sup>-4</sup>	5,3x10 <sup>-3</sup>	6,0x10 <sup>-3</sup>	0,9	1,1x10 <sup>-4</sup>	2,2x10 <sup>-3</sup>	1,3x10 <sup>-3</sup>	1,6	2,3x10 <sup>-3</sup>	2,3x10 <sup>-3</sup>	2,3x10 <sup>-3</sup>	0,2	7,6x10 <sup>-3</sup>	1,6x10 <sup>-3</sup>	2,9x10 <sup>-3</sup>	0,5
14	5,6x10 <sup>-3</sup>	1,1x10 <sup>-3</sup>	1,3x10 <sup>-3</sup>	0,8	6,2x10 <sup>-3</sup>	2,7x10 <sup>-3</sup>	1,1x10 <sup>-3</sup>	2,3	2,7x10 <sup>-3</sup>	1,2x10 <sup>-2</sup>	1,7x10 <sup>-3</sup>	0,6	4,1x10 <sup>-3</sup>	7,6x10 <sup>-3</sup>	1,6x10 <sup>-3</sup>	0,5
15	3,6x10 <sup>-3</sup>	1,5x10 <sup>-3</sup>	1,4x10 <sup>-3</sup>	1,1	7,3x10 <sup>-3</sup>	3,0x10 <sup>-3</sup>	4,8x10 <sup>-2</sup>	6,3	1,7x10 <sup>-3</sup>	1,4x10 <sup>-2</sup>	1,5x10 <sup>-3</sup>	0,1	3,7x10 <sup>-3</sup>	9,2x10 <sup>-3</sup>	9,6x10 <sup>-2</sup>	1,0
16	2,0x10 <sup>-3</sup>	5,6x10 <sup>-2</sup>	6,0x10 <sup>-2</sup>	0,9	1,5x10 <sup>-4</sup>	6,3x10 <sup>-3</sup>	1,5x10 <sup>-3</sup>	4,4	3,2x10 <sup>-3</sup>	2,5x10 <sup>-3</sup>	1,7x10 <sup>-3</sup>	0,2	4,8x10 <sup>-3</sup>	9,7x10 <sup>-3</sup>	1,0x10 <sup>-3</sup>	0,9
17	5,0x10 <sup>-3</sup>	1,2x10 <sup>-3</sup>	1,1x10 <sup>-3</sup>	1,0	9,0x10 <sup>-3</sup>	7,7x10 <sup>-3</sup>	1,0x10 <sup>-3</sup>	8,5	3,7x10 <sup>-3</sup>	4,6x10 <sup>-2</sup>	1,7x10 <sup>-3</sup>	0,3	4,8x10 <sup>-3</sup>	1,4x10 <sup>-3</sup>	1,1x10 <sup>-3</sup>	1,2
18	4,1x10 <sup>-3</sup>	3,1x10 <sup>-3</sup>	1,2x10 <sup>-3</sup>	0,9	1,7x10 <sup>-4</sup>	8,2x10 <sup>-3</sup>	1,5x10 <sup>-3</sup>	5,4	4,1x10 <sup>-3</sup>	8,7x10 <sup>-2</sup>	1,6x10 <sup>-3</sup>	0,5	7,6x10 <sup>-3</sup>	2,1x10 <sup>-3</sup>	1,6x10 <sup>-3</sup>	1,3
20	2,7x10 <sup>-2</sup>	7,3x10 <sup>-2</sup>	2,6x10 <sup>-2</sup>	0,4	2,4x10 <sup>-3</sup>	1,7x10 <sup>-3</sup>	6,3x10 <sup>-2</sup>	2,7	7,0x10 <sup>-2</sup>	4,6x10 <sup>-3</sup>	1,7x10 <sup>-2</sup>	0,3	7,7x10 <sup>-2</sup>	1,9x10 <sup>-2</sup>	2,5x10 <sup>-2</sup>	0,6

de chuvas no período de maio/85 a agosto/86.

Nota-se que, já no ponto 4 o Córrego se apresentava poluído e o maior valor da média geométrica de CF ocorreu no período de chuvas quando, inclusive foi obtida relação CF/EF superior a 4,0 indicando a contribuição de esgotos, de procedência humana. Neste período, estão incluídos os meses de férias quando a população do Hotel Fazenda, que é o maior contribuidor de poluentes para o córrego, encontra-se aumentada. Verifica-se também, na Tabela 2, que os maiores índices de poluição fecal ocorreram, no geral, no período de chuvas, ao longo de todo o córrego, indicando não apenas influência da maior densidade populacional, mas também, o carreamento de material do solo para o corpo d'água e, possivelmente, a interferência do aumento da vazão, dificultando o processo de auto-depuração.

Quanto ao significado dos índices da relação CF/EF para caracterizar a origem da poluição, estes dois grupos de indicadores têm uma importância especial quando utilizados em conjunto pois a relação entre sua densidade populacional pode diferenciar entre poluição fecal de origem humana e a de outros animais. Isto é fundamentado na sua ocorrência, em proporções diferentes nas fezes do homem e de outros animais, portanto, valores CF/EF iguais ou superiores a 4,0 indicariam origem humana, e iguais ou inferiores a 0,7, origem animal (12). No entanto, o seu período de sobrevivência no ambiente aquático deve ser levado em consideração para aplicação da relação CF/EF quando se pretende determinar a origem da poluição fecal em corpos d'água. Kenner & Geldreich, 1969 (11) discutem que esta relação tem melhor significado dentro das primeiras 24 horas em que a descarga de esgotos têm acesso ao corpo d'água. Feachem, 1975 (9), relata que, mesmo com variação de taxas de sobrevivência dos CF e EF é possível interpretar as relações entre as densidades dos mesmos. Lin & Col., 1974 (17) consideram que a relação CF/EF > 2 já indica poluição de origem humana.

Os resultados obtidos neste estudo possibilitaram comprovar estas afirmações. Nas Tabelas 2 e 3 verifica-se que, no período de estiagem

Tabela 3 - Porcentagem de aumento ou remoção de indicadores, em relação a pontos críticos do Córrego do Agrião.

PONTOS	1ª ESTIAGEM (Maio a Setembro/85)		CHUVAS (Outubro/85 a Março/86)		2ª ESTIAGEM (Abril ~ Agosto/86)	
	CF	EF	CF	EF	CF	EF
P <sub>5</sub> em relação ao P <sub>4</sub>	Remoção de 67%	Remoção de 65%	Aumento de 58%	Aumento de 58%	Aumento de 97%	Aumento de 525%
P <sub>8</sub> em relação ao P <sub>6</sub>	Aumento de 1310%	Aumento de 70%	Aumento de 275%	Aumento de 134%	Aumento de 114%	Aumento de 39%
P <sub>10</sub> em relação ao P <sub>8</sub>	Remoção de 94,5%	Remoção de 62%	Remoção de 73,3%	Remoção de 92,3%	Remoção de 74,5%	Remoção de 69,6%
P <sub>11</sub> em relação ao P <sub>10</sub>	Aumento de 900%	Aumento de 690%	Aumento de 5%	Aumento de 161%	Aumento de 23%	Remoção de 23,8%
P <sub>18</sub> em relação ao P <sub>11</sub>	Remoção de 82%	Remoção de 86%	Aumento de 95%	Aumento de 36%	Remoção de 45,6%	Aumento de 12%
P <sub>20</sub> em relação ao P <sub>18</sub>	Remoção de 93,4%	Remoção de 83,3%	Remoção de 79,3%	Remoção de 58%	Remoção de 94,5%	Remoção de 90,6%

e na época de chuvas os pontos 4 e 5 receberam poluição fecal de origem humana, isto foi corroborado pelas informações de campo, onde o ponto 4 recebia despejos diretamente de alguns chalés do Hotel Fazenda e ficou ainda mais evidenciado na época de férias (julho e dezembro a março). Nos pontos 7 e 8 este fato também ocorreu. Na 2ª estiagem grande parte dos esgotos não teve acesso ao córrego, pois se infiltrava diretamente no solo e, portanto, não foi evidenciada poluição fecal de origem humana, mesmo nos pontos de lançamento de esgotos. Ainda, nesta época, a Fazenda recebeu maior afluxo de hóspedes apenas no mês de julho, ao contrário do período de chuvas que coincidiu com as férias de verão. Observou-se também maior contribuição de dejetos de origem animal nos pontos 6 até o 20.

No ponto 11, que recebia resíduos do curral, foi detectado, na 1ª estiagem, a relação entre as médias geométricas de CF/EF igual a 0,7 confirmando a origem da poluição e, na 2ª estiagem, este índice foi igual a 1,0.

Quanto ao decaimento bacteriano, evidenciando o processo de auto-depuração, observa-se na Tabela 3 que, dependendo da entrada de efluentes poluidores e das condições fisiográficas do corpo d'água, este fenômeno fica bem evidenciado.

É importante considerar que, quando efluentes de esgotos domésticos ou de procedência animal têm acesso a um

corpo d'água, haverá alteração dos componentes bióticos e abióticos desse ecossistema que irão variar em magnitude dependendo do volume e razão do efluente e das dimensões e condições fisiográficas do corpo receptor. Após o impacto inicial, uma série de fenômenos naturais poderão ocorrer e, passando um determinado tempo de percurso, sempre na dependência da magnitude do impacto e da capacidade de assimilação do corpo receptor, a água poderá voltar a apresentar características similares àquelas anteriores à deterioração, ocorrendo portanto o processo de auto-depuração. Os principais fatores que influenciam no decaimento bacteriano num corpo d'água são: temperatura, predadores, sedimentação, níveis de nutrientes, pH, luz solar (ação bactericida dos raios ultra-violeta), flocação, adsorção, filtração e oxigênio dissolvido (14).

Nesta avaliação foram considerados os pontos de coleta onde os aspectos: sedimentação, luz solar, adsorção, filtração e aeração tinham maior probabilidade de ocorrer.

Para melhor análise dos resultados foram escolhidos os seguintes pontos de amostragem: Ponto 4 - considerado como ponto inicial correspondendo ao local de encontro das três nascentes e onde se observou a presença de esgoto doméstico; Ponto 5 - onde ocorria maior aeração tendo em vista a presença de uma cachoeira; Ponto 8 - onde foi evidenciada maior influência do esgoto

de origem humana; Ponto 10 - localizado 150m a jusante da cachoeira, sofrendo o efeito de aeração. No local amostrado havia estagnação, podendo ocorrer também um efeito de sedimentação; Ponto 11 - onde ocorria despejo de esgoto pecuário; Ponto 18 - situado em campo aberto, sofrendo maior ação da luz solar; Ponto 20 - localizado após o pântano, onde ocorria um processo de filtração, adsorção e possível sedimentação.

Analizando a Tabela 3 verifica-se que, no ponto 5 em relação ao ponto 4, o efeito de aeração da cachoeira só ficou demonstrado na 1<sup>a</sup> estiagem e nas outras duas fases do estudo isto não ocorreu. Na época de chuvas, provavelmente, o aumento da vazão e da velocidade interferiu no processo. Na 2<sup>a</sup> estiagem, por ocasião da coleta, foi registrado que, no local de amostragem havia lixo e animais mortos e que contribuiu para a deterioração da qualidade da água. No ponto 8 o córrego tem novamente suas condições alteradas devido ao lançamento do efluente no ponto 7. No ponto 10 observou-se melhora significativa da qualidade da água pelo efeito de uma cachoeira no ponto 9 e efeito da sedimentação neste local. A água, no ponto 11, apresentou, de modo geral, sua qualidade deteriorada pelo lançamento de resíduos pecuários. Nos pontos 18 e 20 houve uma boa recuperação da qualidade da água, do ponto de vista bacteriológico, pelo efeito bactericida da luz solar, sedimentação, filtração e adsorção.

Kay & MacDonald, 1980 (14), estudando águas represadas, relataram maior eficiência do processo de auto-depuração durante a estratificação de verão, devido ao efeito bactericida da luz solar e da temperatura. Em épocas de chuva, não obtiveram o decaimento bacteriano esperado pois o tempo de retenção foi insuficiente para que a auto-depuração ocorresse.

Embora o presente estudo tenha sido realizado em ambiente lótico, foi observado fenômeno similar na época das chuvas. Verificou-se que, quando o córrego alcançava ser corpo receptor, já apresentava boas condições do ponto de vista sanitário, e devido ao processo de auto-depuração, com médias geométricas de coliformes fecais (NMP/100ml) de 48 a 1700, quando se considerou a época de estiagem e

chuvas, separadamente e, de 180, quando se considerou todos os dados obtidos no período de estudo.

**Fungos aquáticos** - Para o isolamento de fungos aquáticos foram testados inicialmente, e em paralelo, várias "iscas" como, sementes de cânhamo, mostarda e mamão, papel celofane, ecdisse de cobra e exúvia de camarão. Obteve-se crescimento apenas com semente de cânhamo, que foi escolhida para este estudo.

Os resultados encontram-se nas Tabelas 4 a 8.

Poucos gêneros foram detectados: *Achlya*, *Dictyuchus*, *Isoachlya*, *Pythium*, *Saprolegnia* e *Thraustotheca*. Isto pode evidenciar a homogeneidade deste ecossistema pois o córrego é de pequenas dimensões. *Achlya* e *Saprolegnia* foram detectados em praticamente todos os pontos, independentemente do nível de poluição por matéria orgânica e, indiferentemente, nas épocas de chuva e estiagem. *Dictyuchus* foi mais frequentemente isolado no período de chuvas; foi detectado em pontos com alto nível de poluição de origem fecal como o 7, 8, 13 e 14 mas também estava presente, em alta incidência, no ponto 20, o menos poluído. *Isoachlya* foi mais frequente na época de chuvas, predominando nos pontos mais poluídos. *Thraustotheca* foi o gênero menos encontrado e que apresentou padrão de distribuição bastante heterogêneo pois ocorreu na 1<sup>a</sup> estiagem e na época de chuvas, mas não foi detectado na 2<sup>a</sup> estiagem. Esteve presente em pontos bastante poluídos como por exemplo 4 e também em pontos limpos como o 18 e 20. *Pythium* foi encontrado em praticamente todos os pontos e em todas estações de chuva e estiagem.

Para vários autores, Klich & Tiffany, 1985 (15), Misra, 1982 (21), Alabi, 1971 (1), Dayal & Thakur, 1966 (6), nos períodos de chuvas aumenta a possibilidade de carreamento de esporos do solo para o sistema aquático, aumentando o número de fungos. Klich & Tiffany, 1985 (15) relataram que *Achlya* e *Saprolegnia* eram as espécies mais comuns do ambiente aquático e Misra, 1982 (21) comentou que a sua distribuição é ubiquitária. Dick, 1971 (7), Perrot, 1960 (24), Cooke, 1954 (4), Roberts, 1963 (27), Waterhouse,

Tabela 4 - Porcentagem dos gêneros de fungos aquáticos no período de estiagem - Maio/85 a Setembro/85.

Gêneros	Pontos														
	4	5	6	7	8	9	10	11	13	14	15	16	17	18	20
Achlya	27,27	50,0	42,85	12,5	16,66	16,66	-	16,66	16,66	33,33	14,23	16,66	20,0	60,0	14,23
Dictyuchus	18,18	-	14,28	12,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14,23
Isoachlya	-	12,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pythium	18,18	12,5	-	25,0	33,33	33,33	80,0	16,66	33,33	16,66	28,57	16,66	20,0	20,0	28,57
Saprolegnia	27,27	25,0	28,57	50,0	50,0	33,33	20,0	50,0	50,0	33,33	42,85	16,66	60,0	-	-
Thraustotheca	9,09	-	14,28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20,0	14,23
Ausente	-	-	-	-	-	16,66	-	16,66	-	16,66	14,28	50,0	-	-	28,57

Tabela 5 - Frequência relativa dos gêneros de fungos aquáticos no período de chuvas-Outubro/85 a Março/86.

Gêneros	Pontos														
	4	5	6	7	8	9	10	11	13	14	15	16	17	18	20
Achlya	22,22	12,5	22,22	-	11,11	11,11	14,28	16,66	-	14,28	-	20,0	42,85	14,28	20,0
Dictyuchus	22,22	12,5	33,33	28,57	22,22	33,33	-	-	16,66	28,57	12,5	40,0	28,57	14,28	20,0
Isoachlya	-	12,5	-	14,28	11,11	-	-	16,66	-	14,28	12,5	-	-	-	-
Pythium	33,33	37,5	11,11	28,57	33,33	33,33	42,85	33,33	66,66	28,57	50,0	20,0	28,57	28,57	-
Saprolegnia	11,11	12,5	11,11	14,28	22,22	-	14,28	-	-	-	-	20,0	-	-	-
Thraustotheca	11,11	12,5	22,22	-	-	11,11	-	-	-	-	-	-	-	14,28	-
Ausente	-	-	-	14,28	-	11,11	28,56	33,33	16,66	14,28	25,0	-	-	28,57	60,0

Tabela 6 - Frequência relativa dos gêneros de fungos aquáticos no período de estiagem-Abril/86 à agosto/86.

Gêneros	Pontos														
	4	5	6	7	8	9	10	11	13	14	15	16	17	18	20
Achlya	16,66	50,0	25,0	16,66	57,14	-	-	25,0	12,5	20,0	14,28	33,33	-	-	-
Dictyuchus	-	-	-	16,66	14,28	-	14,28	-	12,5	-	14,28	-	-	-	33,33
Isoachlya	16,66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pythium	33,33	33,33	25,0	50,0	28,57	60,0	42,85	25,0	37,5	20,0	14,28	33,33	50,0	60,0	16,66
Saprolegnia	16,6	16,66	50,0	-	-	40,0	23,57	25,0	12,5	40,0	28,57	16,66	33,33	20,0	16,66
Thraustotheca	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ausente	16,6	-	-	16,66	-	-	14,28	25,0	25,0	20,0	28,57	16,66	16,66	20,0	33,33

1942 (29), citaram que muitas espécies de fungos têm um ritmo sazonal pois vários fícomicetos aquáticos apresentam dois períodos de germinação e crescimento durante o ano, na primavera e no outono, permanecendo em repouso no inverno e verão, sendo isto relatado em países de climas temperados. Nos países tropicais e sub-tropicais não se tem dados suficientes para comprovar este fato. Neste estudo não foi obtido um

padrão de sazonalidade para fungos aquáticos (Tabela 8). *Achlya* foi observada com maior intensidade no inverno durante a 1<sup>a</sup> fase do estudo apresentando uma homogeneidade na 2<sup>a</sup> fase. *Dictyuchus* foi detectado com maior frequência na primavera durante a primeira fase da pesquisa e no verão, na 2<sup>a</sup> fase.

*Isoachlya* não foi observado com frequência tanto na 1<sup>a</sup> quanto na 2<sup>a</sup>

Tabela 7 - Frequência relativa dos gêneros de fungos aquáticos no período em estudo: Maio/85 à agosto/86.

Pontos Gêneros	4	5	6	7	8	9	10	11	13	14	15	16	17	18	20
Achlya	23,07	36,36	30,0	9,52	27,27	10,0	5,26	18,75	10,0	22,22	9,09	23,53	22,22	23,53	11,11
Dictyuchus	15,38	4,54	20,0	19,05	13,63	15,0	5,26	-	10,0	11,11	9,09	11,76	11,11	5,88	22,22
Isoachlya	3,84	9,09	-	4,76	4,54	-	-	6,25	-	5,55	4,54	-	-	-	-
Pythium	26,92	27,27	10,0	33,33	31,82	40,0	52,63	25,0	45,0	22,22	31,82	23,53	33,33	35,29	16,66
Saprolegnia	19,23	18,18	25,0	23,80	22,73	20,0	21,05	25,0	20,0	22,22	22,73	17,65	27,77	5,88	5,55
Thraustotheca	7,69	4,54	15,0	-	-	5,0	-	-	-	-	-	-	-	11,76	5,55
Ausente	3,84	-	-	9,52	-	10,0	15,79	25,0	15,0	16,66	22,73	23,53	5,55	17,65	38,83

Tabela 8 - Frequência relativa de fungos aquáticos por estação do ano.

	Outono maio-jun/85	Inverno jul-set/85	Primavera out-dez/85	Verão jan-mar/86	Outono abril-jun/86	Inverno jul-agosto/86
Achlya	17,0	30,7	14,2	15,0	19,1	17,0
Dictyuchus	8,5	1,9	24,4	18,3	10,6	4,4
Isoachlya	2,1	-	-	10,0	2,1	-
Pythium	23,4	25,0	24,4	38,3	36,1	34,1
Saprolegnia	38,1	28,8	16,3	-	4,2	41,4
Thraustotheca	2,1	2,7	8,1	3,3	-	-
Ausente	10,6	7,6	12,4	15,0	27,6	2,4

fase. *Pythium* apresentou homogeneidade tanto na 1ª fase como na 2ª fase da pesquisa. O gênero *Saprolegnia* foi mais frequente no outono da 1ª fase e no inverno da 2ª fase. *Thraustotheca* não apresentou uma regularidade nas duas fases.

**Geofungos** - A ocorrência e distribuição dos fungos em água doce de ambientes lóticos tem sido objeto de estudos inclusive devido à possibilidade de sua utilização como indicadores de poluição.

No Córrego do Agrião os geofungos foram estudados observando-se a frequência dos gêneros isolados e o número de unidades formadoras de colônias (UFC/ml) ao longo dos pontos de amostragem e durante os períodos de seca e estiagem. Deve-se enfatizar, no entanto, que a enumeração quantitativa dos fungos não é equivalente à de uma bactéria, porque uma colônia de fungo pode resultar de uma única célula, de um agregado de células, ou de um micélio. Por esta razão, é suposto que cada colônia identificada na superfície do ágar seja originada de uma unidade formadora de colônia (26).

Para o isolamento destes microrganismos, nos ambientes aquáticos, não existe padronização, não havendo uniformidade de nomenclatura, devido à extensa sinonímia existente.

Para seu crescimento, o fungo pode utilizar uma variedade de componentes orgânicos tais como açúcares, proteínas, hemicelulose, lignina, quitina e outros recalcitrantes, bem como vários íons metálicos. Deste modo, podem participar de diferentes processos no meio ambiente, sendo assim muito importantes nos ambientes aquático e terrestre. Entretanto, a natureza e magnitude do significado ecológico dos geofungos, particularmente em sistemas aquáticos, não são bem compreendidos e ainda necessitam ser melhor estudados (26).

**Boletos** - Nas Tabelas de 9 a 3 pode-se apreciar os resultados obtidos. Na Tabela 9 verifica-se que o número de UFC/ml foi superior na 1ª estiagem (maio a setembro-85) seguido da 2ª estiagem, obtendo-se, no período de chuvas, um menor número.

Os dois períodos de estiagem que apresentaram aumento no número de

Tabela 9 - Geofungos (bolores) média do nº U.F.C./ml por ponto e período de amostragem.

Período	Pontos 4 5 6 7 8 9 10 11 13 14 15 16 17 18 20																	
	1985 - estiagem	15	9	13	8	13	17	25	30	15	9	17	13	23	19	6		
outubro/85-março/86 - chuvas	14	10	12	9	8	9	11	8	9	9	6	5	9	7	6			
abril-agosto/86 - estiagem	10	11	6	5	8	8	10	10	11	10	4	15	11	10	6			
maio/86-junho/86 - total	13	10	11	8	12	11	15	16	9	10	9	11	15	12	6			

UFC/ml abrangearam a época de férias escolares (julho) onde o número de pessoas hospedadas na fazenda próxima ao Córrego sofreu grande aumento, contribuindo com o aumento do esgoto que atingiu o Córrego acrescentando matéria orgânica favorável ao crescimento de bolores. Acrescenta-se ainda que estes períodos coincidiram com o período da maior queda de folhas que constituem um substrato vegetal adicional contribuindo para o desenvolvimento dos fungos presentes no corpo d'água. No entanto, isto não explica o baixo número de UFC/ml observado no período de chuvas que também coincidiu com o período maior de férias, sendo que, ao se estudar os dados bacteriológicos, ficou bem evidenciada a influência do aumento de hóspedes na alteração da qualidade do corpo d'água.

Na 1ª estiagem foi observado um aumento crescente no número de UFC/ml entre os pontos 7 e 11, correspondente a 275% em relação ao ponto 7. Nesta época o ponto recebia descarga de esgoto doméstico e o ponto 11 recebia o lançamento de despejo da lavagem de estábulos dos animais, justificando portanto, este aumento.

O aumento de 76%, no ponto 7, em relação ao ponto 16, pode estar relacionado com a presença de gado neste local.

A relação CF/EF revela o predomínio de poluição de origem animal (Tabela 3).

Na 2ª estiagem (abril-agosto de 86) também ocorreu um aumento de 100% no número de UFC/ml no ponto 11 em relação ao ponto 7 talvez pelos mesmos motivos

já citados.

O ponto 16 também apresentou aumento de 275% em relação ao ponto anterior (P15). Isto também pode ser devido à contribuição da poluição de origem animal neste local.

No período de chuvas (outubro-86 a março-86) pode-se observar que o número de UFC/ml manteve-se praticamente homogêneo por todo o córrego, possivelmente devido ao aumento do fluxo de água corrente distribuindo os esporos por todo o córrego.

A presença de cachoeira nos pontos 5 e 9 deveria ter influência sobre o número de UFC/ml. Verificou-se uma redução de 24% após a primeira cachoeira, mas após a cachoeira do ponto 9 foi obtido um acréscimo de 36%.

Quanto à auto-depuração, observou-se a eficiência do pântano neste processo porque após o ponto 18 houve, em todas as estações, uma redução no número de UFC/ml de geofungos.

Em geral, no ponto 20 verificou-se decréscimo significativo de UFC/ml em relação aos pontos 11 e 18, respectivamente, mostrando a eficiência do pântano no processo de auto-depuração.

Maki e Cols., 1984 (19), estudando lagos de água doce em Wisconsin, obtiveram picos de UFC/ml de bolores do início até à metade do verão, sendo outro aumento observado no outono. O aumento de UFC/ml no Córrego do Agrião coincidiu com as estações de outono e inverno possivelmente devido ao substrato vegetal adicional que contribuiu para o seu desenvolvimento.

Maki e Cols., 1984 (19) relataram que vários investigadores obtiveram níveis

de  $10^2$  a  $10^5$ /100ml de fungos, tanto em água doce como em água marinha, e informaram que seus dados estão incluídos nesta faixa. O maior resultado encontrado neste estudo foi de  $5,5 \times 10^3$ /ml.

Qureshi & Dutka, 1974 (26), em estudos no lago Ontário, Canadá, obtiveram maior número de UFC/ml nas margens em relação aos locais mais centrais do lago, provavelmente, evidenciando a contribuição do solo e dos despejos nas margens do lago. No presente estudo, como se tratava de um córrego de pequenas dimensões este fato não foi detectado, portanto, pode-se supor que o solo próximo ao córrego e despejos lançados contribuem para o aumento dos fungos neste ecossistema.

Quanto aos gêneros, foram obtidos, em ordem de frequência: Fungos não esporulados (FNE), *Fusarium*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Phoma*, *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Mucor*, *Geotrichum* e *Monascus*. Os gêneros raramente isolados foram: *Neurospora*, *Trichotecium*, *Streptomyces*, *Cunningamela*, *Verticillium*, *Rhizopus*, *Paecilomyces*, *Nigrospora*, *Epicoccum*, *Chaetomium*, *Curvularia*, *Circinella*, *Aureobasidium* e *Alternaria*.

Noell, 1973 (22) relatou o isolamento de geofungos de rochas de córregos poluídos por efluentes de esgotos e os gêneros mais frequentes foram: *Fusarium*, *Phoma*, *Cladosporium*, *Verticillium*, *Epicoccum*, *Gliocadium*, *Alternaria*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Pestalotia* e *Curvularia*. No Córrego do Agrião somente 4 gêneros coincidiram com os isolados por este autor.

Qureshi & Dutka, 1974 (26) isolaram, no lago Ontário, os seguintes gêneros em maior frequência: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Leptomitus*, *Alternaria* e *Mucor*. Entre estes gêneros, seis também foram mais frequentes no Córrego do Agrião, durante o período em estudo.

Todos os gêneros encontrados no presente estudo são, de modo geral, de distribuição universal.

Para verificar se alguns dos gêneros poderiam ser bons indicadores de poluição, os dados foram agrupados segundo as estações de chuva e estiagem, quanto à porcentagem de frequência (Tabelas 9 a 13).

Fungo não esporulado ou *Mycelia sterilia* (FNE) ocorreu com maior

frequência, foi isolado em todos os pontos de amostragem e, com maior incidência nos pontos 9, 13 e 18 (Tabela 13). Purchio, 1978 (25), estudando a microbiota fúngica na Baixada Santista (São Paulo), detectou FNE predominando tanto no ar como na água do mar de região poluída e discute a possibilidade deste grupo de fungos ser utilizado como indicador de poluição. Neste estudo estes fungos ocorreram com frequência similar tanto em águas poluídas como não poluídas.

**Leveduras** - As leveduras foram estudadas procurando-se observar o número de UFC/ml e os gêneros isolados, relacionando-se os períodos de seca e estiagem.

O meio de cultivo preconizado por Simard & Blackwood, 1971 (28), acrescido de cloranfenicol ( $100\mu\text{g}/\text{ml}$ ) com incubação a  $15^\circ\text{C}$ , foi o que apresentou melhor resultado para o isolamento das leveduras impedindo, de modo mais eficiente, um maior crescimento de bactérias e bolores.

Na Tabela 4 pode-se observar os resultados obtidos. Das 220 amostras examinadas 120 (54,6%) apresentaram resultado positivos, frente a metodologia aplicada no exame, sendo os gêneros mais frequentemente isolados: *Candida*, *Rhodotorula* e *Cryptococcus*. *Kloeckera*, *Trichosporon* e *Aureobasidium* foram também isolados e entre os formadores de ascospores *Hansenula*, *Pichia* e *Saccharomyces*.

O gênero *Candida* predominou na época de chuvas, no ponto 4 onde elevado nível de poluição fecal de origem humana foi detectado, enfatizando portanto a origem da poluição. Neste ponto a média geométrica do NMP/100ml de CF foi  $2,4 \times 10^4$  e a relação CF/EF, de 61,5. Isto evidencia o impacto do aumento da densidade populacional no Hotel Fazenda devido à época de férias e o lançamento direto do esgoto de alguns chalés neste local.

O gênero *Cryptococcus* apresentou número incontável de colônias no ponto 13, na mesma época, ponto este que apresentou média geométrica de NMP/100ml de CF de  $2,2 \times 10^3$ .

Na 1ª estiagem houve predominância de *Cryptococcus* nos pontos 7, 8, 11 e 15 que apresentaram, respectivamente médias geométricas de NMP/100ml de CF:  $1,0 \times 10^3$ ;  $1,1 \times 10^4$ ;  $6,0 \times 10^3$  e  $1,5 \times 10^3$

Tabela 10 - Porcentagem de gêneros de bolores -  
Maio a Setembro/85.

Gêneros	Pontos	4	5	6	7	8	9	10	11	13	14	15	16	17	18	20
<i>Cladosporium</i>	45	45	12	7	25	25	40	10	19	15	19	34	25	10	37	
<i>Fusarium</i>	13	10	2	17	23	23	12	8	6	20	5	13	28	9	12	
Fungos não espontâneos																
<i>Trichoderma</i>	10	0	20	30	5	3	2	4	4	10	1	1	0	2	0	
<i>Geotrichum</i>	1	0	0	0	0	0	0	29	2	4	31	0	0	0	0	
<i>Penicillium</i>	1	4	23	30	11	4	15	11	16	12	10	9	4	17	3	
<i>Aspergillus</i>	1	3	0	0	1	2	4	3	5	6	4	3	2	2	0	
<i>Cephalosporium</i>	4	7	0	0	1	3	7	7	2	8	0	9	1	6	3	
<i>Phoma</i>	0	3	6	3	8	12	3	5	6	0	5	0	1	2	0	
<i>Mucor</i>	0	7	0	0	4	2	0	0	2	4	0	0	0	0	0	
<i>Monascus</i>	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
Outros	4	3	8	0	2	0	3	3	1	8	5	2	10	6	21	

Tabela 11 - Porcentagem de gêneros de bolores -  
Outubro/85-Março/86.

Gêneros	Pontos	4	5	6	7	8	9	10	11	13	14	15	16	17	18	20
<i>Cladosporium</i>	17	14	1	1	10	2	7	5	9	14	13	0	0	12	45	
<i>Fusarium</i>	26	36	55	26	27	11	14	24	22	24	13	38	36	0	12	
Fungos não espontâneos																
<i>Trichoderma</i>	20	21	22	28	25	30	20	26	32	19	13	0	21	34	22	
<i>Geotrichum</i>	17	19	15	26	21	43	23	11	22	26	40	58	26	38	5	
<i>Penicillium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	
<i>Aspergillus</i>	3	0	7	4	0	0	12	10	7	5	7	0	3	0	6	
<i>Cephalosporium</i>	11	0	2	3	5	6	0	2	0	0	0	4	8	4	3	
<i>Phoma</i>	0	4	0	4	7	3	0	11	0	0	0	0	0	0	3	
<i>Mucor</i>	0	0	0	4	0	2	4	11	0	2	2	0	3	4	0	
<i>Monascus</i>	4	0	0	7	0	3	0	0	2	2	0	0	0	0	0	
Outros	2	2	0	0	0	0	15	0	4	4	7	0	3	4	9	

Tabela 12 - Porcentagem de gêneros de bolores - Abril a Agosto/86.

Gêneros	Pontos	4	5	6	7	8	9	10	11	13	14	15	16	17	18	20
<i>Cladosporium</i>	40	40	16	8	10	4	28	16	9	28	21	37	28	10	10	
<i>Fusarium</i>	24	20	6	10	55	13	24	14	8	18	9	12	32	20	20	
Fungos não espontâneos																
<i>Trichoderma</i>	12	12	12	4	2	26	12	40	2	18	21	16	36	30	33	
<i>Geotrichum</i>	4	5	16	50	23	16	12	12	8	9	0	0	16	20	3	
<i>Penicillium</i>	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Aspergillus</i>	4	7	6	0	0	0	0	4	6	0	0	5	5	4	6	
<i>Cephalosporium</i>	6	4	3	0	0	0	2	0	9	0	0	0	1	6	3	
<i>Phoma</i>	4	4	6	4	0	6	4	6	3	0	13	6	5	5	0	
<i>Mucor</i>	2	2	16	0	5	0	0	0	0	4	0	4	0	0	3	
<i>Monascus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	
Outros	4	6	10	4	0	12	0	0	16	12	18	8	5	5	16	

(Tabela 2). Os pontos 7 e 8 sofrem interferência direta dos esgotos domésticos lançados no ponto 7; o ponto 11 recebe despejos de um curral e, principalmente, neste período estava sendo bastante afetado por este lançamento, o que não ocorreu na?

estiajagem quando este resíduo, devido à seca, estava infiltrado no solo. O ponto 15 ainda era afetado pelo lançamento no ponto 11.

Na época de chuvas, quando o índice de poluição do córrego foi elevado e o processo de auto-depuração não foi

Tabela 13 - Porcentagem de gêneros de bolores - Maio/85 a Agosto/86.

Gêneros	Pontos														
	4	5	6	7	8	9	10	11	13	14	15	16	17	18	20
<i>Cladosporium</i>	34	33	9	5	15	10	22	11	13	19	17	23	17	14	25
<i>Fusarium</i>	21	22	21	17	33	15	17	16	3	20	9	21	25	9	12
Fungos não esporeados	17	17	18	15	17	25	15	20	24	18	17	14	22	34	20
<i>Trichoderma</i>	10	8	18	35	16	21	13	9	10	15	14	18	15	20	3
<i>Geotrichum</i>	1	0	2	0	0	0	3	9	1	1	10	0	0	1	0
<i>Penicillium</i>	2	1	11	18	5	9	12	9	21	8	10	7	6	7	5
<i>Aspergillus</i>	5	3	2	1	2	3	2	3	2	2	2	7	5	3	3
<i>Cephalosporium</i>	3	2	1	2	2	5	1	3	2	0	3	1	4	3	
<i>Phoma</i>	1	3	4	2	4	6	5	4	3	1	8	2	2	3	0
<i>Mucor</i>	1	3	5	1	3	1	2	3	1	2	3	1	1	1	1
<i>Hansenius</i>	2	0	1	2	0	1	0	0	1	2	0	1	0	0	0
Outros	3	3	6	1	1	6	6	2	7	8	10	3	6	4	28

Tabela 14 - Gêneros de leveduras e contagem (média do número de UFC/ml) por ponto e período de coleta.

Símbolos: \* = Incontáveis UFC/ml.

Período de coleta	Gêneros	Pontos de coleta														
		4	5	6	7	8	9	10	11	13	14	15	16	17	18	20
Estiagem 1 Maio a Setembro de 1985	<i>Candida</i>	0	0	1	0	3	16	0	0	7	1	0	3	0	1	0
	<i>Cryptococcus</i>	0	2	0	43	31	10	3	55	0	0	52	0	2	1	0
	<i>Kloeckera</i>	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	<i>Rhodotorula</i>	1	1	0	4	5	6	18	*	0	0	0	0	1	1	0
Chuvas Outubro a Março 85/86	<i>Trichosporon</i>	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Aureobasidium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	<i>Candida</i>	*	12	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	<i>Cryptococcus</i>	0	8	0	0	0	0	0	0	*	0	1	0	0	0	0
Estiagem 2 Abril a Agosto de 1986	<i>Rhodotorula</i>	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Trichosporon</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Aureobasidium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0
	<i>Candida</i>	1	18	26	12	3	*	0	1	3	0	1	0	0	0	1
	<i>Cryptococcus</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Hansenula</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0
	<i>Kloeckera</i>	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	1
	<i>Pichia</i>	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Rhodotorula</i>	3	10	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2
	<i>Saccharomyces</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	<i>Trichosporon</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0

eficiente, *Cryptococcus* prevaleceu no ponto 13.

Na 2ª estiagem o gênero *Candida* prevaleceu nos pontos 6, 7, 9 e 13 onde as médias geométricas do NMP/100ml de CF variaram de 330 a 4900, mas ocorreu em número incontável no ponto 9, onde o índice de CF foi mais elevado.

O gênero *Rhodotorula* acompanhou *Cryptococcus* na 1ª estiagem nos pontos 11 e 15, porém ocorreu nesta época desde o ponto 7, onde o esgoto é lançado no córrego, indicando também poluição fecal. Este gênero também foi detectado na época das chuvas, juntamente com o gênero *Candida*,

corroborando os achados já comentados anteriormente sobre a maior incidência de poluição fecal nesta época.

É importante notar que, a partir do ponto 16 até o 20, leveduras ou não foram detectadas, ou o foram em baixas quantidades, corroborando os relatos de outros autores (2, 13, 23).

Confirmou-se também por este parâmetro que há um processo efetivo de auto-depuração no Córrego do Agrião devido às suas condições fisiográficas.

#### Conclusões

Com base nos resultados foi possível

confirmar a validade da relação CF/EF na caracterização da fonte de poluição, principalmente quando se efetua esta relação utilizando as médias geométricas dos valores de EF e CF, e quando se considera, como proposto por Feachem (13) valores 2,0 como indicativos de poluição fecal de origem humana, estes achados comprovam também os obtidos anteriormente por Martins e col., 1984 (20) em águas do Rio Atibaia.

Comprovou-se também a eficácia do processo de auto-depuração no córrego, na dependência das condições fisiográficas do mesmo; principalmente quando se considerou o decaimento de bactérias e leveduras.

Fungos aquáticos e bolores, quando identificados até o nível de gênero não foram bons indicadores de poluição pois ocorreram, indiferentemente, em áreas limpas e poluídas do córrego, no entanto sua contagem possibilitou evidenciar poluição por matéria orgânica.

O número de leveduras pode ser considerado como um bom indicador de poluição no ambiente estudado, e por outro lado quando se considerou apenas a sua presença não foi possível obter-se uma interpretação de seu significado.

## Summary

*Utilization of bacteria and fungi as indicators in the evaluation of physiographic factors that interfere in the self-depuration process in a subtropical stream*

The self-depuration studies of the sub-tropical stream "Córrego do Agrião", affluent of Jacaré-Pepira-River SP, which receives effluent of domestic and cattle raising wastes, was performed through the utilization of biological indicators: fecal and total coliforms, fecal streptococci and aquatic and terrestrial fungi. The period of study involved two drought seasons and a rain period. It was observed the influence of physiographic conditions in self depuration of the water body. The relationship FC/FS allowed the characterization of the water and it was observed that the number of yeasts

(U.F.C./ml), was good indicator of fecal pollution, but this was not true in relation to aquatic and terrestrial molds.

## Agradecimentos

Agradeço ao Dr. Adauto Milanez, ao Prof. Dr. Paulo Campos Torres de Carvalho pela colaboração na identificação de fungos aquáticos e sugestões, durante a elaboração do Projeto, e a equipe técnica: Adilson Manoel Godoy, Maria Isabel Pires Serrano, Maria Alice O. Silva e Adolfo Tadeu Barbosa.

## Referências Bibliográficas

1. Alabi, R.O. - Factors affecting seasonal occurrence of *Saprolegniaceae* in Nigeria. Trans. Brit. Mycol. Soc., 56:289-299, 1971(a).
2. American Public Health Association - Standard methods for the examination of water and wastewater. 16<sup>a</sup> ed. New York, Apha, 1985.
3. Brasil - Ministério do Interior. Secretaria Especial do Meio Ambiente. Portaria GM/0013/15-01-1976. Classificação das Águas Interiores do Território Nacional (folheto).
4. Cooke, W.B. - Fungi in polluted water and sewage. III. Fungi in a small polluted stream. Sewage and Industrial Wastes, 26:790-794, 1954.
5. The role of fungi waste treatment. CRC-Critical Rev. Environ. Control., 1:581, 1971.
6. Dayal, R. & Thakur, J. - The occurrence and distribution of aquatic fungi in certain ponds of Varanasi. Hydrobiologia, 27:543-558, 1966.
7. Dick, M.W. - The ecology of *Saprolegniaceal* in benthic and littoral muds with a general theory of fungi in the lake ecosystem. J. Gen. Microbiol., 65:325-337, 1971.
8. Faraco, B.F.C. & Faraco, A.F. - Poluição hídrica micológica. Rev. bras. Med., 33(11):385-388, 1976.
9. Feachem, R. - An improved role for faecal coliform to faecal streptococci ratios in the differentiation between human and non-human pollution sources. Water

- Res., 9:689-690, 1975.
10. Sanitary significance of faecal coliforms in the environment. Wat. Pollut. Control Res. Serv. Publ. n° WP-203, U.S. Department of the Interior, 122p. 1966.
11. Geldreich, E.E. & Kenner, B.A. - Concepts of faecal streptococci in stream pollution. J. Wat. Pollut. Control Fed., 41:R336-R352, 1969.
12. Fecal coliform and fecal streptococci density relationship in wast discharges and receiving waters. CRC Critical Rev. Envir. Control., 6:349-369, 1976.
13. Hagler, A.N. - Ecologia e taxonomia de leveduras em estuário poluído e ambientes marinhos do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 1978. [Tese Doutoramento Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro].
14. Kay, D. & McDonald, A. - Reduction of coliform bacteria in two upland reservoirs: the significance of distance, decay relationships. Water Res., 14:305-318, 1980.
15. Klich, M.A. & Tiffany, L.H. - Distribution and seasonal occurrence of aquatic Saprolegniaceae in northwest Iowa. Mycologia, 77(3):373-380, 1985.
16. Kreger van Rij, N.J.W. - The yeasts: a taxonomic study. 3<sup>a</sup> ed. Amsterdam, Elsevier, North Holland, 1082 p., 1984.
17. Lin, S.; Evans, R.L.; Beuscher, D.B. - Bacteriological assessment of Spoon River water quality. Appl. Microbiol., 28:288-297, 1974.
18. Lodder, J. - The yeasts: a taxonomic study. 2<sup>a</sup> ed. Amsterdam, Elsevier, North Holland, 1385p., 1971.
19. Maki, J.S.; Danos, S.C.; Remsen. - Quantitative changes in fungal colony-forming units in the surface microlayers of two freshwater ponds. Can. J. Microbiol., 30:578-586, 1984.
20. Martins, M.T.; Alves, M.N.; Sanchez, P.S.; Sato, M.I.Z. - Evaluation of the fecal coliforms and fecal streptococci ratio in the characterization of fecal pollution in a subtropical river. Rev. Microbiol., 15(2):94, 1984.
21. Misra, J.K. - Occurrence, distribution and seasonality of aquatic fungi as affected by chemical factors in six alkaline ponds of India. Hydrobiologia, 97:185-191, 1982.
22. Noell, J. - Slime - inhabiting geofungi in a polluted stream (winter, spring). Mycologia, 65:57-66, 1973.
23. Paula, C.R. - Contribuição ao estudo das leveduras em praias da Baixada Santista. São Paulo, 1978. [Tese de Mestrado Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].
24. Perrot, P.E. - Ecology of some aquatic Phycomycetes. Trans. Brit. Mycol. Soc., 43:19-30, 1960.
25. Purchio, A. - Ecossistema fúngicos da Baixada Santista. São Paulo, 1978. [Tese de Livre-Docência, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].
26. Qureshi, A.A.; Dutka, B.J. - A preliminary study on the occurrence and distribution of geofungi in lake Ontario near the Niagara river - Proc. 17th Conf. Great Lakes Res., 1974. 653-662. Internat. Assoc. Great Lakes Res.
27. Roberts, R.E. - A study of the distribution of certain members of the Saprolegniales. Trans. Brit. Mycol. Soc., 46:213-224, 1963.
28. Simard, R.E. & Blackwood, A.D. - Yeasts from St. Lawrence River. J. Microbiol., 17:197-203, 1971.
29. Waterhouse, G.M. - Some waters moulds to the Hodsmill River collected from 1937 to 1939. Trans. Brit. Mycol. Soc., 25:315-325, 1942.

Recebido para publicação em 09/12/88

# DETECÇÃO DA ADESINA FY EM AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE BEZERROS COM DIARRÉIA NO BRASIL

Domingos da Silva Leite  
 Marcina Garcia  
 Tomonasa Yano  
 & Antonio Fernando Pestana de Castro

Deptº de Microbiologia e Imunologia  
 Instituto de Biologia  
 Universidade de Campinas  
 Caixa Postal 6109  
 13081 Campinas SP, Brasil

## Resumo

Foram estudadas 86 amostras de *E. coli* isoladas de fezes diarréicas de bezerros, com o objetivo de verificar a ocorrência da adesina FY nestas amostras. Pelo ensaio de microhemaglutinação manose-resistente com hemácias bovinas e de soroaglutinação em lâmina com antissoro anti-FY, observamos que 9,3% das amostras de *E. coli* apresentaram a adesina FY, sendo que estas não produziram enterotoxinas (LT e/ou STe) ou verotoxina (VT).

## Introdução

Um dos fatores essenciais na patogenia da colibacilose neonatal é a colonização do intestino dos animais por amostras de *Escherichia coli* enteropatogênicas. A colonização é mediada, via de regra, por adesinas (antígenos de aderência ou fator de colonização), encontradas na superfície das células dos colibacilos, que facilitam à adesão à mucosa epitelial, quando então a bactéria multiplica-se e produz enteroxinas (7) ou verotoxina (9).

*E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) isoladas de bezerros com diarréia neonatal podem apresentar os fatores de colonização (FC) K99 e/ou F41 (12, 13, 17). Um outro antígeno de aderência denominado FY foi observado em amostras de *E. coli* isoladas de bezerros com diarréia por Girardeau & Col. (5). Posteriormente, outra adesina, denominada Att 25 foi descrita por Pohl & Col. (15). Entretanto, Morris & Col. (11) verificaram serem essas duas adesinas semelhantes sorológicoamente. A ocorrência de amostras de *E. coli* FY<sup>+</sup> não enterotoxigênicas foi descrita na França (5), Bélgica (14), Japão (16),

Escócia e Inglaterra (10), podendo ainda este antígeno ocorrer associado aos FC K99 e/ou F41 quando então produzem enterotoxinas (1, 10). Uma nova adesina, denominada 31A foi descrita por Girardeau & Col. (5), tendo sido também observada por Shimizo & Col. (16). A capacidade hemaglutinante desses novos FC (FY e 31A) é idêntica, isto é, as bactérias que os produzem aglutinam hemácias bovinas na presença de D-manose. Sob o ponto de vista antigenico, contudo, estas adesinas são distintas (1, 16).

Este trabalho tem por objetivo verificar a ocorrência no nosso meio da adesina FY em amostras de *E. coli* isoladas de bezerros com diarréia.

## Material e Métodos

**Amostras** - Oitenta e seis amostras de *Escherichia coli* foram isoladas de fezes diarréicas de bezerros com até duas semanas de idade, no Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte, EMBRAPA, Campo Grande, MS. Amostras de *E. coli* padrão produtoras das adesinas FY código (Att25) e K99-FY (11a) nos foram cedidas respectivamente por C.

Wray do "Ministry of Agriculture, Fisheries & Food, Central Veterinary Laboratory", Inglaterra e M. Contrepois do "Institut National de la Recherche Agronomique", França.

**Meios de cultura** - Para o cultivo das amostras em estudo os seguintes meio de cultura foram utilizados: meio de Minca (6) e "tripticase soy broth" (TSB, Difco).

**Microhemaglutinação manose-resistente (MHMR)** - O ensaio foi realizado conforme recomendações de Jones & Rutter (8). Cinquenta microlitros de uma suspensão a 1,5% de hemácias bovinas, previamente lavadas em salina tamponada com fosfato (PBS) e ressuspensas em PBS contendo 0,5% de D-manose, foram adicionados às suspensões bacterianas diluídas na razão 2 em placas de microtípico. A mistura foi então incubada a 4°C por 2 horas quando então procedemos a leitura das reações.

**Preparo do antissoro** - Suspensão bacteriana contendo  $10^8$  unidades formadoras de colônias/ml da amostra de *E. coli* 11a, cultivada em meio de Minca (37°C por 18 horas) ao qual se adicionou 0,5% de formol foram inoculadas intravenosamente em coelhos albinos adultos como recomendado por Edwards & Ewing (4) para a preparação de antissoros OK. Os antissoros obtidos foram exaustivamente absorvidos como recomendado por Contrepois & Col. (2).

**Detectação de enterotoxinas termo-lábil (LT) e termo-estável (STa) e verotoxina (VT)** - Para esta finalidade utilizamos respectivamente as técnicas de Imunohemólise Radial (18), ensaio do camundongo recém-nascido (3) e o ensaio em célula VERO (19).

## Resultados

Do total de 86 amostras de *E. coli* isoladas de fezes diarréicas de bezerros, verificamos pelo ensaio de MHMR com hemácias bovinas que 12 amostras (13,9%) aglutinaram essas hemácias na presença de D-manose (Tabela 1). O antissoro anti-FY após absorção apresentou aglutinação intensa quando diluído a 1:20, frente à amostra

**Tabela 1 - Característica biológicas observadas nas amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de bezerros que aglutinaram hemácias bovinas.**

**Símbolos:** \* = Microhemaglutinação manose-resistente, ensaio realizado com hemácias bovinas na presença de D-manose; \*\* = Toxinas: LT, STa ou VT; \*\*\* = O título representa a recíproca da maior diluição da suspensão bacteriana que hemaglutinava eritrócitos bovinos.

Amostras	MHMR*	Toxinas**	Aglutinação Anti-FY
54-5	256***	-	+
86-5	64	-	+
87-1	64	-	-
92-1	64	-	+
94-1	64	-	-
95-3	64	-	+
96-3	64	-	+
111-3	64	-	+
118-1	32	-	-
2147-4	256	-	+
2147-5	16	-	-
3106-5	64	-	+
Att25 ( $FY^+$ )	256	-	+
11a ( $K99^+$ , $F41^+$ )	256	STa	+
K12	-	-	-

homóloga cultivada no meio de Minca por 18 horas a 37°C. Utilizando então o antissoro anti-FY, verificamos que das 12 amostras de *E. coli* que reagiram com hemácias bovinas, 8 (9,3%) apresentaram reação positiva frente ao antissoro anti-FY. Observamos ainda, que nenhuma das amostras  $FY^+$  por nós isoladas produziu toxinas do tipo LT, STa e/ou VT (Tabela 1).

## Discussão

Recentemente, em adição às adesinas K99 e F41 (12, 17) associadas a casos de diarréia em bezerros, novos fatores de colonização foram descritos, FY (5) e 31A (5). Vários autores descreveram a ocorrência destas adesinas em diferentes países associadas ou não à K99 ou F41 (2, 5, 10, 14, 16). Assim, estudos epidemiológicos demonstraram que na França, 9% das amostras de *E. coli* enterotoxigênicas (STa $^+$ ) isoladas de bezerros apresentaram a adesina FY associada a K99 (2), enquanto que na Bélgica esta associação se situa ao

redor de 30% (14). Na Inglaterra e Escócia foi verificado a ocorrência de 3,4% de amostras FY<sup>+</sup> não enterotoxigênicas (10). No Japão, Shimizu & Col. (16) também examinando colibacilos não enterotoxigênicos, observaram a incidência de 7% de amostras FY<sup>+</sup> e 0,9% de FY<sup>+</sup> associado a 31A.

A importância das adesinas FY e 31A é sugerida em pesquisas realizadas em bezerros, nos quais através de desafios, amostras de *E. coli* produtoras destes抗ígenos, mas não enterotoxigênicos, foram capazes de produzir diarréia nos animais inoculados (1, 16).

Em nossos estudos verificamos a ocorrência de 9,3% de amostras de *E. coli* FY<sup>+</sup> isoladas de bezerros com diarréia, não estando estas associadas a outras adesinas (K99 ou F41).

Confirmado os resultados observados por Shimizu & Col. (16) e Morris & Col. (10), nenhuma de nossas amostras FY<sup>+</sup> produziram enterotoxinas (LT ou STa) ou verotoxina (VT).

Esta é a primeira vez que o antígeno FY é descrito como ocorrendo no Brasil e os resultados por nós obtidos sugerem que a frequência de 9,3% relativa à este antígeno, encontrada entre 86 amostras de *E. coli* isoladas de fezes diarréicas de bezerros não pode ser desprezada. Por outro lado, a semelhança do que ocorre em outros países, estes mesmos achados justificam pesquisas adicionais para verificar uma possível associação de FY com K99, F41 ou 31A e suas implicações na colibacilose bovina.

A possibilidade desta hipótese, se confirmada, faz antever modificações e possível inclusão desta adesina em eventuais vacinas que venham ser preparadas para a imunoprofilaxia da colibacilose bovina.

#### Summary

*Detection of FY adhesin in strains of Escherichia coli isolated from calves with diarrhea in Brazil*

Eight-six strains of *E. coli* isolated from calves with diarrhea were studied to evaluate the occurrence of FY adhesin. Test for mannose-resistant microhemagglutination with erythrocytes

from calves and slid agglutination with anti-FY antiserum were carried out. Eight (9.3%) were positive for adhesin but none of them produced either enterotoxins (LT and STa) or verotoxin (VT).

#### Agradecimento

A presente pesquisa recebeu apoio financeiro da FAPESP, CNPq e FINEP.

#### Referências Bibliográficas

- Contrepois, M. & Girardeau, J.P. - Additive protective effects of colostral antipili antibodies in calves experimentally infected with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 50:947-949, 1985.
- Contrepois, M.; Martel, J.L.; Bordas, C.; Hayers, F.; Millet, A.; Ramisse, J. & Sendral, R. - Fréquence des pili FY et K99 parmi des souches de *Escherichia coli* isolées de veaux diarrhéique en France. *Ann. Rech. Vet.*, 16:25-28, 1985.
- Dean, A.G.; Ching, Y.C.; Williams, R.G. & Harden, R.B. - Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study for diarrhea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.*, 125:407-411, 1973.
- Edwards, J.P. & Ewing, W.H. - Identification of *Enterobacteriaceae*. Burgess Publishing Co., 1966.
- Girardeau, J.P.; Dubourguiner, H.C. & Contrepois, M. - Attachement des *Escherichia coli* enteropathogens à la muqueuse intestinale. *Bull. Group. Tech. Vet.*, 80 4 B 190:49-60, 1980.
- Guinée, P.A.M.; Veltkamp, J. & Jansen, W.H. - Improved Minca medium for the detection of K99 antigen in calf enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 15:676-678, 1977.
- Gyles, C.L. - Heat-labile and heat-stable forms of the enterotoxin from *Escherichia coli* strains enteropathogenic for pigs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 176:314-322, 1971.
- Jones, G.W. & Rutter, J.M. - The association of K88 antigen with

- haemagglutinating activity in porcine strains of *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol., 84:135-144, 1974.
9. Konowalchuck, J.; Speirs, J.I. & Stravric, S. - Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect. Immun., 18:775-779, 1977.
10. Morris, J.A.; Chanter, N. & Sherwood, D. - Occurrence and properties of FY (Att 25)<sup>+</sup> *Escherichia coli* associated with diarrhoea in calves. Vet. Tec., 12:189-191, 1987.
11. Morris, J.A.; Sojka, W.J. & Ready, R.A. - Serological comparison of the *Escherichia coli* prototype strains for the F(Y) and Att 25 adhesins implicated in neonatal diarrhea in calves. Res. Vet. Sci., 38:246-247, 1985.
12. Morris, J.A.; Thorns, C.J. & Sojka, W.J. - Evidence for two adhesive antigens on the K99 reference strain *Escherichia coli* B41. J. Gen. Microbiol., 118:107-113, 1980.
13. Morris, J.A.; Thorns, C.J.; Wells, G.A. & Sojka, W.J. - The production of F41 fimbriae by piglet strains of enterotoxigenic *Escherichia coli* that lack K88, K99 and 987P fimbriae. J. Gen. Microbiol., 129:2753-2759, 1983.
14. Pohl, P.; Liermans, P. & Van Muylen, K. - Fréquence des adhésines K99 et Att 25 chez les *Escherichia coli* du veau. Ann. Med. Vet., 128:55-558, 1984.
15. Pohl, P.; Liermans, P.; Van Muylen, K. & Schotte, M. - Colibacilles enterotoxigènes du veau possédant un antigène d'attachement de l'antigène K99. Ann. Med. Vet., 126:569-571, 1982.
16. Shimizu, M.; Sakano, T.; Yamamoto, J. & Kitajima, K. - Incidence and some characteristics of fimbriae FY and 31A of *Escherichia coli* isolates from calves with diarrhea in Japan. Microbiol. Immunol., 31:417-426, 1987.
17. To, S.L.M. - F41 antigen among porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* strains lacking K88, K99 and 987P. Infect. Immun., 43:549-554, 1984.
18. Yano, T.; Oliveira, M.S.; Fontes, C.F.; Almeida, A.C.P. & Castro, A.F.P. - Detection of heat-labile (LT) enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli* by radial immune haemolysis test: a modification for clinical use. Med. Microbiol. Immunol., 171:171-178, 1982.
19. Yano, T.; Tamashiro, W.M.S.; Garcia, M. & Castro, A.F.P. - Detecção de Vero citotoxina (VT) em amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com diarréia. Rev. Microbiol., 17:339-341, 1986.

Recebido para publicação em 13/02/89

## DETEÇÃO DE REBANHOS BOVINOS PORTADORES DE MICOPLASMOSE ATRAVÉS DO ISOLAMENTO DE *Mycoplasma bovis* DE EXSUDATOS NASAIS DE BEZERROS

Máira Halfen Teixeira Liberal

Laboratório de Biologia Animal  
Empresa de Pesquisa Agropecuária do  
Estado do Rio de Janeiro  
Alameda São Boaventura nº 770  
24123 Fonseca Niterói, Brasil

### Resumo

Foi realizada uma pesquisa sobre a presença de *Mycoplasmatales* em rebanhos bovinos no Estado do Rio de Janeiro, por meio do cultivo de exsudatos nasais de bezerros. De um total de 144 animais pesquisados, 19 apresentaram resultados positivos, tendo sido isoladas 6 amostras de *M. bovis*, 12 amostras de *A. laidlawii*, e em um animal foi detectada infecção mista por *M. bovis* e *A. laidlawii*. Os resultados servem para alertar aos veterinários da existência de *Mycoplasmatales* nos rebanhos bovinos do Estado do Rio de Janeiro, bem como para que medidas eficazes sejam tomadas, no sentido de se iniciar o isolamento e identificação desses microorganismos de materiais clínicos remetidos aos laboratórios de diagnóstico, para exame microbiológico.

### Introdução

Em geral, pneumonia é a causa mais importante de morbidade e mortalidade de bezerros, podendo ter como agentes: vírus, *Mycoplasmatales* e bactérias. A exacerbão dos sintomas pode ocorrer devido às condições ambientais e de manejo dos animais. Diferentes espécies de *Mycoplasmatales* têm sido isoladas do trato respiratório de bezerros (4, 10, 22), mas algumas são provavelmente comensais ou invasoras oportunistas. As três espécies de *Mycoplasmatales* comumente isoladas de pulmões pneumônicos de bezerros, e que comprovadamente são patogênicas (através de inoculação experimental em animais gnotobióticos) são *Mycoplasma dispar*, *M. bovis* e *Ureaplasma* sp. (7, 9).

*Mycoplasma bovis* tem sido isolado de pulmões pneumônicos de bezerros, assim como de outros bovinos enfermos, notadamente aqueles com mastite, artrite e infecções urogenitais (8). De acordo com Boughton & Wilson (3), as infecções mamárias podem ser subclínicas e, algumas vezes, sem

apresentar uma contagem de célula alta, sendo que a maioria das vacas se apresenta como portadora assintomática (12). Ruhnke & Col. (20) e Bicknell & col. (2) descreveram casos de excreção prolongada, tanto contínua como intermitente, após infecção clínica.

A patogenicidade de *M. bovis* tem sido demonstrada em diferentes localizações anatômicas sob condições experimentais controladas. Este *Mycoplasma* é logo após *M. mycoides* subsp. *mycoides* (causador de pleuropneumonia contagiosa dos bovinos), provavelmente o mais patogênico de todas as espécies de *Mycoplasmatales* isoladas de bovinos (8).

No Brasil, existe pouquíssima informação sobre a ocorrência de *Mycoplasmatales* na população bovina. Em 1978, Rossini e seus colaboradores (18) descreveram o isolamento de *Mycoplasma* sp. de tecido pulmonar de 4 bezerros (de um total de 6 estudados) que haviam morrido por pneumonia. Em 1981 Rossini & Col. (19) reportaram que um dos microorganismos isolados havia sido classificado na Inglaterra como sendo *M. bovis*. Em 1982, Liberal & Col. (14)

e mais tarde Liberal & Romijn (13) descreveram o isolamento de *Mycoplasma* sp. dos pulmões de 16 bezerros que haviam morrido por pneumonia severa no Estado do Rio de Janeiro. O diagnóstico bacteriológico foi confirmado em 12 casos pela presença de achados histológicos característicos dessa enfermidade (4). Infelizmente, os Micoplasmas isolados não puderam ser classificados a nível de espécie, pois não havia no Brasil antíssoro específico para realizar os testes sorológicos para identificação dos microorganismos.

Esta pesquisa foi realizada com o objetivo de identificar as espécies de *Mycoplasmatales* presentes em bovinos do Norte do Estado do Rio de Janeiro, através da cultura e isolamento dos microorganismos à partir de exsudatos nasais de bezerros, detectando assim rebanhos portadores.

## Materiais e Métodos

### a) Isolamento de *Mycoplasmatales*

Foram coletadas amostras do trato respiratório superior (descargas nasais) de bezerros aparentemente saudáveis pertencentes a 7 fazendas situadas no Norte do Estado do Rio de Janeiro. Os animais foram escolhidos ao acaso, na hora da coleta do leite, nos currais, através de swabs nasais. Eles representaram 20% da população total de bezerros de cada fazenda.

As amostras foram coletadas utilizando-se swabs de algodão, estéreis, flexíveis, comprados no comércio, que foram imediatamente colocados em tubos de ensaio, contendo meio "E" de cultivo (17). Os tubos foram mantidos em geladeira ( $4^{\circ}\text{C}$ ) até sua chegada ao laboratório. Estes foram incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  e observados a cada 24 horas para mudança de pH (pelo indicador vermelho de fenol) ou presença de turbidez. Caso uma ou outra alteração fosse observada, a amostra era diluída serialmente (de 10-1 a 10-4), em meio "E". Amostras que não apresentaram qualquer alteração foram mantidas incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 7 dias. Quando as alterações mencionadas foram observadas nos tubos diluídos, as maiores diluições que apresentaram as mudanças já descritas foram semeadas em placas de meio "E" na forma sólida,

usando a semeadura da gota pendente. As placas inoculadas foram incubadas dentro de uma lata contendo um pedaço de algodão umedecido com água (para manter a umidade) e uma vela acesa (para obter uma tensão de CO<sub>2</sub> entre 2 e 3%) e incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  por 7 dias. Após este período, as latas foram abertas e as placas foram minuciosamente observadas ao microscópio, para a visualização das colônias típicas de *Mycoplasmatales*, usualmente designadas como "colônias em ovo frito", devido à forma única de crescimento dos microorganismos. -

Quando as referidas colônias foram visualizadas, blocos de ágar contendo as mesmas foram retirados das placas, com o auxílio de uma espátula flambada e resfriada, colocados em tubos contendo meio "E", e incubados como previamente descrito. Este procedimento foi repetido por 3 vezes utilizando-se o mesmo meio "E" porém sem inibidor (antibiótico), para assegurar que não se tratava de formas "L" de bactéria.

### b) Identificação de *Mycoplasmatales*

As amostras de *Mycoplasmatales* foram identificadas utilizando-se provas bioquímicas e sorológicas.

#### b.1. Provas bioquímicas

##### b.1.1. Dependências de Esteróis

Soluções de poli-anetol sulfonato de sódio (a 5% em água destilada estéril) e digitonina (a 1,5% em etanol absoluto) foram preparadas, e uma gota de uma pipeta Pasteur (0,20µl), de cada solução, foi colocada em diferentes discos (8mm) preparados com papel-filtro estéril (11). Os discos foram deixados para secar durante a noite a  $37^{\circ}\text{C}$ , numa placa de Petri, e depois guardados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , num vidro com tampa de rosca, até serem utilizados.

O teste foi realizado em placas contendo meio "E" sólido, quando uma gota de cada amostra suspeita foi semeada, utilizando-se a técnica de gota pendente. As placas foram deixadas no meio ambiente até que o local de semeadura da amostra tivesse secado, quando os discos foram então colocados sobre a cultura. As placas foram então incubadas novamente a  $37^{\circ}\text{C}$  em ambiente

de 2 a 3% CO<sub>2</sub>. Após 48 horas as placas foram observadas para o aparecimento ou não de zonas de inibição de crescimento à volta dos discos.

Este teste é utilizado para a diferenciação entre as famílias Mycoplasmataceae e Acholeplasmataceae, onde a 1<sup>a</sup> é dependente de esteróis para seu crescimento, e a 2<sup>a</sup> não requer esteróis para crescer.

#### **b.1.2. Fermentação da Glicose**

Este teste foi realizado segundo recomendação de Razin & Cirillo (16) pelo cultivo das amostras em meio que contém glicose (meio "E"). Os tubos semeados foram incubados a 37°C e observados diariamente para mudança de pH ou turbidez. A coloração do meio "E" não inoculado é vermelha, devido à presença do indicador vermelho de fenol (pH 7.6 - 7.8). Os resultados deste teste são assim obtidos:

Positivo - formação de uma coloração do amarelo ao branco = organismos fermentadores de glicose.

Negativo - leve mudança da coloração para laranja ou nenhuma mudança de cor = organismos não fermentadores de glicose.

Um tubo não inoculado foi sempre incubado junto aos outros para servir como testemunha.

O meio "E" além de conter os nutrientes essenciais para o cultivo e isolamento de Mycoplasmatales, serve como indicativo das espécies de Mycoplasmatales que fermentam a glicose, auxiliando na escolha dos antisoros específicos à serem usados nas provas sorológicas.

### **b.2. Provas sorológicas**

#### **b.2.1. Inibição do crescimento**

O teste foi realizado como preconizado por Clyde (5), utilizando-se antisoro específico produzido em coelhos, conforme técnica descrita por Morton & Roberts (15). As amostras isoladas de Mycoplasmatales foram semeadas em meio "E" por 24 a 48hs. Uma gota de pipeta Pasteur (0,20 µl) foi então semeada em placa contendo "E" ágar, utilizando-se a técnica da gota pendente. Quando a linha de cultura estava seca, blocos de ágar foram retirados com o auxílio de uma

espátula, e nos seus lugares foram colocados duas gotas (0,40 µl) de soro específico não diluído, contra as seguintes espécies de Mycoplasmatales: *M. arginini*, *M. dispar*, *M. bovis*, *M. bovoculi*, *A. laidlawii*, *A. oculi* e *A. axanthum*, para cada amostra. As placas foram novamente incubadas a 37°C a uma atmosfera variando de 2 a 3% CO<sub>2</sub>, por 24 a 48 horas, e observadas diariamente para a presença de zonas de inibição de crescimento à volta dos orifícios, utilizando-se um microscópio.

#### **b.2.2. Inibição da formação de filmes**

Este teste é realizado para o sorodiagnóstico de *M. bovis* e *M. bovigenitalium*, que apresentam a característica formação de filmes e manchas, quando crescidos em ágar. O teste é realizado basicamente como descrito para a inibição de crescimento, porém, com a utilização de soro bovino positivo para as espécies de *Mycoplasma* mencionadas. Utilizaram-se discos de papel-filtro estéreis impregnados de soro (23), e seguindo a técnica recomendada por Thorns & Boughton (25). Amostras suspeitas foram inoculadas em placas contendo meio "E" acrescido de gema de ovo (a 10%) e os discos contendo o soro específico colocados sobre a linha de crescimento. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera de 2 a 3% CO<sub>2</sub>, por 24 a 48 horas, e observadas por um período de até 10 dias. A formação de zonas de inibição indicaram um resultado positivo.

### **Resultados e Discussão**

Um total de 144 amostras foram coletadas de 7 fazendas no Estado do Rio de Janeiro. Os animais variaram de 15 dias a 12 meses de idade, sendo todos mestiços (holândes cruzado com zebu).

Embora não existindo nenhuma manifestação clínica de problema respiratório em nenhum dos animais, Mycoplasmatales foram isolados de 13,2% deles (Tabela 1). Levando-se em consideração as provas bioquímicas e sorológicas utilizadas, classificaram-se os isolamentos como *M. bovis* (de 6 animais - Tabela 2), *A.*

Tabela 1 - Resultados positivos para *Mycoplasmatales*<sup>\*</sup> isolados de exsudatos nasais.

FAZENDA	Nº AMOSTRA	POSITIVO	NEGATIVO	PORCENTAGEM DE POSITIVOS
A	30	2	28	6,7
B	31	2	29	6,5
C	11	4	7	36,4
D	19	3	16	15,8
E	13	1	12	7,7
F	18	2	16	11,1
G	22	5	17	22,7
T O T A L	144	19	125	13,2

Tabela 2 - Distribuição das amostras positivas para *M. bovis*.

Símbolos: \* = Isolamento de *M. bovis* e *A. laidlawii* dessa amostra.

FAZENDA	Nº ANIMAL	SEXO	IDADE
A	17	F	5 meses
C	66	M	4 meses
	69*	M	3 meses
	72	F	1 mês
C	124	F	1 mês
	137*	M	2 meses
	141	M	15 dias

Tabela 3 - Distribuição das amostras positivas para *A. laidlawii*.

Símbolos: \* = Isolamento de *M. bovis* e *A. laidlawii* dessa amostra.

FAZENDA	Nº ANIMAL	SEXO	IDADE
A	22	F	6 meses
B	38	F	12 meses
	56	M	4 meses
C	65	F	4 meses
D	77	F	1,5 meses
	84	M	4 meses
	85	M	4 meses
E	93	M	1 mês
F	110	F	3 meses
	117	F	3 meses
G	137*	M	2 meses
	142	F	15 dias
	144	F	2 meses

Tabela 4 - Distribuição geral das amostras positivas para Mycoplasmatales.

FAZENDA	<i>M. bovis</i>	<i>A. laidlawii</i>	<i>M. bovis + A. laidlawii</i>
A	1	1	-
B	-	2	-
C	3	1	-
D	-	3	-
E	-	1	-
F	-	2	-
G	2	2	1
TOTAL	6	12	1

Tabela 5 - Frequência de Mycoplasmatales isolados de descargas nasais de bezerros.

CLASSIFICAÇÃO	Nº DE ISOLAMENTOS	PORCENTAGEM DE CADA
<i>M. bovis</i>	6	4,2
<i>A. laidlawii</i>	12	8,3
<i>M. bovis + A. laidlawii</i>	1	0,7
Negativo	125	86,8
TOTAL	144	100,0

*laidlawii* (12 animais - Tabela 3), e ambos *M. bovis* e *A. laidlawii* de 1 animal (Tabela 4). De todas as fazendas estudadas Mycoplasmatales foram isolados, sendo um isolamento obtido de um animal com apenas 15 dias de idade (*M. bovis*), e a grande maioria dos outros isolamentos de animais variando entre 1 e 4 meses de idade.

O isolamento de *M. bovis* de 7 dos 144 animais estudados (4,9% - Tabela 5), é um importante achado devido à associação de *M. bovis* com pneumonia em bezerros bem como mastite em vacas. Conforme previamente descrito por Boughton & Wilson (3), infecção por *M. bovis* em bovinos jovens é geralmente associada a doenças respiratórias e pode ser uma fonte de infecção para animais adultos. Desta maneira, a alta porcentagem de vacas com mastite subclínica descrita por Freitas & Col. (6) pode ser parcialmente devida à existência de animais acometidos por infecções causadas por *M. bovis* nos rebanhos da região.

As fazendas estudadas apresentaram o mesmo sistema básico de manejo dos

animais, mesmo de pastagem e coleta de leite das vacas (duas vezes por dia), e se encontram situadas nos Municípios de Cantagalo e Itaperuna, no Estado do Rio de Janeiro. Em todas elas foi identificado o hábito de compra e venda de animais principalmente de Minas Gerais e municípios vizinhos.

Embora *M. bovirhinis* tenha sido isolado por outros pesquisadores (24, 21, 22) com frequência, de descargas nasais de bezerros aparentemente sadios, bem como da cavidade nasofaringeana de bezerros com pneumonia (4), este microorganismo não foi isolado de nenhum bezerro nesta pesquisa. Como *M. bovirhinis* cresce rapidamente em meio "E", acidificando muito o meio de cultivo, existe a possibilidade dele não ter sobrevivido até a fase de subcultura. A presença de bactérias contaminantes (identificadas posteriormente como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Bacillus subtilis* entre outras) é outro fator que pode ter influenciado tanto no não isolamento de *M. bovirhinis*, como diminuído a chance de um maior

aparecimento das outras espécies de *Mycoplasmatales*.

Durante a pesquisa, a introdução de acetato de tálio no meio de cultivo foi testada para diminuir a contaminação por outras bactérias, o que melhorou o crescimento de *Mycoplasmatales* mas não eliminou por completo a presença dos contaminantes, mesmo quando diluições (de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-4</sup>) foram feitas. A melhor alternativa encontrada foi a filtragem das amostras em filtros descartáveis de 0,45µm, que são caríssimos. Assim sendo, a introdução de algum outro antibiótico no meio primário de cultivo deve ser pesquisada para solucionar este problema.

#### Summary

#### *Detection of mycoplasmoses carriers in bovine herds by the isolation of *Mycoplasma bovis* from calves' nasal exudates*

Research was carried out by means of nasal swabs collected from calves, for the presence of *Mycoplasmatales* in bovine herds at Rio de Janeiro State. From a total of 144 animals sampled in the survey, 19 presented positive results, with 6 isolates of *Mycoplasma bovis*, 12 isolates of *Acholeplasma laidlawii*, and from one animal a mixed isolation of *M. bovis* and *A. laidlawii* was obtained. These results are important to draw the attention of the veterinarians about the presence of *Mycoplasmatales* in the bovine population at Rio de Janeiro State, and also to introduce the measures for isolation and identification of these organisms from clinical material sent to the Laboratory for microbiological examination.

#### Agradecimentos

Ao Dr. E. Boughton do Central Veterinary Laboratory, do MAFF, Inglaterra, pela orientação e permissão para desenvolver os trabalhos de pesquisa naquela instituição.

#### Referências Bibliográficas

1. Bennett, R.H. & Jasper, D.E. - Nasal

prevalence of *Mycoplasma bovis* and IHA titres in young dairy animals. The Cornell Veterinarian, 67(3):361-73, 1977.

2. Bicknell, S.R.; Gunning, R.F.; Jackson, G.; Boughton, E. & Wilson, C.D. - Eradication of *Mycoplasma bovis* infection from a dairy herd in Great Britain. The Veterinary Record, 112(13):294-7, 1983.
3. Boughton, E. & Wilson, C.D. - *Mycoplasma bovis* mastitis. Vet. Rec., 103(4):70-1, 1978.
4. Bryson, D.G.; McFerran, N.B.; Ball, H.J. & Neill, S.D. - Observations on outbreaks of respiratory disease in housed calves. 2. Pathological and microbiological findings. Vet. Rec., 103(23):503-9, 1978.
5. Clyde, W.A. Jr. *Mycoplasma* species identification based upon growth inhibition by specific antisera. J. Immunol., 22:958-63, 1964.
6. Freitas, M.A.Q. de; Vollú, E.W.; Liberal, M.H.T.; Magalhães, H.; Gonçalves, W.M.; Freitas, M.Q. de. & Cerqueira, A.M.F. - Prevalência de mastite subclínica na Bacia Leiteira de Cantagalo-RJ. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 20, Cuiabá, 1986. Anais... Cuiabá, Universidade Federal de Mato Grosso, 1986, p.260.
7. Gourlay, R.N.; Thomas, L.H. & Howard, C.J. - Pneumonia and arthritis in gnotobiotic calves following inoculation with *Mycoplasma agalactiae* subsp. *bovis*. The Veterinary Record, 98(25):506-7, 1976.
8. Gourlay, R.N. & Howard, C.J. - Bovine Mycoplasma. In: Tully, J.C. & Whitcomb, R.F. ed. The Mycoplasmas; human and animal mycoplasma. New York, Academic Press, 1979, v.2., p.49-102.
9. Gourlay, R.N.; Howard, C.J.; Thomas, L.H. & Wyld, S.G. - Pathogenicity of some *Mycoplasma* and *Acholeplasma* species in the lungs of gnotobiotic calves. Research in Veterinary Science, 27(2):233-7, 1979.
10. Gourlay, R.N. & Howard, C.J. - Recovery and identification of bovine mycoplasmas. In: Tully, J.C. & Razin, S. ed. Methods in mycoplasmatology; diagnostic mycoplasmatology, London, Academic Press, 1983. v.2. p.81-89.
11. International Committee on

- Systematic bacteriology. Proposal of minimal standards for descriptions of new species of the class *Mollicutes*. *Int. J. Syst. Bact.*, 29:172-80, 1979.
12. Jasper, D.E. - *Mycoplasma* and *Mycoplasma mastitis*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 170:1167-72, 1977.
13. Liberal, M.H.T. & Romijn, P.C. - Casos de Mycoplasmose bovina diagnosticados en Cantagalo/RJ no período de 1980 a 1984. Niterói, Pesagro-Rio, 1988. 3f. (Pesagro-Rio. Comunicado Técnico, 193).
14. Liberal, M.H.T.; Romijn, P.C. & Voilú, E.W. - Presença de *Mycoplasma* sp. em pulmão de bezerros de até um ano de idade. Cantagalo-RJ. Niterói, Pesagro-Rio, 1982. 3f. (Pesagro-Rio. Pesquisa em Andamento, 8).
15. Morton, H.E. & Roberts, R.J. - Production of anti-*Mycoplasma* (PPLO) antibodies in rabbits. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 125:538-43, 1967.
16. Razin, S. & Cirillo, V.P. - Biochemical and enzymatic tests in *Mycoplasma* identification: sugar fermentation. In: Razin, S. & Tully, J.G. ed. *Methods in Mycoplasmology, Mycoplasma Characterization*. London, Academic Press, 1983. v.1. p.337-43.
17. Roberts, D.H. & Pijoan, - Identification of *Mycoplasma hyorhinis*. *The British Veterinary Journal*, 127(12):582-6, 1971.
18. Rossini, A.J.; July, J.R. & Jerez, J.A. - *Mycoplasma* sp isoladas do tecido pulmonar de bezerros acometidos de pneumonia. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 45(4):213-4, 1978.
19. Rossini, A.J.; Zelante, F.; July, J.R. & Oliveira Jr., B.S. - Mycoplasmose bovina: Isolamento de *Mycoplasma bovis* de bezerros acometidos de pneumonia. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 48(1/4):5-10, 1981.
20. Ruhnke, H.L.; Thawley, D. & Nelson, F.C. - Bovine mastitis in Ontario due to *Mycoplasma agalactiae* subsp. *bovis*. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 40(2):142-8, 1976.
21. Shimizu, T.; Nosaka, D. & Nakamura, N. - An enzootic of calf pneumonia associated with *Mycoplasma bovirhinis*. *Jap. J. Vet. Sci.*, 35(4):535-7, 1973.
22. Springer, W.T.; Fulton, R.W.; Hagstad, H.V.; Nicolson, S.S. & Garton, J.D. - Prevalence of *Mycoplasma* and *Chlamydia* in the nasal flora of dairy calves. *Vet. Microbiol.*, 7(4):351-7, 1982.
23. Stanbridge, E. & Hayflick, L. - Growth inhibition test for identification of *Mycoplasma* species utilizing dried antiserum impregnated paper discs. *Journal of Bacteriology*, 93(4):1392-6, 1967.
24. Thomas, L.H. & Smith, G.S. - Distribution of mycoplasmas in the non-pneumonic bovine respiratory tract. *J. Comp. Path.*, 82(1):1-4, 1972.
25. Thorns, C.J. & Boughton, E. - Studies on film production and specific inhibition, with special reference to *Mycoplasma bovis* (*M. agalactiae* var. *bovis*). *Zentbl. Vet. Med.*, 25B(8):657-67, 1978.

Recebido para publicação em 17/03/89

# OCORRÊNCIA DE CAMPYLOBACTER TERMOFÍLICO EM DIFERENTES PONTOS DE UMA ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ESGOTOS NA CIDADE DO RIO DE JANEIRO, RJ

Ana Luzia Lauria Filgueiras  
& Ernesto Hofer

Deptº de Bacteriologia  
Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ  
Caixa Postal 926  
21040 Rio de Janeiro RJ, Brasil

## Resumo

Investigou-se durante o período de 1986 a 1988, a incidência de espécies termofílicas de *Campylobacter* em duzentas amostras de água colhidas de afluente, entrada e saída do tanque de aeração e efluente da estação de tratamento de esgotos, na Ilha do Governador, R.J. No processo de isolamento, alguns esquemas foram experimentados, destacando-se a maior eficiência da semeadura em "Columbia Blood Agar Base" contendo 5% FBP, 0,5% de uma mistura de antibióticos e 0,4g% de carvão ativado, após incubação a 43° C por 48 horas em microaerofilia. Verificou-se a predominância de *Campylobacter* no afluente e entrada do tanque, representada por 40 estirpes ou 83% dos 48 isolamentos obtidos. A identificação fenotípica caracterizou as seguintes espécies: *C. jejuni* (56,25%), *C. coli* (25,0%), *C. laridis* (6,25%) e *Campylobacter* sp. (12,5%), sendo que as duas primeiras não foram detectadas nos efluentes examinados. Com base neste resultado, questiona-se a disseminação de certas espécies termofílicas de *Campylobacter*, através de efluentes de estações de tratamento de esgotos.

## Introdução

Apesar da extraordinária evolução de conhecimentos adquiridos nos dois últimos decênios, sobre vários aspectos da biologia de membros do gênero *Campylobacter* (13), algumas lacunas ainda persistem. Um dos pontos obscuros, se situa no comportamento desses microrganismos às condições impostas em escossistemas aquáticos resultantes da influência humana, particularmente, naqueles ambientes com elevado índice de contaminação fecal.

É importante frisar que a maioria das referências sobre *Campylobacter* em sistemas aquáticos se concentrou basicamente no problema do isolamento em águas de consumo, de recreação e da natureza (6). Todos esse interesse visou precipuamente identificar a água, como um possível veículo de transmissão do agente da campilobacteriose humana (25).

Por outro lado, considerando-se que a sobrevivência de *Campylobacter* em fezes humanas e animais pode atingir até quatro semanas (2, 3), paradoxalmente, exíguas são as análises que se detiveram em estudar a presença e distribuição desse microrganismo em águas cloacais ou em qualquer das etapas de uma estação de tratamento de esgotos (24).

Baseado nesta circunstância, o presente trabalho se concentrou na pesquisa de componentes termofílicos do gênero *Campylobacter* em etapas do processo biológico realizado em uma estação de esgotos localizada na cidade do Rio de Janeiro, R.J.

## Material e Métodos

No período de abril de 1986 a abril de 1988, foram realizadas 200 coletas de águas da estação de tratamento de

esgotos da Ilha do Governador, R.J., obtidas de quatro pontos distintos: afluente (A), entrada do tanque de aeração (ET), saída do tanque de aeração (ST) e efluente (E).

De cada local recolheu-se 120ml de água, em frascos esterilizados, tomando-se a precaução de encaminhar o material até o laboratório, no prazo máximo de 1 hora, onde foi submetido, imediatamente a centrifugação a 3000rpm durante 30 minutos.

Na 1<sup>a</sup> fase do estudo, após a centrifugação, transferiu-se inóculos de 1ml do sedimento para 4 diferentes meios de enriquecimento e 0,1ml, para placas contendo meios seletivos. Os meios de enriquecimentos empregados foram os seguintes: meio BEM (21); meio de Mehlman (18); meio básico com sangue - MBS (caldo nutritivo, Difco - 4g; NaCl - 2,5g; extrato de levedura, Difco - 0,5g; agar Difco - 0,75g, água destilada - q.s.p. 500ml/pH 7,4 - 7,6) e o meio básico com carvão - MBC (com a mesma formulação anterior porém, acrescida de 2g de carvão ativado, Grupo Química). Antes de distribuí-los em volume de 10ml por tubo, foram adicionados aos meios: 5% da solução redutora de FBP (9); 0,5% da seguinte mistura de antibióticos: cefalotina, Libra - 81mg; lactato de trimetoprim Roche - 25mg; vancomicina, Lilly - 50mg; cicloheximida, Upjohn - 10mg e colistina, Iafi - 11mg em 25ml de água destilada e 5% de sangue desfibrinado de carneiro, com exceção do meio de carvão. No processo de semeadura direta foi utilizado como meio básico "Columbia Blood Agar Base", Difco/Merck acrescido de 5% de FBP e 0,5% da solução de antibióticos, com duas variações: uma, contendo 5% de sangue desfibrinado de carneiro (CS) e a outra, 0,4g de carvão ativado (CC).

As placas e os tubos foram incubados por 48 horas a 43°C, em atmosfera de microaerofilia gerada por uma modificação na técnica da passivação do cobre (1, 17). Em síntese, o processo consistiu em trituar 1 comprimido de Sonrisal (Sidney Ross), em uma base de placa de Petri, cobri-lo com um pedaço de papel de filtro tipo xarope e sobre este, depositar 10g de palha de aço (Bombril) embebido em solução acidulada de sulfato de cobre (1). Todo este conjunto foi colocado sobre o material semead, contido na jarra metálica do

tipo Brewer, com capacidade de 3,5 litros.

As colônias suspeitas foram selecionadas, presuntivamente, através das características morfo-tintoriais pelo método de Gram e pela pesquisa de oxidase e catalase, completando-se com a análise bioquímica (23). Nas amostras classificadas no gênero *Campylobacter* verificou-se, ainda a sensibilidade ao ácido nalidíxico, (disco de 30µg - Cecon) e a cefalotina (disco de 30µg - Cecon) em meio de agar Mueller-Hinton, Difco/Merck, acrescido de 5% de sangue desfibrinado de carneiro. Na ocorrência de halo de sensibilidade ao ácido nalidíxico igual ou superior a 32mm, foi realizado o teste de hidrólise de hipurato (15), para diferenciação entre *C. jejuni* e *C. coli*.

Dos meios de enriquecimento foram transferidas alíquotas de 0,1ml para placas contendo os meios seletivos Agar Columbia Sangue (CS) e carvão (CC) e incubadas a 43°C por 48 horas em atmosfera de microaerofilia. A seqüência do exame obedeceu os mesmos critérios descritos para a semeadura direta.

Na 2<sup>a</sup> fase do experimento, restringiu-se o processamento dos espécimes a semeadura do centrifugado no meio de Agar Columbia com carvão (CC), opção decorrente dos resultados obtidos na 1<sup>a</sup> etapa da investigação.

## Resultados e Discussão

No primeiro período do estudo, a análise dos 80 espécimes de águas residuais, possibilitou o isolamento de 29 culturas de *Campylobacter* spp., sendo a maioria (25 ou 86,2%) resultante das fases iniciais do tratamento biológico, representados pelo afluente e entrada do tanque de aeração (Tabela 1).

Esta fase também permitiu prognosticar sobre a eficiência dos quatro meios de enriquecimento empregados, dos quais, sobressaiu-se como mais satisfatório, o meio básico com sangue-MBS (Tabela 1). Todavia, confrontando-se este resultado (6 ou 20,6%) com aquele obtido na semeadura direta (17 ou 58,62%) ficou evidente que este processo de isolamento, se revelou mais eficaz, além de favorecer

Tabela 1 - Comportamento dos diversos esquemas de isolamento de *Campylobacter* spp. aplicados na análise de 80 amostras de águas residuais (1ª fase) colhidas de quatro pontos da estação de tratamento de esgotos da Ilha do Governador, RJ. Símbolos: \* = De cada área foram coletadas 20 amostras; \*\* = Agar Columbia Sangue (CS), Agar Columbia Carvão (CC); \*\*\* = Meio Básico com Sangue (MBS), Meio Básico com Carvão (MBC).

Origem *	Semeadura direta		Meios de enriquecimento								TOTAL	
			BEM		MEHLMAN		MBS***		MBC***			
	CS**	CC**	CS	CC	CS	CC	CS	CC	CS	CC	CS	CC
Afluente	3	5	1	-	-	1	1	1	-	1	5	8
Entrada do tanque	3	2	1	1	-	-	1	3	-	1	5	7
Saída do tanque	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
Efluente	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
T O T A L	8	9	2	1	-	1	2	4	-	2	12	17

Tabela 2 - Distribuição e freqüência de *Campylobacter* spp. isolados nas duas fases do estudo de 200 espécimens de águas residuais da estação de tratamento de esgotos da Ilha do Governador, RJ.

O R I G E M	Relação do número de espécimens examinados /					
	Nº de amostras positivas		1ª Fase		2ª Fase	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Afluente	20/12	60,00	30/8	26,66	50/20	40,00
Entrada do tanque	20/13	65,00	30/7	23,33	50/20	40,00
Saída do tanque	20/2	10,00	30/3	10,00	50/5	10,00
Efluente	20/2	10,00	30/1	3,33	50/3	6,00
T O T A L	80/29	36,25	120/19	15,83	200/48	24,00

um resultado mais imediato na detecção de *Campylobacter*.

Outro aspecto analisado nesta etapa, se concentrou na atuação dos meios seletivos, Agar Columbia Sangue (CS) e Agar Columbia Carvão (CC), tanto na semeadura direta quanto após o enriquecimento. Salienta-se que não houve uma superioridade entre eles,

apresentando desta forma uma concordância com as opiniões emitidas por diferentes pesquisadores (14, 19, 20). Entretanto, destaca-se que o meio contendo carvão (CC) propiciou uma diferenciação mais nítida das colônias de *Campylobacter* spp., devido ao aspecto contrastante do "brilho d'água" no fundo escuro. Outra vantagem sobre o

Tabela 3 - Distribuição das espécies termofílicas de *Campylobacter* nas diferentes etapas do processo biológico da estação de tratamento de esgotos da Ilha do Governador, RJ.

Símbolos: Etapas do tratamento: A = Afluente; ET = Entrada do tanque de aeração; ST = Saída do tanque de aeração; E = Efluente.

E S P É C I E S	E T A P A S				T O T A L	
	A	E T	ST	E	Nº	%
<i>C. jejuni</i>	13	13	1	-	27	56,25
<i>C. coli</i>	6	5	1	-	12	25,00
<i>C. laridis</i>	-	-	2	1	3	6,25
<i>Campylobacter</i> sp.	1	2	1	2	6	12,50
T O T A L	20	20	5	3	48	100,00

meio com sangue (CS) reside no fato do carbôo ativado apresentar uma constância do ponto de vista químico, não sofrendo as variações quanto a qualidade ou a falta de suprimento (4, 11, 12), eliminando, por conseguinte, os problemas de manutenção por prazo definido, assim como, minimiza as contaminações tão frequentes nos meios contendo sangue.

Após a fase inicial de prospecção, foram efetuadas mais 30 colheitas nos quatro pontos distintos da mesma estação de tratamento, totalizando 200 amostras com 24% de positividade para *Campylobacter* spp. De forma similar à primeira etapa, observou-se a maior incidência do isolamento no afluente e na entrada do tanque de aeração (Tabela 2).

Em princípio, salienta-se que o resultado obtido extrapolou a concepção de uma tentativa de associar a capacidade de sobrevivência de *Campylobacter* em fezes humanas e animais para as águas de esgoto. A evidência da discreta detecção do microrganismo nas etapas finais do tratamento de esgotos (saída do tanque de aeração e efluente) permitiu deduzir que as águas tratadas não apresentaram as características de um veículo potencial de transmissão da bactéria no ciclo da contaminação ambiental. Também neste ponto existe uma certa contradição com as citações da

literatura (2, 5, 7, 10, 22) que apontam a água como um elemento satisfatório na sobrevivência de *Campylobacter*. No entanto, ressalta-se que a totalidade das investigações supracitadas, analisaram águas com um nível de contaminantes bem inferior àquele proveniente de qualquer fase de uma estação de tratamento de esgotos.

Apesar de se advogar perfunctoriamente a hipótese da discreta importância do efluente no mecanismo de veiculação de *Campylobacter* ao meio ambiente, é necessário que outras pesquisas sejam efetuadas procurando-se analisar as possíveis influências exercidas por certos parâmetros bióticos e abióticos sobre o microrganismo. Assim, relacionam-se como pontos básicos de análises futuras as observações sobre a temperatura ambiental, pH, o nível de demanda bioquímica de oxigênio, condutividade elétrica, concentração de sais e as interferências de outros microrganismos que colonizam as diferentes áreas de uma estação de tratamento.

Quanto a freqüência e distribuição das espécies termofílicas caracterizadas fenotipicamente (Tabela 3), assinala-se a nítida predominância de *Campylobacter jejuni* (27 ou 56,25%) sobre as demais, provavelmente refletindo a maior adaptação e propagação na espécie

humana. É interessante observar que tanto *C. jejuni* como *C. coli*, apresentam uma incidência muito homogênea nas etapas iniciais do tratamento (afluente e entrada do tanque de aeração) isto é, em níveis superiores a 90% de isolamentos (*C. jejuni* 27/26 ou 96,2% e *C. coli* 12/11 ou 91,6%) e de forma similar, também se comportam nas fases finais do processo (Tabela 3). Em contraposição, *C. laridis* só foi detectada na saída do tanque de aeração e efluente, inclusive incitando a hipótese de uma contaminação posterior oriunda, provavelmente, de fezes de aves marinhas (8, 16), presentes na área.

#### Summary

#### *Occurrence of thermophilic Campylobacter in different points of a sewage treatment station in Rio de Janeiro, R.J.*

From 1986 to 1988 the incidence of thermophilic *Campylobacter* was investigated in two hundred samples of water collected from influent, air box tank and effluent of a sewage treatment plant located in Ilha do Governador, Rio de Janeiro. Among the culture media analysed the best results were obtained from the direct streaking onto selective agar with 0.4g activated charcoal, incubated at 43°C in a microaerophilic atmosphere for 48 hours. On the whole 48 samples proved positive, from which 40 strains were taken, predominantly from influent and entrance of air box tank (40 strains or 83%). Phenotypic identification characterized the following species: *C. jejuni* (56.25%); *C. coli* (25.0%) - not detected in the effluents searched - *C. laridis* (6.52%) and *Campylobacter* sp. (12.5%). Based on these findings the dissemination of some thermophilic species (*C. jejuni* and *C. coli*) through the effluent of a sewage treatment station become questionable.

#### Agradecimentos

Aos técnicos de pesquisa, Evaldo Soares da Silva e José Caetano Alves pela colaboração técnica prestada.

#### Referências Bibliográficas

- Attebery, H.R. & Finegold, S.M. - A miniature anaerobic jar for tissue transport or for cultivation of anaerobes. Am. J. Clin. Pathol., 53:383-388, 1970.
- Blaser, M.J.; Hardesty, H.L.; Powers, B. & Wang, W.L. - Survival of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in biological milieus. J. Clin. Microbiol., 11:309-313, 1980.
- Blaser, M.J.; Taylor, D.N. & Feldman, R.A. - Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections. Epidemiol. Rev., 5:157-176, 1983.
- Bolton, F.J.; Hutchinson, D.N. & Coates, D. - Blood-free selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. J. Clin. Microbiol., 19:169-171, 1984.
- Bolton, F.J.; Coates, D.H.; Hutchinson, D.N. & Godfree, A.F. - A study thermophilic campylobacters in a river system. J. Appl. Bacteriol., 62:167-176, 1987.
- Carter, A.M.; Pacha, R.E.; Clark, G.W. & Williams, E.A. - Seasonal occurrence of *Campylobacter* sp in surface waters and their correlation with standard indicator bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 53:523-526, 1987.
- Franco, D.A. - *Campylobacter* species: considerations for controlling a foodborne pathogen. J. Food Prot., 51:145-153, 1988.
- Fricker, C.R.; Girdwood, R.W.A. & Munro, D. - A comparison of procedures for the isolation of campylobacters from seagull faeces. J. Hyg. Camb., 91:445-450, 1983.
- George, H.A.; Hoffman, P.S.; Smibert, R.M. & Krieg, N.R. - Improved media for growth and aerotolerance of *C. fetus*. J. Clin. Microbiol., 8:36-41, 1978.
- Godrosen, B. - Survival of thermophilic campylobacters in water. In: Pearson, A.D. et al (eds). *Campylobacter II*, PHLS, London, 1983.
- Goossens, H.; Boeck, M.; Coignau, H.; Vlaes, L.; Borre, C.V.D. & Butzler, J.P. - Modified selective medium for isolation of *Campylobacter* sp from feces: comparison with Preston medium, a blood-free medium and a filtration system. J. Clin. Microbiol..

- 24:804-843, 1986.
- 12.Gun-Munro, J.; Rennie, R.P.; Thornley, J.H.; Richardson, H.L.; Hodge, D. & Lynch, J. - Laboratory and clinical evaluation of isolation media for *C. jejuni*. *J. Clin. Microbiol.*, 25:2274-2277, 1987.
- 13.Kaijser, B. - *Campylobacter jejuni/coli*. *APMIS* 96:283-288, 1988.
- 14.Karmali, M.A.; Simor, A.E.; Roscoe, M.; Fleming, P.C.; Smith, S.S. & Lane, J. - Evaluation of a blood-free, charcoal - based, selective medium for the isolation of *Campylobacter* organisms from feces. *J. Clin. Microbiol.*, 23:456-459, 1986.
- 15.Lior, H. - New, extended biotyping scheme for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and "*Campylobacter laridis*". *J. Clin. Microbiol.*, 20:636-640, 1984.
- 16.Luetchtelefeld, N.A.; Blaser, M.J.; Reller, L.B. & Wang, W.L. - Isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* from migratory waterfowl. *J. Clin. Microbiol.*, 12:406-408, 1980.
- 17.Magalhães, M.; Andrade, M.A. & Silva, G.P. - Método simples e econômico para cultivar *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*. *Rev. Microbiol. (São Paulo)*, 13:124-125, 1982.
- 18.Mehlman, I.J. & Romero, A. - Improved growth medium for *Campylobacter* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43:615-618, 1982.
- 19.Moran, A.P. & Upton, M.E. - Effect of medium supplements, illumination and superoxide dismutase on the production of coccoid forms of *Campylobacter jejuni* ATCC 29428. *J. Appl. Bacteriol.*, 62:43-51, 1987.
- 20.Ng, Lai-King; Stiles, M.E. & Taylor, D.E. - Comparison of basal media for culturing *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Clin. Microbiol.*, 21:226-230, 1985.
- 21.Rogol, M.; Shpak, B.; Rothman, D. & Sechter, I. - Enrichment medium for isolation of *Campylobacter jejuni* - *Campylobacter coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50:125-126, 1985.
- 22.Rollins, D.M. and Colwell, R.R. - Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role survival in the natural aquatic environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52:531-538, 1986.
- 23.Smibert, R.M. - Genus *Campylobacter* Sebald, and Véron, 1963, 907AL. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. N.R. Krieg & J.G. Holt, ed, vol. I (pp. 111-118). Williams & Wilkins, Co., Baltimore, 1984.
- 24.Stelzer, W. - Untersuchungen zum Nachweis von *Campylobacter jejuni* und *C. coli* in Abwasser. *Zentralbl. Mikrobiol.*, 143:47-54, 1988.
- 25.Taylor, D.N.; Mc Dermott, K.T.; Little, J.R.; Wells, J.G. & Blaser, M.J. - *Campylobacter enteritis* from untreated water in the Rocky Mountains. *Ann. Int. Med.*, 99:38-40, 1983.

Recebido para publicação em 30/03/89

# SUSCEPTIBILIDADE DO *CAMPYLOBACTER PYLORI* A NOVE AGENTES ANTIMICROBIANOS\*

Marcelo Magalhães  
Vera Magalhães

Laboratório de Imunopatologia Keizo  
Asami UFPE  
Deptº de Medicina Tropical  
Cidade Universitária  
50739 Recife PE, Brasil

G. Carneiro Leão  
& L.P.R. Galvão

Centro de Endoscopia do Recife

## Resumo

Setenta linhagens de *Campylobacter pilory*, isoladas no Recife, Brasil, do antro gástrico de humanos, foram testadas pelo método das diluições em ágar contra nove agentes antimicrobianos. Considerando as CIM 50 e CIM 90 como critérios de atividade, a droga mais ativa foi ampicilina seguida em ordem decrescente de atividade pela cefotaxima, minociclina, cefalotina, gentamicina, norfloxacina, eritromicina, lomefloxacina e cloranfenicol. Portanto, em vista do excelente desempenho "in vitro" da ampicilina, sugeriu-se seu emprego em ensaios clínicos.

## Introdução

Nos últimos anos, *Campylobacter pilory* vem sendo insistentemente relacionado à etiologia das gastrites humanas e das úlceras gastro-duodenais (2, 5, 9, 11, 15). A presença frequente do microrganismo em fragmentos do estômago, obtidos por biópsias do antro, geralmente em abundância, destruiu velhos conceitos de que as úlceras e gastrites decorriam de alcoolismo, tabagismo, fatores psíquico-somáticos, etc., e abriu amplas perspectivas à terapêutica daquelas afecções com drogas antimicrobianas (4, 7, 10, 12). Nessa conexão, a primeira etapa para racional abordagem do problema será conhecer o perfil de susceptibilidade antibiótica do *C. pilory*, que poderia apresentar peculiaridades regionais na dependência de costumes terapêuticos.

Assim, o propósito desta

investigação é determinar, "in vitro", a sensibilidade de linhagens de *C. pilory*, isoladas no Recife, a variados agentes antimicrobianos, para posterior avaliação das drogas mais ativas em eventual estudo clínico controlado.

## Material e Métodos

### *Isolamento e identificação das culturas*

- Três fragmentos de mucosa gástrica, obtidos por biópsia do antro, foram depositados em tubos de hemólise contendo 0,3ml de uma solução de glicose a 20%. Os tubos foram mantidos a 4°C até serem enviados ao setor de Microbiologia Clínica do Laboratório Keizo Asami (UFPE). Os fragmentos foram esmagados, com a ajuda de bastões de vidro esterilizados. O macerado resultante foi inoculado em ágar chocolate (meio basal GC, Difco, enriquecido com 7% de sangue

\*Trabalho financiado pelo CNPq (Processo nº 409020/88) e Japanase International Cooperation Agency.

desfibrinado de carneiro), tornado seletivo pela adição de uma mistura de drogas antimicrobianas (6). As placas foram incubadas a 37°C, durante 6 a 7 dias, em atmosfera de microaerofilia (sistema GasPak, BBL) em jarras de anaerobiose desprovistas do catalizador de paládio. As colônias suspeitas foram confirmadas como *C. pilory*: se constituídas por bacilos Gram negativos, se reativas aos testes de oxidase, catalase e urease (13), se produziram gama-glutamil transpeptidase (Gonocheck II, E.Y. Laboratories) e se foram susceptíveis à cefalotina mas resistentes ao ácido nalidíxico (1, 2, 14). Selecionaram-se 70 culturas de *C. pilory*, as quais foram suspensas em sangue desfibrinado de carneiro e conservadas a -70°C para estudo posterior.

**Testes de Sensibilidade** - Foram realizados em meio GC (Difco) adicionado de Suplemento II (Merck). As drogas foram testadas em diluições sucessivas, à razão de 2. Os seguintes antimicrobianos foram usados: ampicilina (Laborterápica-Bristol); cefalotina (Eli Lilly do Brasil); cefotaxima (Hoechst do Brasil); eritromicina (Eli Lilly do Brasil); gentamicina (Ind. Química e Farmacêutica Shering); cloranfenicol (Sigma Chemical Co.); minociclina (Cynamid Co.); norfloxacina (Merck Sharp Dhome) e lomefloxacina (G.D. Searle & C.). As linhagens a ser testadas foram descongeladas à temperatura ambiente e cultivadas, durante 3 dias, em ágar chocolate, em microaerofilia. O crescimento bacteriano foi suspenso em caldo de Mueller-Hinton (Difco) e diluído a uma capacidade padronizada para fornecer, aproximadamente,  $1 \times 10^7$  unidades formadoras de colônias (UFC) por mL. As suspensões bacterianas foram depositadas na superfície do ágar, em volumes de 1  $\mu$ L, com a ajuda de replicador de Steers. Portanto, a concentração final por "spot" foi equivalente a  $1 \times 10^4$  UFC. As placas foram incubadas em microaerofilia por três dias e as CIMS definidas como as concentrações mínimas das drogas capazes de inibir completamente o crescimento bacteriano. As CIMS 50 e 90 foram as menores concentrações de droga que inibiram, respectivamente, 50% e

Tabela 1 - Sensibilidade aos antimicrobianos de 70 linhagens de *C. pilory*.

Antimicrobiano	Variação	CIM (ug/ml)	
		50%	90%
Ampicilina	0,008 - 0,06	0,01	0,03
Cefalotina	0,06 - 0,5	0,09	0,18
Cefotaxima	0,03 - 0,12	0,03	0,08
Gentamicina	0,12 - 0,9	0,2	0,3
Eritromicina	0,12 - 2	0,3	0,8
Cloranfenicol	1 - 8	2,4	6,2
Minociclina	0,03 - 0,12	0,04	0,1
Norfloxacina	0,12 - 1	0,3	0,5
Lomefloxacina	0,25 - 2	0,4	1,4

90% das linhagens testadas. Como controle, foi incluída nos testes a cultura padrão de *Escherichia coli* ATCC 25922.

## Resultados

As CIMS das 70 linhagens de *C. pilory*, isoladas dos pacientes portadores de gastrite, estão expostas na Tabela 1. Considerando-se os valores das CIMS 50 e 90%, como critérios de atividade, a droga mais ativa foi a ampicilina, seguida em ordem decrescente pela cefotaxima, minociclina, cefalotina, gentamicina, norfloxacina, eritromicina, lomefloxacina e cloranfenicol.

## Discussão

Os presentes resultados não diferem substancialmente de outros, publicados anteriormente, relativos à droga-sensibilidade de cepas de *C. pilory* isoladas em países desenvolvidos (3, 8, 14). Esse achado é, até certo ponto, surpreendente, se levamos em consideração que no Recife, assim como em outras cidades brasileiras, as drogas antimicrobianas são livremente vendidas sem prescrição médica. Era de se esperar, portanto, a ocorrência de linhagens droga-resistentes ou, pelo menos, a de culturas exigindo CIMS muito mais altas, especialmente para as drogas beta-lactâmicas e tetraciclinas, os antibióticos mais freqüentemente utilizados. Felizmente isso não ocorreu, talvez devido ao relacionamento topológico entre o *C. pilory* e a mucosa gástrica. Na

realidade, o microrganismo é observado sobre ou entre as células parietais, não invade o epitélio e está protegido do contacto, com as substâncias presentes na luz do estômago, por colonizar a mucosa sobre a espessa camada de muco (2, 10, 12). Além disso, a maioria dos medicamentos antimicrobianos, de uso oral, são geralmente revestidos por envoltórios que somente permitem a liberação da substância ativa após sua passagem pelo estômago. E mesmo as drogas, que são liberadas ao nível do estômago, o são por sobre a camada de muco, o que impossibilita um contato direto com o *C. pilory*. Por outra parte, isso não impede que o microrganismo não esteja sujeito à ação dos medicamentos liberados ao nível da mucosa gástrica. Portanto, a possibilidade alternativa, que explicaria o não achado de cepas resistentes, seria atribuir o fato a uma característica inata do microrganismo. Certas espécies bacterianas, como por exemplo *Streptococcus pyogenes* e *Neisseria meningitidis*, entre outras, dificilmente exibem linhagens droga-resistentes.

Concluindo: embora todas as drogas testadas mostrassem eficácia "in vitro" contra o *C. pilory*, as baixíssimas CIMs apresentadas pela ampicilina, sua facilidade de administração e o relativo menor custo, indicam esse medicamento como eletivo para futuro ensaio terapêutico.

#### Summary

#### *Susceptibility of Campylobacter pilory to nine antimicrobial agents*

Seventy strains of *Campylobacter pilory*, isolated in Recife, Brazil, from the human gastric antrum, were tested by the agar dilution technique against nine antimicrobial agents. Considering MIC 50 and MIC 90 values as the criteria the most active drug was ampicillin, followed in decreasing order of activity by cefotaxime, minocycline, cephalothin, gentamicin, norfloxacin, erythromycin, lomefloxacin and chloramphenicol. Thus, in view of the excellent "in vitro" performance of ampicillin, it was suggested their use in clinical trials.

#### Referências Bibliográficas

- Bauer, A.W.; Kirby, W.H.; Sherris, J.C. & Turck, M. - Antibiotic susceptibility testing by standardized single disc method. Am. J. Clin. Pathol., 45:493-496, 1966.
- Buck, G.E.; Gourley, W.K.; Lee, W.K.; Subramanyan, K.; Latimer, J.M. & DiNuzzo, A.R. - Relation of *Campylobacter pyloridis* to gastritis and peptic ulcer. J. Infect. Dis., 153:664-669, 1986.
- Caekenbergh, V.D.L. & Breyssens, J. - In vitro synergistic activity between bismuth subcitrate and various antimicrobial agents against *Campylobacter pyloridis* (*C. pylori*). Antimicrob. Agents Chemother., 31:1429-1430, 1987.
- Coelho, L.G.V.: Das, S.S.; Karim, Q.N.; Walker, M.M.; Queiroz, D.M.M.; Mendes, E.N.; Lima Jr., G.F.; Oliveira, C.A.; Baron, J.H. & Castro, L.P. - *Campylobacter pyloridis* in the gastrointestinal tract: a Brazilian study. Arq. Gastroenterol., 24:5-9, 1987.
- Drumm, B.; Sherman, P.; Cutz, E. & Karmali, M. - Association of *Campylobacter pylori* on the gastric mucosa with antral gastritis in children. N. Engl. J. Med., 316:1557-1561, 1987.
- Goodwin, C.S.; Blincow, E.D.; Warren, J.R.; Walters, T.E.; Sanderson, C.R. & Eaton, I. - Evaluation of cultural techniques for isolating *Campylobacter pyloridis* from endoscopic biopsies of gastric mucosa. J. Clin. Pathol., 38:1127-1131, 1985.
- Hornick, R.B. - Peptic ulcer disease: bacterial infection? N. Engl. J. Med., 316:1598-1600, 1987.
- Lambert, T.; Megraud, F.; Gerbaud, G. & Courvalin, P. - Susceptibility of *Campylobacter pyloridis* to 20 antimicrobial agents. Antimicrob. Agents Chemother., 30:510-511, 1986.
- Langenberg, M.L.; Tytgat, G.N.J.; Schipper, M.E.I.; Rietra, P.I.G.M. & Zanen, H.C. - *Campylobacter-like* organisms in the stomach of patients and health individuals. Lancet, i:1348, 1984.
- Leão, G.C.; Magalhães Filho, M.; Galvão, L.P.R.; Machado, R.C.; Padovan, I.P.; Jucá, N.T.; Lira, V.M.C. & Magalhães, M. - Ocorrência

- do *Campylobacter pylori* em pacientes com gastrite e úlcera péptica. Arq. Gasterenterol., 25:23-28, 1988.
11. Marshall, B.J. & Warren, J.R. - Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet, i:1311-1315, 1984.
12. Marshall, B.J. - *Campylobacter pyloridis* and gastritis. J. Infect. Dis., 153:650-657, 1986.
13. McFaddin, J.F. - Biochemical tests for identification of medical bacteria. 2nd ed. Williams & Wilkins, Baltimore, 1980.
14. Shungu, D.L.; Nalin, D.R.; Gilman, R.H.; Gadebush, H.H.; Cerami, A.T.; Gill, C. & Weissberger, B. - Comparative susceptibility of *Campylobacter pylori* to norfloxacin and other agents. Antimicrob. Agents Chemother., 31:949-950, 1987.
15. Wulffen, V.H.; Heesemann, J.; Butzow, G.H.; Loning, T. & Laufs, R. - Detection of *Campylobacter pyloridis* in patients with antrum gastritis and peptic ulcers by culture, complement fixation test, and immunoblot. J. Clin. Microbiol., 24:716-720, 1986.

Recebido para publicação em 14/04/89

SURTO DE CROMOMICOSE SISTÊMICA EM RÃS (*RANA CATESBEIANA*, SHAW 1802), CAUSADO PELO  
*CLADOSPORIUM* SP., MINAS GERAIS, BRASIL

Yassca Kassai Moreira

Deptº de Microbiologia

Instituto de Ciências Biológicas da  
 UFMG

Caixa Postal, 2486

31270 Belo Horizonte MG, Brasil

José Horácio Reis

Deptº de Ciências Biológicas

PUC - MG

& Orivaldo Alves Rocha

Deptº de Patologia Geral

Instituto de Ciências Biológicas da  
 UFMG

Caixa Postal, 2486

31270 Belo Horizonte MG, Brasil

### Resumo

Numa criação comercial de 5.000 rãs (*Rana catesbeiana*) localizada em Santa Luzia - Minas Gerais, foram acometidas pelas doença 140 (2,8%), ocorrendo a morte de 100 (71,4%). Diversas rãs foram examinadas post-mortem e fragmentos de órgãos infectados incluindo pele, baço, fígado, rim, pulmão e coração foram removidos para preparações micológicas e histológicas. A morfologia do fungo foi estudada nos órgãos infectados e em cultura. Os resultados revelaram a presença de hifas largas de coloração marrom, células arredondadas e esporulação do tipo *cladosporium*, permitindo a identificação do *Cladosporium* sp. Este é o primeiro relato de cromomicose sistêmica em *Rana catesbeiana* registrado no Brasil.

### Introdução

A cromomicose ou cromoblastomicose é doença micótica causada por espécies de fungos pigmentados denominados demaciáceos. Os agentes etiológicos são habitantes do solo, estando entre os mais comumente encontrados em vegetais em decomposição, madeira apodrecida e palhas de florestas.

A grande maioria de casos de doença tem sido relatada na espécie humana, com poucos casos em animais. No homem, as lesões ocorrem principalmente na pele, apesar da espécie *Cladosporium trichoides* afetar o sistema nervoso central (Conant, 1958). Entre os animais, Carini (1910) descreveu

alteração granulomatosa generalizada em anuro (*Leptodactylus pentadactylus*) e, as lesões com esporos marrons eram semelhantes àquelas observadas na cromomicose humana; Almeida (1934) confirmou tal achado reproduzindo a doença em rãs sadias. No entanto, nenhum dos investigadores conseguiu isolar o agente causal. A literatura registra um caso da doença em cão com lesão interdigital e cujo microrganismo não foi identificado (Riser, 1953) e outro, de localização subcutânea em cavalo causado pelo *Hormodendrum* sp (Simpson, 1966). O restante dos casos animais foram observados em anfíbios, tendo Correa & Cols. (1968) isolado *Fonsecaea pedrosoi*, *Phialophora*

verrucosa e *Cladosporium carrionii* de sapo (*Bufo* sp). Cicmanec & Col. (1973) descreveram infecção por *F. pedrosoi* em *Bufo marinus*; Elkan & Philpot (1973) isolaram *Cladosporium herbarum*, *Scolecobasidium humicola* e *Phialophora* sp de cinco espécies de rãs, channando atenção para a localização cutânea da doença. Velásquez & Restrepo (1975), estudando 75 sapos (*Bufo marinus*) encontraram dois infectados com fungo negro não identificado. Após estudos imunológicos, demonstraram que ambas cepas eram idênticas, apresentando抗ígenos comuns à *P. pedrosoi*, *P. verrucosa* e *C. carrionii* isoladas de cromomicose humana.

Apesar do largo emprego dos anfíbios, especialmente a *Rana pipiens* em pesquisas médicas e biológicas, há escassez de informação sobre a patogenicidade do microrganismo e epidemiologia da doença por fungos pigmentados entre os anuros (Rush & Cols. 1974).

O presente trabalho teve por finalidade descrever o primeiro caso de cromomicose sistêmica em *Rana catesbeiana* no Brasil, criada em confinamento.

#### Material e Métodos

O trabalho constou do estudo de animais doentes oriundos de uma criação comercial de 5.000 rãs da espécie *Rana catesbeiana*, procedentes do município de Santa Luzia, Minas Gerais. Do total de animais do referido ranário, foram acometidos pela doença 140 (2,8%), resultando na morte de 100 (71,4%).

O surto ocorreu no ano de 1987 e quatro animais doentes foram levados com vida ao laboratório de Micologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Foram observadas lesões externas nos olhos, membranas timpânicas, patas anteriores e posteriores, região ventral, dedos, narinas e região periférica do cloaca (Figuras 1, 2 e 3). As lesões internas ocorreram no baço, fígado, pulmões, coração, rins e intestino.

Para o diagnóstico laboratorial, foram coletados fragmentos de cada órgão lesado que, após acondicionamento em tubos contendo solução salina e formol à 10%, foram remetidos para exames micológicos e

anátomo-patológico, respectivamente.

**Exame micológico** - Realizado de acordo com técnica descrita por Rippon (1982), ressaltando-se modificação no exame microscópico direto a partir do material clínico.

Inicialmente, foram feitos esfregaços a partir dos órgãos lesados e corados pelo método de Gram. Paralelamente, pequenos fragmentos de material clínico eram inoculados na superfície dos meios de Ágar-Sabouraud-glicose (DIFCO)\* e Ágar-Mycosel (BBL)\*\* em tubo e incubados à temperatura ambiente, durante sete dias. A identificação da colônia de fungo desenvolvido foi feita pelo estudo da sua morfologia microscópica, através de preparações de lâminas com solução de Lactofenol d'Amann e de microcultivo em lâmina em diferentes substratos (Ágar-Sabouraud, ágar-fubá e ágar-Czaapeck). Outras provas utilizadas para identificação da amostra envolveram avaliação da atividade proteolítica (prova da gelatinase) e crescimento em duas temperaturas (25°C e 37°C).

**Exame anátomo-patológico** - O estudo anátomo-patológico consistiu da descrição macro e microscópica das lesões externas e internas. A histopatologia foi realizada à partir de fragmentos de pele, porções do tubo digestivo, órgãos linfoides, pulmões, coração, músculo esquelético, rins, fígado e baço, corados pelo H.E. (hematoxilina-eosina), P.A.S. (ácido periódico-reagente de Schiff) e Grocott.

#### Resultados

**Exame micológico** - A microscopia direta do material clínico revelou a presença de hifas largas e pigmentadas de marron, além de estruturas esféricas (Figura 4).

Os tubos contendo meios de Ágar-Sabouraud-glicose e Ágar-Mycosel, inoculados com secreção cutânea e fragmentos de órgãos internos revelaram crescimento de colônias aveludadas de coloração cinza claro no início e, posteriormente, com reverso negro. O estudo microscópico da colônia, através de preparações de lâminas em solução de Lactofenol e de microcultivo em lâmina

Figura 1 - Lesão na membrana timpânica.

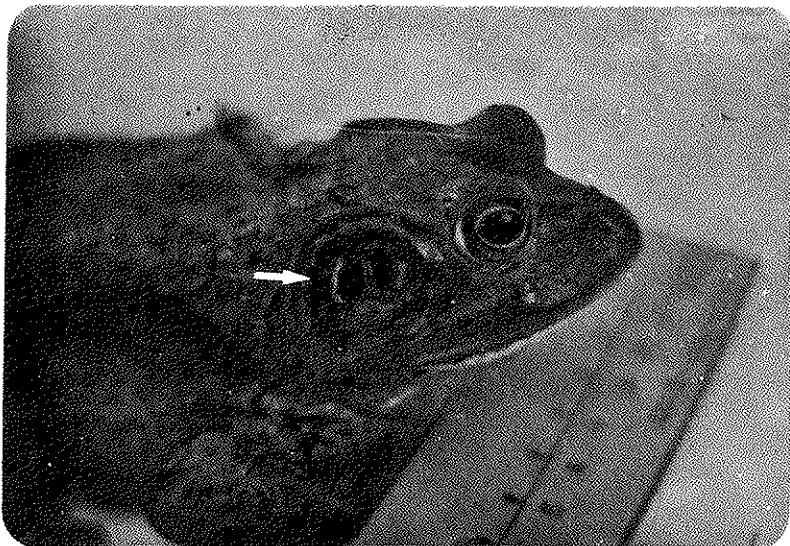


Figura 2 - Lesão nos membros anteriores e posteriores.

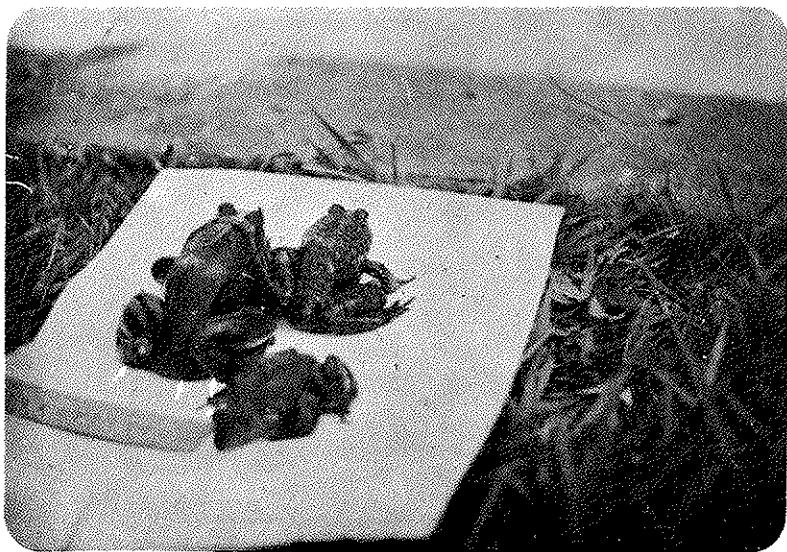


Figura 3 - Lesão na região periférica da cloaca.

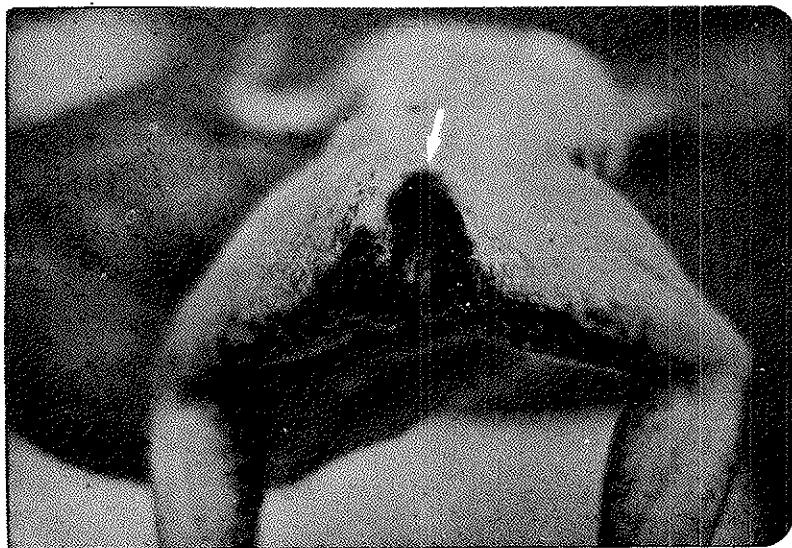
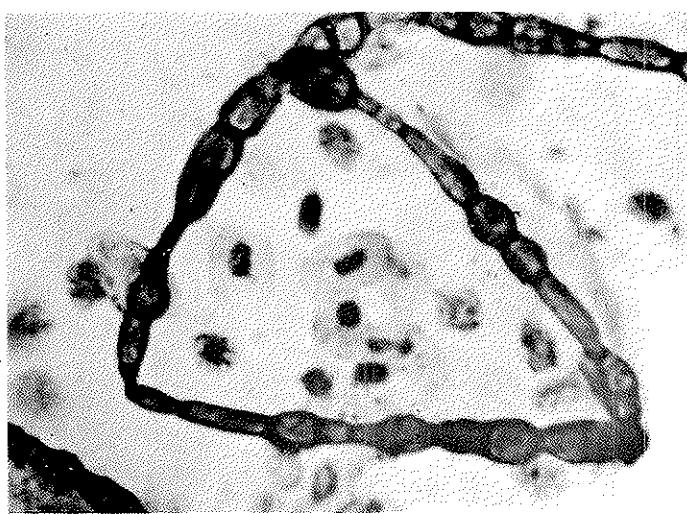


Figura 4 - Hifas largas, septadas e corpos esféricos. Coloração de Gram - 504X.



em diferentes substratos, revelaram o fungo com hifas grossas, pigmentadas e com frutificação do tipo "cladosporium" (Figura 5). A prova de gelatinase positiva, juntamente com ausência de crescimento à temperatura de 37°C permitiram concluir que o fungo era o *Cladosporium* sp.

#### Exame anátomo-patológico

**Macroscópico** - As alterações externas envolvendo olhos, membranas timpânicas e pele apresentavam-se, inicialmente, como manchas elevadas ora escuras, ora esbranquiçadas e sem ulceração. Lesões mais antigas revelaram-se ulceradas e hemorrágicas em vários locais do corpo do animal, tais como patas anteriores e posteriores, em torno da cloaca e nas extremidades dos dedos. Estas lesões mostravam-se rasas, com bordas irregulares e fundo escuro e hemorrágico. Na pata anterior esquerda observou-se edema generalizado, além de ulcerações nos dedos. Verificou-se ainda, em torno da cloaca, numerosas alterações puntiformes do tamanho da cabeça de alfinete, discretamente elevadas de cor escura.

As lesões internas mostravam baço e fígado com coloração bastante escura, com numerosos pontos pardacentos na superfície. O pulmão mostrava-se isquêmico e com numerosas nodulações na superfície pleural. O coração de consistência bastante amolecida, com epicárdio de aspecto gelatinoso. O rim esquerdo bastante diminuído com numerosas nodulações e rim direito de tamanho consideravelmente aumentado e com as mesmas nodulações do rim esquerdo.

**Microscópico** - Os cortes histológicos dos vários órgãos estudados mostravam estrutura microscópica acentuadamente alterada, principalmente pelo acometimento generalizado por processo inflamatório crônico, em parte granulomatoso, com grande número de células histiocitárias, além de edema e proliferação vascular. Outras áreas mostravam granulomas bem formados, constituídos predominantemente por células epitelioides e raras células gigantes do tipo estranho. Verificou-se frequentes estruturas arredondadas e hifas de coloração castanho intenso, tanto isoladas como agrupadas, ora

extra, ora intracelulares, fagocitadas por células gigantes (Figura 6). Estas formas foram evidenciadas inclusive pela coloração de P.A.S. e de Grocott. Simultaneamente, observou-se alterações degenerativas nos vários órgãos analisados.

Os achados correspondem a uma micose generalizada e profunda (Septicemia micótica), com acometimento de todos os órgãos.

#### Discussão e Conclusão

A cromomicose ora descrita em *Rana catesbeiana* apresentou muita semelhança com a doença observada por vários autores em outras espécies de anfíbios.

Os achados microscópicos são coincidentes com os de Carini (1910), Almeida (1934), Cicmanec & Cols. (1973) e Velásquez & Restrepo (1975). Contudo, as lesões externas aqui registradas só foram observadas por alguns autores como Elkan & Philpot (1973), sugerindo que o fato esteja relacionado com o fungo isolado e espécie de anfíbio acometido.

Elkan & Philpot (1973) descrevem a predominante presença de elementos micelianos e células arredondadas do tipo clamidosporos nas lesões. Tais elementos têm sido encontrados na cromomicose humana mas, segundo Al-Doory (1972), as células escleróticas devem estar presentes para se estabelecer o diagnóstico. No entanto, Rush & Cols. (1974) estudando a infecção sistêmica espontânea, sem identificação do fungo, em 25 animais da espécie *Rana pipiens* observaram também que a forma predominantemente é de hifa, correlacionando o achado com diferença de temperatura corporal entre mamíferos e anfíbios.

A cromomicose já foi descrita em sapos e rãs, na forma espontânea e experimental; Rush & Cols. (1974) conseguiram reproduzir a doença em *Rana pipiens* por inoculação do fungo no saco linfático dorsal, mostrando que a doença representa problema clínico potencialmente sério para rãs utilizadas em laboratório. Os autores também conseguiram isolar o fungo de água dos tanques onde os animais eram criados.

Os achados macroscópicos e microscópicos da presente pesquisa

Figura 5 - Frutificação do tipo cladosporium. (preparação com solução de Lactofenol - 504X).

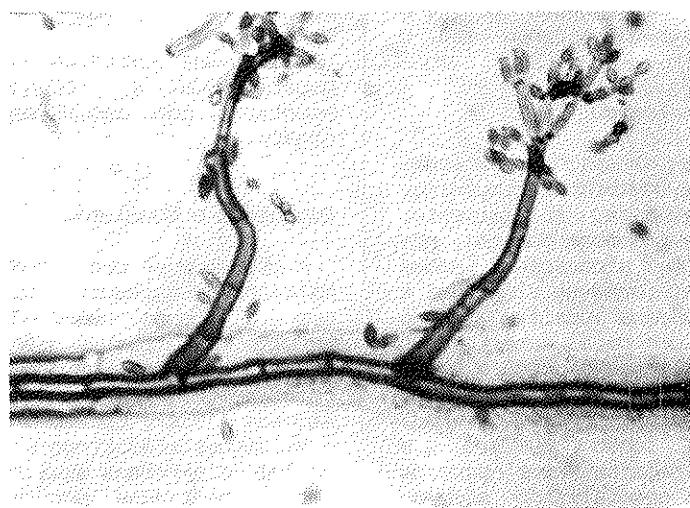
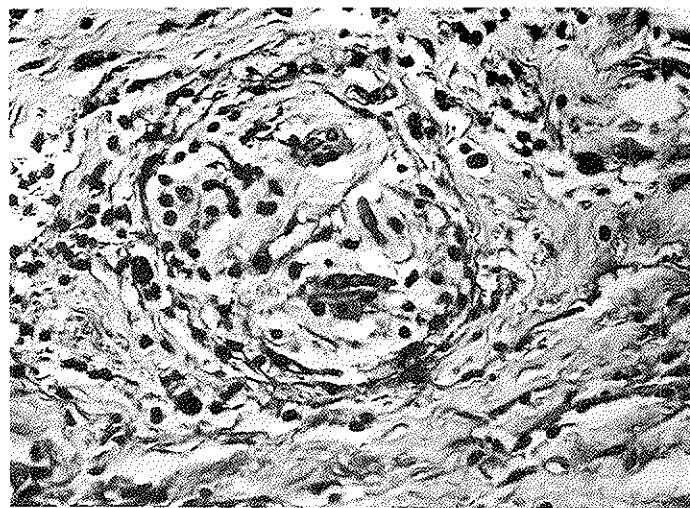


Figura 6 - Lesão granulomatosa com presença do fungo HE - 200X.



revelaram que a doença é altamente destrutiva para rãs, com severos danos no fígado, rins, pulmões e pele. O problema adquire maior seriedade em virtude da duração da doença espontânea, em torno de uma semana, sua natureza insidiosa e a habilidade do fungo em infectar rãs sadias, o que, consequentemente, pode vir a dificultar muitas pesquisas utilizando anuros.

A forma epidêmica da doença estudada permite supor que o surto teve como causa o "stress" da superpopulação do ranário e as precárias condições higiênico-sanitárias do local de criação. De acordo com Fontanello & Cols. (1987) a taxa de sobrevivência de rãs em engorda diminui com o aumento do número de animais por metro quadrado. Os autores trabalharam com diferentes densidades de rã/m<sup>2</sup>, 05, 25, 45 e 65, encontrando maior taxa de sobrevivência nos lotes de cinco animais. As rãs afetadas no presente surto eram mantidas confinadas numa área de aproximadamente 71,4m<sup>2</sup>, equivalente a 72 rãs/m<sup>2</sup>, número superior à taxa de lotação considerada ideal. Por ser praticamente impossível tratar rãs afetadas por esta doença, as medidas devem ser de controle, direcionadas para a fonte potencial da infecção no meio ambiente. Estas medidas deverão envolver limpeza e desinfecção das instalações e gaiolas e criação de menor número de rãs por metro quadrado. Para os animais infectados, recomenda-se o sacrifício.

### Summary

#### *An outbreak of systemic chromomycosis in frogs (*Rana catesbeiana*, Shaw 1802) caused by *Cladosporium* sp*

In a commercial flock of 5.000 frogs (*Rana catesbeiana*) localized in Sta. Luzia - Minas Gerais State, 140 animals (2.8%) were affected by systemic mycosis. Death occurred in 100 of the diseased frogs (71.4%). Poste-mortem examination was performed in several frogs. Infected organs, including skin, spleen, liver, Kydneys, lungs, and heart were removed for histopathological and mycological preparations. The morphology of the fungus in infected organs and in culture was studied. The results showed

the presence of large brown coloured hyphae with round bodies and cladosporium type sporulation allowing the identification of *Cladosporium* sp. This is the first report of systemic cromomycosis in *Rana catesbeiana* in Brazil.

### Referências Bibliográficas

1. Al-Doory, J. - *Chromomycosis*. Missoula, Mountain Publishing, 1972.
2. Almeida, F.P. - Considerações em torno de um cogumelo encontrado por Carini no pulmão de sapo (*Leptodactylus pendactylus*). Rev. Biol. Hig., São Paulo, 5:51-5, 1934.
3. Carini, A. - Sur une moisissure qui cause une maladie spontanée de *Leptodactylus pendactylus*. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 24:157-60, 1910.
4. Cicmanec, J.L.; Ringler, D.H.; Beneke, E.S. - Spontaneous occurrence and experimental transmission of the fungus *Fonsecaea pedrosoi* in the marine toad *Bufo marinus*. Lab. Anim. Sci., Joliet, 23:43-7, 1973.
5. Conant, N.F. - Medical mycology. In: Dubos, R.S., ed. *Bacterial and mycotic infections of man*. 3.ed. Philadelphia, J.B. Lippincott, 1958. p.582-625.
6. Correa, R.; Correa, I.; Garces, G. - Lesiones micóticas (cromomycosis?) observadas en sapos (*Bufo* sp). Antioquia Med., Medellin, 18:175-184, 1968.
7. Elkan, E. & Philpot, C.M. - Mycotic infections in frogs due to Phialophora like fungus. Sabouraudia, Edinburgh, 11:99-105, 1973.
8. Fontanello, D.D.; Soares, H.A.; Mandelli Júnior, J.; Justo, C.L.; Campos, B.E.S. - Influência da densidade populacional na sobrevivência de rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw 1802) em criação intensiva. Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. São Paulo, São Paulo, 24(2):213-6, 1987.
9. Rippon, J.W. - *Medical mycology: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes*. 2.ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 1982. 842p.
10. Riser, W.H. - *Mycotic diseases*. In: Hoskins, H.P.; Lacroix, J.V.; Mayor,

- K., ed. Canine medicine. Evanston,  
American Veterinary Publications,  
1953. p.447-8.
- 11.Rush, E.C.; Anver, M.R.; Beneke,  
E.S. - Systemic chromomycosis in  
*Rana pipiens*. Lab. Anim. Sci.,  
Joliet, 24(4):646-55, 1974.
- 12.Simpson, J.G. - A case of  
chromoblastomycosis in a horse. Vet.  
Med. Small Anim. Clin., Bonner  
Springs, 61:1207-9, 1966.
- 13.Velásquez, V.L.F. & Restrepo, A.M. -  
Chromomycosis in the toad (*Bufo  
marinus*) and a comparison of the  
etiologic agent with fungi causing  
human chromomycosis. Sabouraudia,  
Edinburg, 13:1-9, 1975.

Recebido para publicação em 12/10/88

# THE INFLUENCE OF CULTURE AGE ON THE CHEMICAL CELL WALL OF *ELLISOMYCES ANOMALUS*

Galba M. Campos-Takaki

Deptº de Antibióticos  
Centro de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Pernambuco  
Cidade Universitária  
50739 Recife PE, Brasil

Sônia M.C. Dietrich

Instituto de Botânica de São Paulo  
Caixa Postal 4005  
01000 São Paulo SP, Brasil

& Mohan S. Manocha

Deptº of Biological Sciences  
Brock University  
St Catharines  
Ontario L 2S 3A1, Canadá

## Resumo

### *Influência da idade da cultura na composição química da parede celular de Ellisomyces anomalous*

A composição da parede celular de *Ellisomyces anomalous* mostrou uma variação proporcional em quitina e quitosano, a 1 e 6 dias de crescimento. Observou-se elevada concentração de ácido oléico e baixo nível de ácido graxo  $\gamma$ -linolênico. Aos 6 dias de incubação da cultura a proporção de lisina foi aumentada. Composição química relativamente estável foi obtida com as células coletadas no início da fase estacionária.

## Introduction

The mycelial cell walls of Zygomycetes are characterized by the presence of chitin and chitosan (5). However, there are marked qualitative differences in cell wall composition between the dimorphic yeast-like and mycelial forms (6) as well as between the cell wall of mycelial hyphae and sporangiospore of the same species. Alterations in the levels of mycelial cell wall components have been achieved in *Mucor javanicus* through manipulation of cultural conditions such as composition of the medium, aeration and culture age (22). Similar differences in the ratio of cell wall chitin: chitosan were found during growth of *Choanephora cucurbitarum* from 1 to 7

days; the cell walls of the young, 1-day old mycelium was shown to contain more chitosan than the cell walls of the 7-days old one. These observations were associated with the mode of host penetration and susceptibility to the mycoparasite *Piptocephalis virginiana* (20). It has also been observed that the cytoplasmic level of  $\gamma$ -linolenic acid differed from one species to another and in the same species according to the age of the culture, and that the level of  $\gamma$ -linolenic is higher in young mycelium which are susceptible to the mycoparasite (20). *Ellisomyces anomalous* (=Thamnidium anomalum) is a mucoraceous fungus reported to be susceptible to mycoparasitism (14). Thus, it was of interest to investigate the cell wall

composition of young and "age" cultures in order to find out whether they display similar differences to the ones described above.

#### Materials and Methods

**Organism and culture conditions** - *Ellisomyces anomalus* (Hesseltine & Anderson) Benny & Benjamin (= *Thamnidium anomalum* Hesseltine & Anderson) belonging to the live collection from the "Instituto de Botânica" of São Paulo (SPC 345) was maintained in Difco's potato dextrose agar medium at 22°C. Inocula of these cultures were grown for 48h at 25°C in Synthetic Solid Medium (15) modified by Beakes, Campos-Takaki & Takaki (7) to contain 0.6g/l glucose. From these cultures 5mm of diameter inocula obtained with aid of a sterilized borer were transferred to Synthetic Liquid Medium also modified to contain 0.6g/l glucose (30 inocula per 400ml culture medium). The cultures were incubated for either 1 or 6 days at 25 °C under continuos shaking (80rpm). After the desired incubation period the mycelial mats were collected by filtration, washed with distilled water, and freeze dried.

**Cell wall preparation and fractionation** - Cell walls were prepared according to Letourneau & Col. (16). The lipids were extracted from the freeze dried walls according to Deven & Manocha (11), and the carbohydrates were subsequently extracted with water at 100°C, TCA at 5 °C, 30% KOH at 100°C according to the method of Chung & Nickerson (9) modified.

**Quantitation and characterization of wall components** - Total phosphate and total protein in intact cell wall were estimated by the colorimetric methods of Rouser & Col. (24) and of Lowry & Col. (17) for insoluble protein, respectively. Amino acid analysis was performed in an automated analyser after hydrolysis of intact walls with 6N HCl for 72h (1). Lipids were quantitated gravimetrically and characterized by thin layer chromatography (TLC). Approximately 2mg of the lipid fraction were applied in 0,250 thick 20 x 20cm silicagel G

layers (Merck, Germany). Neutral lipids were developed in hexane: ethyl ether: acetic acid (85: 15:1 by volume). Polar lipids were separated by bidimensional TLC in chloroform: methanol: ammonia (75: 25:3 by volume) in the first direction and chloroform: methanol: acetic acid: water (170: 25: 25: 4 by volume) in the second direction. The plates were then sprayed with 50% sulfuric acid and heated for vizualization of the spots. Gas Liquid Chromatography (GLC) of fatty acid was performed after methylesterification according to Manocha (20) using a model 37-4 gas chromatograph (CG Instrumentos Científicos, Brazil) equiped with a flame ionization detector. A 180cm long per 3mm diameter glass column packed with 3% SP 2340 in Supelcoport kept at 150° C, with vaporizer temperature at 260°C, detector at 280°C nitrogen flow 33.4ml/min was used. Standard methylesters were prepared and chromatographed under the same conditions. Sugar analysis was performed by GLC after hydrolysis of intact walls with 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 2h at 100 °C followed by neutralization with barium carbonate. The sugars were then transformed into alditois with NaBH<sub>4</sub>, acetylated according to Sawardeber & Col. (25) and subjected to GLC as described for lipids except that the column temperature was programmed from 180°C at a rate of 0.5°C per min. Chitosan and chitin were estimated, respectively, as nitrous acid soluble and insoluble polymers (10) by hexosamine determination (8). In cell walls hydrolysed with 6 NHCl for 16h at 100°C before and after extraction with nitrous acid. Non nitrogenous carbohydrates were quantified in each cell wall fraction by the phenolsulfuric acid method (12). All the procedures were performed in duplicate.

#### Results and Discussion

The content of major mycelial cell wall components (Table 1) was very similar in 1 and 6 days grown cultures. However, there seems to be an increase in chitin and phosphate in 6 days old cultures with a proportional decrease in chitosan, non nitrogenous polysaccharides and proteins. Besides glucosamine (from chitin and chitosan)

Table 1 - Mycelial cell wall composition of *E. anomalous* cultivated for 1 and 6 days.  
 Symbols: \* = Expressed as the sum  
 anhydroglucose equivalents determined  
 separately in the three fractions.

Cell wall component	Content (% total wall)	
	1 day	6 days
Protein	9.0	8.2
Phosphate	19.0	22.3
Lipids	7.2	7.5
Chitin	12.9	16.0
Chitosan	32.0	28.5
Non nitrogenous carbohydrates*	21.5	19.0
Soluble in water, 100°C	2.5	4.0
Soluble in 0.5% ammonium oxalate	5.0	5.0
Soluble in 10% TCA, 5°C	8.0	5.0
Soluble in 30% KOH, 100°C	6.0	5.0
TOTAL	21.5	19.0

Table 2 - Fatty acid composition of cell walls of 1 and 6 days old cultures of *E. anomalous* determined by GLC.  
 Symbols: tr\* = Traces.

Fatty acids	Content (% of total)	
	1 day	6 days
Lauric (12:0)	6.3	4.5
Myristic (14:0)	4.6	3.2
Pentadecanoic (15:0)	6.1	6.4
Palmitic (16:0)	23.2	22.7
Palmitoleic (16:1)	4.4	4.5
Heptadecanoic (17:0)	tr*	tr*
Stearic (18:0)	10.5	11.0
Oleic (18:1)	25.0	33.8
Linoleic (18:2)	9.0	8.4
γ-linolenic (18:3)	10.7	5.1

which correspond to about 45% of the walls the major free sugars found in wall hydrolysates were mannose, fucose, galactose and gentiobiose in a ratio of approximately 2.5:1:1:0.5 as determined by GLC. This ratio does not change significantly between 1 and 6 days of growth (not showed).

The lipid fraction which accounts for about 7% of the total wall in both 1 and 6 days grown cultures (Table 1) does not show any qualitative difference when analysed by TLC. However, there was a decrease in the amount of lauric and γ-linolenic acids in the cell walls of 6 days grown

Table 3 - Amino acid composition of cell wall of 1 and 6 days grown cultures of *E. anomalus*.

Amino Acid	Content (moles/% of total protein)	
	1 day	6 days
Lysine	2.13	8.90
Hystidine	2.46	3.32
Arginine	6.71	6.23
Aspartic	10.96	10.90
Threonine	6.12	5.81
Serine	4.04	5.50
Glutamic	15.10	13.20
Proline	3.46	3.00
Glycine	4.30	4.72
Alanine	7.37	6.70
1/2 cystine	0.37	0.60
Valine	6.33	6.35
Methionine	2.62	2.30
Isoleucine	4.75	5.51
Leucine	9.04	8.00
Tyrosine	4.83	3.94
Phenylalanine	9.41	5.02

cultures which corresponds approximately to the increase in the proportion of oleic acid in these cultures (Table 2).

Protein presents some differences in total content (Table 1) and in the amino acids proportions specially for threonine, and serine increase in 6 days of growth (Table 3).

Physiological studies with *Piptocephalis virginiana* showed that the degree of parasitism by this fungus was affected by the carbon and nitrogen sources (2, 3, 4, 13). McDaniel & Hindal (21) showed that *E. anomalus* with glutamic acid as nitrogen source supporting host growth and the degree of parasitism by *Piptocephalis lipidula*. How parasitism was affected is not known, but the increase of lysine and glutamic acid in the cell wall in the early stationary phase suggest the parasitism described by Barnett & Binder (3) and Phipps & Barnett (23). Thus, variations in cell wall composition can be detected during growth or "aging" of the culture, in

spite of the fact that "aged" portions of the hyphae are analysed together with eventually still growing "young" hyphae portions. The increase in chitin in older cultures is in agreement with the findings of Manocha (20) for other species of Mucorales. It has been proposed that gamma linolenic acid in the mycelium of mucoraceous fungi may be a factor responsible for determining the host range of *Piptocephalis* species (18, 19). It is noteworthy that in *Choanephora cucurbitarum* old cultures show a great decrease in the level of gamma linolenic acid inside the cells suggest Manocha (20). Whereas in the present case the same is occurring with gamma linolenic, in the cell wall (Table 2). Since gamma linolenic acid glutamic acid, seem to be related to the susceptibility to mycoparasitism and since the cell wall represents the first anchorage site for the parasite, it is possible that besides chitin (20) the cell wall lipid constituents may be play a role in the infection process.

## Summary

The composition of cell wall in *Ellisomyces anomalous* showed a proportional variation in chitin and chitosan (one and 6 day of growth). A high concentration of oleic acid and low level of  $\gamma$ -linolenic fatty acid were observed. The 6 days old culture contained a slightly higher proportion of lysine. Relatively stable chemical cell wall composition was obtained when the culture was harvested in the early stationary phase.

## Acknowledgment

The author G.M.C.T. is tankful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) by Research Fellow (301426/81), and Mr. Antônio Carlos Duprat Barros by secretarial assistance.

## References

1. Alonso, N. & Hias, C.H.W. - Automation of samples application in amino acids analysers. *Analyt. Biochem.*, 23:272-76, 1968.
2. Barnett, H.L. - Nutritional requirements for axenic growth of some hantorial mycoparasites. *Mycologia*, 62:750-760, 1970.
3. Barnett, H.L. & Binder, F.L. - The fungal host parasite relationship. *Annual Rev. Phytopathol.*, 11:273-292, 1973.
4. Berry, C.R. & Barnett, H.L. - Mode of parasitism and host range of *Piptocephalis virginiana*. *Mycologia*, 49:374-396, 1957.
5. Bartnicki-Garcia, S. - Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Annual Rev. Microbiol.*, 22:87-108, 1968.
6. Bartnicki-Garcia, S. & Reys, E. - Chemical composition of sporangiophores walls of *Mucor rouxii*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 165:32-42, 1968.
7. Beakes, G.W.; Campos-Takaki, G.M.; Takaki, M. - Chlamydospore differentiation in *Ellisomyces anomalous*. *Can. J. Botany*, 62:2677-2687, 1984.
8. Blix, G. - The determination of hexosamines according to Elson and Morgan. *Acta Chem. Scand.*, 2:467, 1948.
9. Chung, C.W. & Nickerson, W.Y. - Quantitative fractionation of the carbohydrates of yeast. *J. Biol. Chem.*, 208:394-407, 1954.
10. Datema, R.; Vessels, J.G.H.; Van Den Ende, H. - The hyphal wall of *Mucor mucedo* 2 Hexosamine containing polymers. *Eur. J. Biochem.*, 80:621-626, 1977.
11. Deven, J.M. & Manocha, M.S. - The effect of glutamic acid on the fatty acid and lipid composition in *Choanephora cucurbitanum*. *Can. J. Microbiol.*, 21:1827-1833, 1975.
12. Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. - Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28:350-356, 1956.
13. England, W.H. - Relation of age of two host fungi to development of the mycoparasite, *Piptocephalis virginiana*. *Mycologia*, 61:586-593, 1969.
14. Jeffries, P. & Young, T.W. - Mycoparasitism by *Piptocephalis unispora* (Mucorales) host range and reaction with *Phascolomyces articulosus*. *Can. J. Bot.*, 56:2449-2459, 1978.
15. Hesseltine, C.W. & Anderson, R.F. - Microbiological production of carotenoides. I. Zygospore and carotene produced by intraespecific clones of *Choanephora* in liquid medium. *Mycologia*, 49:449-452, 1957.
16. Letourneau, D.R.; Dever, J.H.; Manocha, M.S. - Structure and composition of the cell walls of *Choanephora cucurbitarum*. *Can. Microbiol.*, 22:486-494, 1976.
17. Lowry, C.N.; Ronsebrongh, N.Y.; Farr, K.; Randall, R.J. - Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275, 1951.
18. Manocha, M.S. - Host-parasite relations in a mycoparasite. III. Morphological and biochemical differences in the parasitic-and axenic cultures spores of *Piptocephalis virginiana*. *Mycologia*, 67:382-391, 1975.
19. Manocha, M.S. & Lee, K.Y. - Host parasite relations in a mycoparasite. I. Five structure of host, parasite, and their interface.

- Cand. J. Bot., 49:1677-1681, 1971.
20. Manocha, M.S. - Host specificity and mechanism of resistance in a mycoparasite system. Physiol. Plant Pathol., 18:257-265, 1981.
21. McDaniel, L.L. & Hindal, D.F. - Host range and effect of host nutrition on parasitism by *Piptocephalis lepidula*. Mycologia, 21:996-1004, 1979.
22. Mauro, C. & Dietrich, S.M.C. - Effect of culture conditions on the cell wall composition of *Mucor javanicus* Welmer (Zygomycetes). Richa, 9:107-111, 1981.
23. Phipps, P.M. & Barnett, H.L. - Effect of nitrogen nutrition on the free amino acid pool of *Choanephora cucurbitarum* and parasitisms by two haustorial mycoparasites. Mycologia, 67:1128-1142, 1975.
24. Rouser, G.; Fleischer, S.; Yamamoto, A. - Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorous analysis of spots. Lipids, 5:494-496, 1970.
25. Sawardeker, J.S.; Sionker, J.H.; Jeanes, A. - Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography. Anal. Chem., 37:1602-1604, 1965.

Recebido para publicação em 12/10/88

# PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS QUE ABSORVEM LUZ ULTRAVIOLETA POR ASPERGILLUS ORYZAE EM MEIOS COMPLEXOS

Alírio de Carvalho

Ivanildes da Silveira Torres Santiago  
& Rubens Molinari

Deptº de Química Tecnológica e de Aplicação

Instituto de Química da UNESP  
Caixa Postal 174  
14800 Araraquara SP, Brasil

## Resumo

Estudou-se a influência do enriquecimento do meio, quimicamente definido anteriormente desenvolvido, com os nutrientes complexos: água de milho, hidrolisado de caseína, bacto-peptona, bacto-casitona, farelo de algodão, farelo de amendoim, farinha de soja, extrato de carne e extrato de levedo. Constatou-se que a produção das substâncias S<sub>260</sub> pode ser aumentada em até 47% e que, entre os nutrientes complexos, a água de milho, o hidrolisado de caseína e a bacto-peptona são os mais eficientes. Verificou-se também que alguns destes nutrientes são inibidores da produção do material S<sub>260</sub>, destacando-se, entre eles, o extrato de levedo com redução de 95%. A maior produção destas substâncias foi obtida em meio contendo, por litro, 50g de sacarose, 3,96g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,26g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 10mg de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 10mg de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 10mg de MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 5mg de CoSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 4g de água de milho ou de hidrolisado de caseína.

## Introdução

Verificou-se em trabalho anterior (7) que o *Aspergillus oryzae*, quando cultivado em meios quimicamente definidos, acumula, nos caldos de cultura, substâncias relacionadas a ácidos nucleicos e estudou-se as condições de cultivo para a máxima produção, concluindo-se tratar de processo onde o crescimento do bolor e a produção do material ocorrem simultaneamente, ou seja, que a produção das substâncias está diretamente relacionada à atividade microbiana, não se tratando de processo de degradação de ácidos nucleicos, pré-formados, na fase decrescente.

No entanto a utilização industrial de meios de cultivo quimicamente definidos para a produção de substâncias úteis por fermentação é um processo relativamente pouco comum, sendo empregados, de preferência, meios

constituídos de nutrientes complexos, usualmente resíduos ou sub-produtos da indústria agropecuária, por serem econômicos e eficientes. Por esse motivo, neste trabalho, procurou-se enriquecer o meio quimicamente definido anteriormente desenvolvido pela adição de nutrientes complexos, objetivando-se aumentar ao máximo a produção das substâncias S<sub>260</sub>.

## Material e Métodos

**Meio para preparação do inóculo** - Este meio continha, por litro, glicose 40g, peptona 10g, agar 20g e pH 6,5. A água utilizada na preparação dos meios foi sempre água destilada.

**Inóculo** - Preparou-se uma suspensão de esporos da cultura utilizada (*Aspergillus oryzae*, linhagem NRRL 692) pela adição de 8ml de água destilada

esterilizada a dois tubos da cultura na forma de agar inclinado. A suspensão de esporos foi obtida raspando-se suavemente a superfície do meio, nos tubos, com uma espátula esterilizada.

Inocularam-se 6 frascos de Roux, contendo 200ml do meio indicado, com 1,5ml da suspensão de esporos obtida anteriormente, esparramando-se uniformemente o inóculo sobre o meio nutritivo, e os frascos foram deixados à temperatura ambiente durante 18 dias.

Adicionaram-se, então, 200ml de água destilada esterilizada a cada frasco e a suspensão de esporos foi obtida da maneira já citada. A suspensão preparada foi assepticamente homogeneizada em liquidificador de copo de alumínio, estéril, e transferida, em porções de 10 a 30ml, para frascos estéreis de 50ml. Após serem fechados com tampa de borracha e proteção de alumínio, os frascos foram conservados em câmara fria (5°C).

**Meio básico** - A composição do meio básico, quimicamente definido, empregado neste trabalho era, por litro, a seguinte: 50g de sacarose, 3,96g (30mM) de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,26g (1,5mM) de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,2g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10mg de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10mg de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10mg de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e 5mg de  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

**Esterilização dos meios de cultivo e outros materiais** - A esterilização foi feita por aquecimento, em autoclave, mantendo-se o aquecimento efetivo a 121 °C durante 20 minutos. A fonte de carbono era esterilizada à parte e depois acrescentada assepticamente ao restante do meio.

O pH dos meios era ajustado, após a esterilização, e quando necessário, pela adição de ácido sulfúrico ou hidróxido de potássio diluídos e esterilizados, de modo a obter-se pH entre 6,0 e 7,0.

**Técnica de cultivo** - O processo empregado para permitir o crescimento dos microrganismos em condições de produzir as substâncias que absorvem no ultravioleta ( $S_{260}$ ) foi o de "frascos agitados". Com tal técnica, a atividade microbiana ocorreu em cultura submersa, em frascos de Erlenmeyer submetidos à rotação. Utilizaram-se frascos de 125ml, contendo 30ml de meio nutritivo e 1,0ml

de inóculo, colocados na mesa agitadora, onde descreviam círculos de aproximadamente 3cm de diâmetro na velocidade de 250 rotações por minuto.

Os frascos foram tampados com espuma de poliuretano de 1cm de espessura, presa à boca do frasco por elástico. O crescimento foi feito em estufa mantida a 30°C, em experimentos de 170 horas, em que a agitação só era interrompida o mínimo possível, para carga e descarga do aparelho, a fim de manter oxigenação contínua ao microrganismo em desenvolvimento.

As experiências foram sempre constituídas por duplicatas, ou seja, cada resultado deriva de par de frascos preparados e analisados paralelamente.

**Métodos analíticos** - A produção das substâncias  $S_{260}$  foi determinada pela absorvância ( $A_{260}$ ), medida a 260nm, do caldo de cultura filtrado. Foram feitas correções nos valores obtidos em função da absorvância do meio nutritivo esterilizado ("Branco") e do volume final do caldo de cultura em relação ao volume inicial de meio de cultivo.

Por analogia com o sistema utilizado por Bendich (1), definiu-se uma unidade do material  $S_{260}$  como a quantidade de substâncias contida em 1ml de solução, cuja absorvância a 260nm é 1,0 medida em cuba de 1cm.

## Resultados e Discussão

Os meios de cultura foram ensaiados pela adição, ao meio quimicamente definido anteriormente desenvolvido (7), dos nutrientes complexos individualmente, na concentração 5g/l.

Verificou-se que nem todos os meios enriquecidos nutricionalmente mostraram-se favoráveis ao aumento da produção do material em estudo. Este fato indica que a produção parece não estar relacionada ao teor de nutrientes dos meios, mas depender particularmente de alguns componentes como mostra a Tabela 1.

Os resultados obtidos mostram que a produção das substâncias em estudo pode ser aumentada em até 47% pela adição de nutrientes complexos ao meio básico quimicamente definido inicialmente desenvolvido. Entre eles, a água de milho (produto da Companhia Refinane-

Tabela 1 - Adição de nutrientes complexos ao meio quimicamente definido e sua influência na produção das substâncias S<sub>260</sub> pelo *Aspergillus oryzae*.

Nutrientes Complexos	pH final	$\lambda_{260}$ final	Produção relativa	Estímulo (%)	Inibição (%)
Água de milho	2,2	17,0	1,41	41	-
Hidrolisado de caseína	2,2	16,6	1,37	37	-
Bacto-peptona	2,3	14,6	1,21	21	-
Bacto-casitona	2,3	13,0	1,07	7	-
Farelo de algodão	2,2	12,5	1,03	3	-
Farelo de amendoim	2,2	10,8	0,89	-	11
Farinha de soja	2,5	10,3	0,85	-	15
Extrato de carne	2,3	8,4	0,69	-	31
Extrato de levedo	2,5	0,6	0,05	-	95
Sem nutriente complexo	2,2	12,1	1,00	-	-

de Milho Brasil contendo 0,52g/ml de sólidos totais determinados como massa seca), o hidrolisado de caseína e a bacto-peptona são os mais eficientes.

Observa-se ainda que a bacto-casitona e o farelo de algodão são pouco eficientes e que os outros nutrientes utilizados são inibidores da produção, destacando-se entre eles o extrato de levedo com redução de 95%. Com relação a este último, os resultados obtidos confirmam plenamente trabalhos anteriores (2, 3, 4, 5, 7 e 10), pois tratando-se de componente complexo rico em fosfato tem certamente efeito inibidor na produção das substâncias S<sub>260</sub>.

Os resultados das Tabelas 2, 3 e 4 indicam que a concentração inicial dos componentes complexos tem grande influência na produção do material e

que meios contendo água de milho (4g/l), ou hidrolisado de caseína (4g/l), ou bacto-peptona (2g/l) são os mais produtivos.

É interessante notar que para o *A. oryzae* (Figura 1) a água de milho, quando presente em concentração igual ou superior a 7,5g/l, deixa de estimular a produção do material S<sub>260</sub>, passando a inibi-la. Fato semelhante ocorre com a bacto-peptona quando presente nos meios em concentração igual ou superior a 11g/l; o mesmo ocorre com o hidrolisado de caseína quando presente em concentração superior a 14g/l.

A água de milho tem se mostrado um importante nutriente complexo para o estímulo da produção das substâncias S<sub>260</sub> (5). O mesmo tem ocorrido com a farinha de soja (3) e com os farelos de algodão e de amendoim (5).

**Tabela 2 - Produção das substâncias S<sub>260</sub> pelo *Aspergillus oryzae* em função da concentração inicial da água de milho como único aditivo ao meio quimicamente definido desenvolvido.**

Água de milho (g/l)	pH final	$\lambda_{260}$ final	Produção relativa	Estímulo (%)	Inibição (%)
0,0	2,3	12,1	1,00	-	-
2,0	2,3	15,2	1,26	26	-
4,0	2,3	17,8	1,47	47	-
5,0	2,3	17,0	1,41	41	-
6,0	2,2	14,6	1,21	21	-
8,0	2,3	11,3	0,93	-	7
10,0	2,5	11,1	0,92	-	8
15,0	2,3	10,0	0,83	-	17
20,0	2,3	6,4	0,53	-	47
25,0	2,5	2,8	0,23	-	77
30,0	2,6	1,4	0,12	-	88
35,0	2,6	0,0	0,00	-	100
40,0	2,6	0,0	0,00	-	100

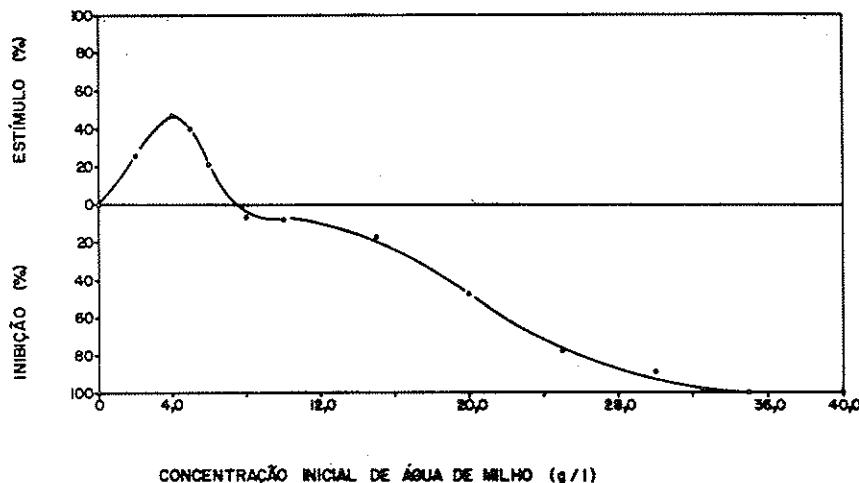
**Tabela 3 - Produção das substâncias S<sub>260</sub> pelo *Aspergillus oryzae* em função da concentração inicial do hidrolisado de caseína como único aditivo ao meio quimicamente definido desenvolvido.**

Hidrolisado de caseína (g/l)	pH final	$\lambda_{260}$ final	Produção relativa	Estímulo (%)	Inibição (%)
0,0	2,2	11,8	1,00	-	-
2,0	2,3	14,6	1,24	24	-
4,0	2,2	17,4	1,47	47	-
5,0	2,2	17,1	1,45	45	-
6,0	2,2	16,9	1,43	43	-
8,0	2,2	16,2	1,37	37	-
10,0	2,2	15,4	1,31	31	-
12,0	2,4	14,0	1,19	19	-
14,0	2,3	11,8	1,00	0	-

Tabela 4 - Produção das substâncias S<sub>260</sub> pelo *Aspergillus oryzae* em função da concentração inicial da bacto-peptona como único aditivo ao meio quimicamente definido desenvolvido.

Bacto-peptona (g/l)	pH final	$\lambda_{260}$ final	Produção relativa	Estímulo (%)	Inibição (%)
0,0	2,2	11,9	1,00	-	-
2,0	2,2	16,5	1,39	39	-
4,0	2,3	15,5	1,30	30	-
5,0	2,3	15,0	1,26	26	-
6,0	2,2	14,4	1,21	21	-
10,0	2,2	13,0	1,09	9	-
12,0	2,3	11,6	0,97	-	3
14,0	2,2	10,4	0,87	-	13
16,0	2,2	9,3	0,78	-	22

Figura 1 - Efeito da concentração inicial da água de milho na produção de substâncias S<sub>260</sub> pelo *Aspergillus oryzae*.



Análise química preliminar dos caldos de cultura, através de cromatografia de troca-iônica, chromatografia em papel e espectrofotometria ultravioleta, indica de maneira semelhante aos trabalhos com *Aspergillus niger* (4), *Streptomyces aureofaciens* (6) e *Aspergillus oryzae* (7) a presença de substâncias relacionadas a ácidos nucleicos, como será visto em publicação posterior.

### Summary

#### *Production of UV light absorbing substances by Aspergillus oryzae in complex media*

The production of UV light absorbing substances by *A. oryzae* was studied by the addition of the following complex nutrients (added one by one as enrichment nutrients) to the chemically defined culture medium studied: corn steep liquor, casein hydrolysate, bacto-peptone, bacto-casitone, cotton seed meal, peanut meal, soybean flour, meat extract and yeast extract. Complex culture media with increased production (47%) were obtained with corn steep liquor or casein hydrolysate and with bacto-peptone (42%) by the adjustment of the optimal concentration of the complex nutrient used. Some of the complex nutrients studied are inhibitory to the production of S<sub>260</sub> substances, particularly the yeast extract with 95% decrease of the original production obtained in the chemically defined medium established. The medium giving maximal production has the following composition, per liter: sucrose 50g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3.96g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.26g, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.2g, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 10mg, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 10mg, MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 10mg, CoSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 5mg and corn steep liquor or casein hydrolysate 4g.

### Referências Bibliográficas

- Bendich, A. - Methods for characterization of nucleic acids by base composition. In: Colowick, S.P. & Kaplan, N.O. - Methods in enzymology. New York, Academic Press, vol. III, p.715-723, 1957.
- Carvalho, A. & Molinari, R. - Production of nucleic acid-related substances by *Streptomyces aureofaciens*. Rev. Bras. Tecnol., 7:289-296, 1976.
- Carvalho, A.; Oliveira, P.L.C. & Molinari, R. - Produção de substâncias relacionadas a ácidos nucleicos por *Streptomyces aureofaciens* em meios complexos. Ecl. Quím. (São Paulo), 2:47-60, 1977.
- Carvalho, A.; Faria, C.R. & Molinari, R. - Produção de substâncias relacionadas a ácidos nucleicos por *Aspergillus niger* em meios quimicamente definidos. Ecl. Quím., 3:55-67, 1978.
- Carvalho, A.; Sita, W. & Molinari, R. - Produção de substâncias relacionadas a ácidos nucleicos por *Aspergillus niger* em meios complexos. Ecl. Quím., 5:63-70, 1980.
- Carvalho, A. & Molinari, R. - Identification of low-molecular-weight nucleic acid-related substances secreted by *Streptomyces aureofaciens*. Appl. Environ. Microbiol., 46:762-764, 1983.
- Carvalho, A. - Produção de substâncias, que absorvem no ultravioleta, por fermentação microbiana - Estudos da nutrição e condições de cultivo para produção máxima. Tese de Livre-Docência. Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP, Araraquara, 1982.
- Lima, U.A.; Aquarone, E. & Borzani, W. - Biotecnologia, Tecnologia das Fermentações. São Paulo, Editora Edgard Blucher Ltda., Vol. 1, 1975.
- Rainbow, C. and Rose, A.H. - Biochemistry of industrial micro-organisms. Londres, Academic Press, 1963.
- Carvalho, A.; Rosim, R.C. & Molinari, R. - Estudo da nutrição e produção de substâncias que absorvem no ultravioleta por *Aspergillus ochraceus*. Rev. Microbiol., 18:269-275, 1987.

Recebido para publicação em 20/01/89

## SOROGRUPAGEM DE CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS, NOTA EPIDEMIOLÓGICA

Caio Marcio Figueiredo Mendes  
Waldemar Francisco  
Luiz Fernando de Goes Siqueira  
Maria José Silveira

Seção de Microbiologia  
Laboratório Fleury de Patologia Clínica  
Rua Cincinato Braga, 282  
01333 São Paulo SP, Brasil

### Resumo

Foram sorogrupados onze amostras de *Cryptococcus neoformans*, isoladas de pacientes com SIDA, através dos meios glicina-cicloheximida-vermelho de fenol (GCP), glicina-vermelho de fenol (GOP) e L-arginina-glicina-azul de bromotímol (CGB). Dez amostras foram isoladas a partir de líquido cefalorraquidiano, sendo nove provenientes de pacientes do sexo masculino e uma paciente do sexo feminino. Uma única amostra foi isolada de ferimento cutâneo. Todas as amostras se comportaram como pertencentes ao sorogrupo A-D.

### Introdução

A criptococose, doença clássica de distribuição mundial, causada por *Cryptococcus neoformans*, caracteriza-se por infecção sub aguda ou crônica, afetando principalmente pulmões, pele e meninges. Seu desenvolvimento depende, sobretudo, de fatores predisponentes, uma vez que o agente etiológico é abundantemente encontrado em fontes vegetais e animais (5, 7). As primeiras evidências do comportamento oportunista desta levedura, foram relatadas na década de 50, com base em sua ocorrência em pacientes portadores de doenças malignas (leucemias, linfomas, mielomas e sarcomas), doenças do colágeno, sarcoidose e outros quadros debilitantes (7, 10, 16, 17). *C. neoformans* reassumiu progressiva importância com a era dos transplantes (21) e, mais recentemente, na Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), onde evidencia um grande número de intercorrências, entre as quais

meningites e quadros disseminados (3, 4, 6, 8, 9, 11, 20, 22, 24, 25, 26), representando, em certas condições, critério para diagnóstico da SIDA.

Atualmente duas variedades de *C. neoformans* agrupam cinco sorotipos: a variedade *neoformans* correspondendo aos sorotipos A, D e AD e a variedade *gatti* correspondendo aos sorotipos B e C (2, 12). Características morfológicas, fisiológicas e epidemiológicas agrupam os cinco sorotipos em dois sorogrupo distintos, A-D e B-C, conhecidos também como complexo *neoformans* e complexo *gatti*, respectivamente (1, 2, 12, 13). No Brasil, raros foram os trabalhos feitos com relação à prevalência de sorotipos e sorogrupo de *C. neoformans*. Paula & Col. (19), em quarenta amostras isoladas de materiais clínicos, obteve 62,5% do sorogrupo A-D, 32,5% do sorogrupo B-C e 5% como não grupáveis. Dentre as diferenças existentes entre os dois sorogrupo, destacam-se predominantemente: a aparência grosseira dos basídios e

basidiósporos (12); a ausência de *C. neoformans*, variedade *gatti*, em algumas regiões geográficas, comprovada através de levantamentos epidemiológicos (1, 14); infecções causadas por leveduras do sorogrupo B-C, têm demonstrado maior resistência a tratamentos antifúngicos clássicos que as do sorogrupo A-D (23) e, finalmente, a criptococose, considerada como uma das principais infecções oportunistas em pacientes portadores de SIDA, envolve, nestes casos, predominantemente *C. neoformans* variedade *neoformans* (sorogrupo A-D) (20). As duas últimas características são de extrema importância clínica.

O objetivo deste trabalho é contribuir para os estudos epidemiológicos da criptococose, particularmente em pacientes portadores de SIDA, como importante grupo favorecedor do recrudescimento desta infecção oportunista.

**Metodologia** - Foram submetidas a esta sorogrupagem onze amostras de *C. neoformans*, isoladas de pacientes aidéticos, sendo nove isoladas de líquido cefalorraquidiano de pacientes masculinos, com idade entre 23 e 70 anos (amostras de 1 a 9). As outras duas amostras foram isoladas de pacientes do sexo feminino: uma de material de ferimento no braço (amostra 10) e a outra de líquido cefalorraquidiano (amostra 11). Todos os materiais foram recebidos na Seção de Microbiologia do Laboratório Fleury no ano de 1988, destinadas a diagnóstico microbiológico, tendo sido isolado exclusivamente *Cryptococcus neoformans*. Após identificação comprobatória das leveduras (5), estas foram submetidas a sorogrupagem através dos seguintes meios: meio de Glicina-cicloheximida-vermelho de fenol (GCP) (18, 21), Glicina-vermelho de fenol sem cicloheximida (GOP) (18, 21) e uma variável do meio L-canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB), desenvolvido por Kwon-Chung & Col. (15), onde foi substituída a L-canavanina pela L-arginina, mantendo idêntica a performance segundo Morales (18). O meio GCP foi preparado pela diluição de uma solução estoque (10 X concentrado), esterilizada por filtração, de glicina 10% e cicloheximida 16,0μg/ml em 6% de "Yeast Nitrogen Base" (Difco). Esta solução

foi adicionada na proporção de 1:10, a um ágar base indicador (2,0% de ágar Difco e 3,0% de uma solução de vermelho de fenol a 0,5%). O meio GOP foi preparado de forma idêntica ao GCP, omitindo entretanto a cicloheximida. O meio CGB foi preparado da seguinte maneira: 100ml de solução A (10,0g de glicina; 1,0g de MgSO<sub>4</sub>; 1,0mg de tiamina-HCl e 30mg de L-arginina em 100ml de água destilada, pH = 5,6, e esterilização por filtração), foi adicionada a um meio base estéril contendo 880ml de água destilada, 20g de ágar e 20ml da solução B (0,4g de azul de bromotimol em 100ml de água destilada). Os meios foram distribuídos em tubos e inclinados para formação de base e ápice. As leveduras mantidas em ágar Sabouraud dextrose, durante 48 horas a 37,0°C, foram semeadas nos meios GCP, GOP e CGB, colocando-se um pequeno inóculo no centro da superfície inclinada. A leitura foi realizada após cinco dias de incubação a 27,0°C, atribuindo-se índice segundo a mudança de cor, e sua interpretação foi baseada na escala correspondente à reação bioquímica, conforme preconizado por Shadowy & Col. (23).

## Resultados

Os resultados são apresentados na Tabela 1.

## Discussão

Rinaldi & Col. (20), afirma ser *Cryptococcus neoformans* variedade *neoformans*, o principal agente da criptococose em pacientes portadores de SIDA, após examinar 24 amostras. Morales (18), em pesquisa realizada com 26 amostras isoladas de pacientes com SIDA, no Hospital Emílio Ribas, em São Paulo, Brasil, chega a idêntica observação. As onze amostras, por nós analisadas, demonstraram ser do sorogrupo A-D. Nossos resultados concordam com as observações de Rinaldi & Col. (20) e de Morales (18), que apresentam como perfil epidemiológico da criptococose, em pacientes portadores de SIDA, quer sob a forma de meningite ou de quaisquer outros comprometimentos, leveduras predominantemente pertencentes ao

Tabela 1 - Distribuição dos resultados das 11 amostras analisadas.

Símbolos: GCP = Glicina - cicloheximida - vermelho de fenol; GOP = Glicina - vermelho de fenol sem heximida; CGB = L-canavanina - glicina-azul de bromotimol; \* = Interpretação bioquímica segundo Shadomy & Cols., 1987.

Amostras	Meios*			Sorogrupo
	GCP	GOP	CGB	
1	0	1+	0	A/D
2	0	0	0	A/D
3	0	1+	0	A/D
4	1+	2+	0	A/D
5	0	0	0	A/D
6	0	0	0	A/D
7	0	0	0	A/D
8	0	0	0	A/D
9	0	1+	0	A/D
10	0	0	0	A/D
11	1+	2+	0	A/D

sorogrupo A-D. É interessante notar, essa predominância do sorogrupo A-D, em pacientes aidéticos. No trabalho pioneiro de Paula & Col. (18), foi encontrada, no Brasil, uma alta percentagem, cerca de 33% de variedade *gatti* (sorogrupo B-C) em diferentes materiais clínicos oriundos de pacientes não aidéticos. Ainda, segundo resultados observados em nosso experimento, as amostras testadas, quando produziam mudança de cor, faziam-na em maior intensidade no meio GOP do que no meio GCP. Observamos, entretanto, que esses dois meios associados parecem ser mais sensíveis na detecção da utilização da glicina que o CGB, onde houve crescimento sem alteração da cor, concordando assim com a afirmação de Salkin & Hurd (21).

#### Summary

*Cryptococcus neoformans* serogrouping, epidemiologic note

Eleven strains of *Cryptococcus neoformans*, isolated from patients with

AIDS, were serogrouped through the media glycine-cycloheximide-phenol red agar (GCP), glycine-phenol red agar (GOP) and L-arginine-glycine-bromothymol blue agar (CGB). Ten strains were isolated from the cerebrospinal fluid, nine from male patients and one from a female patient. Only one strain was isolated from a skin wound. All strains behaved as belonging to the serogroup A-D.

#### Referências Bibliográficas

- Bennett, J.E.; Kwon-Chung, K.J. & Howard, D.H. - Epidemiologic differences among serotypes of *Cryptococcus neoformans*. Am. J. Epidemiol., 105:582-86, 1977.
- Bennett, J.E.; Kwon-Chung, K.J. & Theodore, T.S. - Biochemical differences between serotypes of *Cryptococcus neoformans*. Sabouraudia, 16:167-74, 1978.
- Bottone, E.J.; Toma, M. & Johansson, B.E. - Capsule-deficient *Cryptococcus neoformans* in AIDS patients. Lancet, 1:400, 1985 (letter).
- Byrne, W.R. & Wajszczuk, C.P. - Cryptococcal meningitis in acquired immunodeficiency syndrome (AIDS): successful treatment with fluconazole after failure of amphotericin. B. Ann. Intern. Med., 108:384-5, 1988.
- Conant, N.F.; Smith, O.T.; Baker, R.D. & Callaway, J.L. - Criptococcosis. In: Micologia, 3a ed., México, Interamericana, 1971.
- Dromer, F.; Aucouturier, P.; Clauvel, J.P.; Saimot, G. & Yen, P. - *Cryptococcus neoformans* antibody levels in patients with AIDS. Scand. J. Infect. Dis., 20:283-5, 1988.
- Esteves, J.A.; Cabrita, J.D. & Nobre, C.N. - Micoses sistêmicas. Criptococose. In: Micologia Médica, Lisboa, Fundação Galouste Gulbenkian, 1977.
- Guerin, J.M.; Lebiez, P.E. & Segrestaa, J.M. - Cryptococcose aigue disséminée révélant un SIDA. Ann. Med. Intern., 138:376, 1987.
- Jaffe, H.W.; Bregman, D.J. & Selik, R.M. - Acquired immune deficiency syndrome in the United States: the first 1000 Cases. J. Infect. Dis., 148:339-45, 1983.

10. Kaplan, M.H.; Rosen, P.P. & Armstrong, D. - Cryptococcosis in a cancer hospital. *Cancer*, 39:2265-74, 1977.
11. Kovacs, J.A.; Kovacs, A.P.; Polis, M.; Wright, T. & Cois. Cryptococcosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann. Intern. Med.*, 103:533-8, 1985.
12. Kwon-Chung, K.J. - A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. *Mycologia*, 68:942-6, 1976.
13. Kwon-Chung, K.J.; Bennett, J.E. & Theodore, T.S. - *Cryptococcus bacillisporus* sp nov.: serotypes B - C of *Cryptococcus neoformans*. *Int. J. Syst. Bact.*, 28:616-20, 1978.
14. Kwon-Chung, K.J. & Bennett, J.E. - Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Am. J. Epidemiol.*, 120:123-30, 1984.
15. Kwon-Chung, K.J.; Polacheck, I. & Bennett, J.E. - Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and B) and *Cryptococcus neoformans* var. *gatti* (serotypes B and C). *J. Clin. Microbiol.*, 15:535-7, 1982.
16. Lacaz, C.S.; Porto, E. & Martins, J.E.C. - Criptococose. In: *Micologia Médica*, 7<sup>a</sup> ed., São Paulo, Ed. Sarvier, 1984.
17. Lewis, J.L. & Rabinovich, S. - The wide spectrum of cryptococcal infections. *Am. J. Med.*, 53:315-22, 1972.
18. Morales, B.M.C. - Antígeno capsular, variedades y serotipos de *Cryptococcus neoformans*, in patients com síndrome de immunodeficiencia adquirida y neurocriptococcosis in São Paulo, Brasil, 1988. 143 p; 32cm. Tese de Mestrado em doenças infecciosas e parasitárias. Escola Paulista de Medicina.
19. Paula, C.R.; Ito, C.H.; Purchio, A.; Gambale, W.; Correa, B. & Minami, P.S. - Biochemical serotyping and other physiological characteristics of 40 *C. neoformans* samples isolated from clinical materials in Brazil. *Rev. Ibérica de Micologia*, 5(1):105, 1988.
20. Rinaldi, M.G.; Drutz, D.J.; Howell, A.; Sande, M.A.; Wofsy, C.B. & Hadley, W.K. - Serotypes of *Cryptococcus neoformans* in patients with AIDS. *J. Infect. Dis.*, 153:642, 1986.
21. Salkin, I.F. & Hurd, N.J. - New medium for differentiation of *Cryptococcus neoformans* serotypes pairs. *J. Clin. Microbiol.*, 15:169-71, 1982.
22. Schroter, G.P.J.; Temple, D.R.; Husberg, B.S.; Weil, R. & Starzl, T.E. - Cryptococcosis after renal transplantation: report of ten cases. *Surgery*, 79:268-77, 1976.
23. Shadomy, H.J.; Wood-Helie, S.; Shadomy, S.; Dismukes, W.E.; Chau, R.Y. & N.I.A.I.D. (Mycosis study group). Biochemical serogrouping of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 6:131-8, 1987.
24. Wasser, L. & Talavera, W. - Pulmonary cryptococcosis in AIDS. *Chest*, 92:692-5, 1987.
25. Witt, D.; McKay, D.; Schwan, L.; Goldstein, D. & Gold, J. - Acquired immune deficiency syndrome presenting as bone marrow and mediastinal cryptococcosis. *Am. J. Med.*, 82:149-50, 1987.
26. Zuger, A.; Louie, E.; Holzman, R.S.; Simberkoff, M.S. & Rahall, J.J. - Cryptococcal disease in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann. Intern. Med.*, 104:234-40, 1986.

Recebido para publicação em 02/02/89

## OXIDATIVE METABOLISM OF YEAST CELLS OF *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS*

Maria Aparecida de Resende  
 Marcus Vinicius Guimarães Franco  
 Júnia Soares Hamdan

Dept<sup>o</sup> de Microbiologia  
 Instituto de Ciências Biológicas  
 Universidade Federal de Minas Gerais  
 Caixa Postal 2486  
 30161 Belo Horizonte MG, Brasil

### Resumo

#### *Metabolismo oxidativo de células leveduriformes de Paracoccidioides brasiliensis*

*Paracoccidioides brasiliensis* foi cultivado em meio de Fava Netto a 37°C. Células na fase exponencial foram obtidas e homogeneizadas em tampão fosfato 0,2M pH 7,2. Os experimentos de respirometria foram realizados à partir do extrato livre de células pelo método polarográfico. Entre os açúcares e alcoóis testados, manitol foi o substrato que exerceu maior estímulo sobre a respiração endógena, enquanto glicose, xilose e trealose mostraram fraco efeito sobre a mesma. Glicerol, sacarose e maltose não apresentaram nenhum efeito sobre a respiração endógena. De todos os L aminoácidos testados glicina apresentou maior efeito estimulante sobre a respiração endógena enquanto alanina mostrou o menor efeito. Entre os ácidos orgânicos, aspartato demonstrou o maior efeito estimulante sobre a respiração endógena, enquanto oxalacetato e cítrato exerceram fraco efeito sobre a mesma. Malato apresentou o menor efeito estimulante sobre a respiração endógena.

### Introduction

*Paracoccidioides brasiliensis*, a dimorphic fungus, is a causative agent of paracoccidioidomycosis, a granulomatous disease, endemic to most part of Latin America, mainly in Brazil, Colombia, Venezuela and Argentina. *P. brasiliensis* exhibits a thermal dimorphism, that is to say, it produces a mycelial form (M form) at room temperature and a yeast form (Y form) at 37°C, this form also occurs in human host tissues.

Histochemical studies (2) have demonstrated that the yeast-like form of *P. brasiliensis* accumulates glycogen during exponential growth and degrades it during the stationary phase (5). During transformation of one form to the other, changes in the enzymatic pattern produced by the fungus may

occur, and the two forms may show different biochemical properties (6). Nickerson and Edwards (8) in their study of respiration of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blastomyces dermatitidis*, reported that the Y form had a higher endogenous respiration than the M form, and exhibited an exogenous oxidation of glucose, whereas the mycelial form exhibited no exogenous metabolism, in either resting or starved conditions. Bernheim (1), however observed that the mycelial form of *B. dermatitidis* had a lower oxygen uptake and that it oxidized added substrates more slowly than the yeast form did.

Kanetsuna and Carbonell (6) used cell-free extracts of both forms of *P. brasiliensis* to examine the glycolytic, the citric acid cycle and of the hexose monophosphate shunt enzymes. They

concluded that both forms possessed the enzymes for these pathways. Except for glucose-6-phosphate dehydrogenase and malic dehydrogenase of the mycelial form, the enzymatic activities of these pathways were lower than those of yeast form. The activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase showed the most marked difference between the two forms, its activity in the mycelial form being about 20% of that in the yeast form.

In this paper, we deal with the ability of cell-free extract yeast form of *P. brasiliensis* to utilize different carbohydrates, amino acids and organic acids as respiratory substrates as well as the effect of amphotericin B on glucose respiration.

We also reason that if the pathogenic yeast phase of *P. brasiliensis* utilizes a unique respiratory pathway which is absent in the host, specific therapy directed against this pathway may be possible.

#### Materials and Methods

**Fungal strain and culture** - The organism used was *Paracoccidioides brasiliensis*, strain SN, from the collection of Dr. Fava Netto (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo, Brasil). The microorganism was maintained in Fava Netto solid medium and recultured weekly (log phase).

#### Substrates used:

A - Sugars and alcohols: glucose, galactose, ribose, mannitol, xylose, trehalose, sucrose, maltose, glycerol, lactose, sorbitol and D-arabinose.

B - Organic acids: malate, oxaloacetate, citrate, aspartate and succinate.

C - Amino acids: glycine, D-alanine, L-proline and L-cysteine.

The substrate solutions were prepared by dissolving each substrate in distilled water at a final concentration of 500 $\mu$ Mols/ml.

**Drug** - Amphotericin B powder was obtained from Squibb Ind. Químicas S/A, São Paulo, Brazil. The drug solution was prepared by dissolving 5mg of amphotericin B in 1ml of dimethyl sulfoxide and the volume made up to 20ml with sterile distilled water. The drug was used at a concentration of 0.2

$\mu$ g/ml and 20.0 $\mu$ g/ml.

**Preparation of cell-free extract** - Seven days old cultures was scraped and about 1g of cells was weighed. All subsequent procedures were carried out at 4°C.. The cells were ground with sea sand for sufficient time to obtain 90-100% of rupture. After suspending the paste in 0.2M phosphate buffer (pH 7.2), cell-free extracts were obtained by centrifugation at 7000 RPM for 10 minutes. Samples were distributed in 2ml aliquots and maintained in freezer until use.

**Polarographic method** - The oxygen uptake was measured polarographically with Biological Oxygen Monitor Model 53 (Yellow Spring Instrument Co., Ohio) equipped with YST 5331 Oxygen electrode. To the chamber were added:

Endogenous - 1.0ml of cell-free extract  
0.2ml of distilled water

1.8ml of 0.2M phosphate buffer (pH 7.2)

Substrates - 1.0ml of cell-free extract  
0.2ml of substrate (100 $\mu$ Moles)

1.8ml of 0.2M phosphate buffer (pH 7.2)

Drug - 1.0ml of glucose solution (500 $\mu$ Mol)

1.8ml of cell-free extract  
0.2ml of amphotericin B (0.2 $\mu$ g/ml)

or 20.0 $\mu$ g/ml).

All the experiments were conducted at 37°C, pH 7.2 and without stirring. The amount of oxygen consumed was recorded during 10 minutes after thermic stabilization. The respiratory activity was expressed as %O<sub>2</sub> consumed/ $\mu$ g protein/hour.

**Protein measurement** - The protein content was determined by the Lowry method (7).

#### Results and Discussion

The respiration experiments using carbohydrates and polyalcohols showed that mannitol was the best stimulator of endogenous respiration, while lactose, arabinose, glycerol and glucose showed a low effect on endogenous respiration. Trehalose, xylose, maltose, galactose and sorbitol had lesser smaller effects, while ribose inhibited the endogenous respiration (Figure 1).

Nickerson and Edwards (8) also

Figure 1 - Oxygen consumption by cell-free extract of yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis* in the presence of different sugars and alcohols.

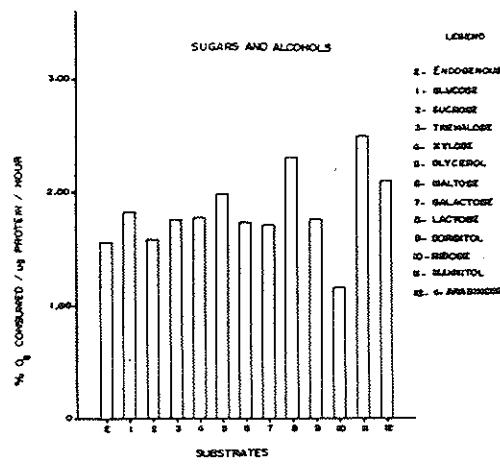
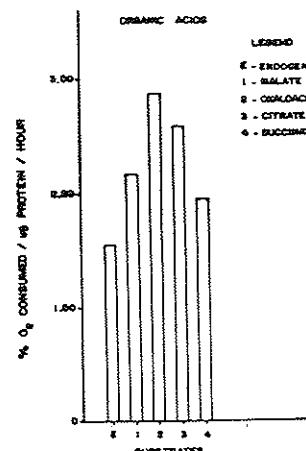


Figure 3 - Oxygen consumption by cell-free extract of yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis* in the presence of different organic acids.



observed the utilization of glucose in respiration of the yeast form of *P. brasiliensis*. Mannose and fructose are utilized by both forms of *P. brasiliensis* (6).

Figure 2 - Oxygen consumption by cell-free extract of yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis* in the presence of different amino acids.

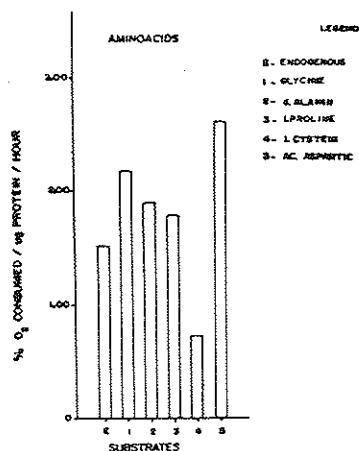
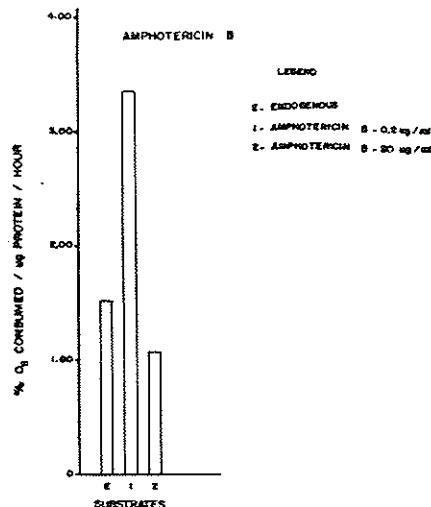


Figure 4 - Effect of amphotericin B on the respiration of glucose by cell-free extract of yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*.



Of all amino acids tested, glycine showed the greatest stimulating effect on endogenous respiration. Alanine and proline had little stimulating effect while cysteine inhibited the endogenous

respiration (Figure 2). According to Gilardi and Laffer (3), alanine and proline are utilized as carbon source for growth of *P. brasiliensis*. Glycine is also utilized as carbon source in the GGY Medium (8).

All organic acids tested were stimulators of endogenous respiration in decreasing order: oxalacetate, aspartate, citrate and malate. Succinate showed a weaker effect (Figure 3). Our results are in agreement with those of Kanetsuna and Carbonell (6), who showed that *P. brasiliensis*, in both forms, has the enzymes of tricarboxilic acid cycle.

Amphotericin B, in a concentration of 0.2 $\mu$ g/ml showed a high effect on endogenous respiration, while in a concentration of 20.0 $\mu$ g/ml inhibited the respiration (Figure 4). In a concentration of 0.2 $\mu$ g/ml, amphotericin B was used as respiratory substrate, confirming the theory that its toxic effect are exerted on intact cells, through combination with sterols of membranes (4). In cell-free extracts, higher concentrations of amphotericin B were necessary to inhibit respiration of *P. brasiliensis*.

## Summary

*Paracoccidioides brasiliensis* was cultured in Fava Netto medium, at 37°C. Exponential-phase cells were obtained and were homogenized in 0.2M phosphate buffer at pH 7.2. The respirometry experiments were realized with a cell-free extract by a polarographic method. Among the sugars and alcohols, manitol was the most stimulating for endogenous respiration, while glucose, xylose and trehalose showed a weaker effect. Glycerol, sucrose and maltose had no effect at all. Of all L amino acids tested, glycine showed the greatest stimulating effect on endogenous respiration, while alanine showed a weaker effect. Among the organic acids tested, aspartate showed the greatest stimulating effect, while succinate, oxalacetate and citrate showed a weaker effect. Malate showed a lesser effect.

## Acknowledgements

This work was supported by FINEP and FAPEMIG.

## References

- Bernheim, F. - The effect of various substances on the oxygen uptake of *Blastomyces dermatitidis*. J. Bacteriol., 44:533-539, 1942.
- Carbonell, L.M.; Castejón, H. & Pollak, L. - Cytochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis*. I - Cytochemistry of cytoplasmic polysaccharides in yeast-form cultures with light microscope. J. Histochem. Cytochem., 12:413-418, 1964.
- Gilardi, G.L. & Laffer, N.C. - Nutricional studies on the yeast phase of *Blastomyces dermatitidis* and *B. brasiliensis*. J. Bacteriol., 83:219-227, 1962.
- Hamdan, J.S. & Resende, M.A. - Lipid composition and effect of amphotericin B on yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. Mycopathologia, 102(2):97-105, 1988.
- Kanetsuna, F. & Carbonell, L.M. - Glycogen in the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. Nature, 208:686, 1965.
- Kanetsuna, F. & Carbonell, L.M. - Enzymes in glycolysis and the citric acid cycle in the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. B. Bacteriol., 92:1315-1320, 1966.
- Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A. & Randall, R.J. - Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193:265-275, 1951.
- Nickerson, W.J. & Edwards, G.A. - Studies on the physiological bases of morphogenesis in fungi. I - The respiratory metabolism of dimorphic pathogenic fungi. J. Gen. Physiol., 33:41-55, 1950.

Recebido para publicação em 21/02/89

# APLICAÇÃO DO MÉTODO FLUORESCENTE (SOLUÇÃO DE DIACETATO DE FLUORESCEÍNA E BROMETO DE ETÍDIO) NO ESTUDO DA VIABILIDADE DE *METARHIZIUM ANISOPLIAE*

Benedito Corrêa  
 Walderez Gambale  
 Claudete Rodrigues Paula  
 Nanci Otilia Chacon Reche  
 & Adhemar Purchio

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

## Resumo

Padronizou-se o método de fluorescência (solução de diacetato de fluoresceína e brometo de etídio), para análise de viabilidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch.) Sorokin, cultivado em ágar Sabouraud-dextrose à 25°C. Após estudar diferentes períodos de contato entre as células e as soluções de corantes, verificou-se que uma perfeita diferenciação entre células viáveis (fluorescência verde) e não viáveis (fluorescência vermelha) foi obtida após 30 minutos, na concentração final de 2 $\mu$ g/ml para o diacetato de fluoresceína e 50 $\mu$ g/ml para o brometo de etídio.

## Introdução

Os métodos para avaliação da viabilidade de células fúngicas têm sido baseados, até o presente momento, no emprego de diversos processos de coloração diretos por exclusão ou, mais frequentemente, pelo cultivo em meios apropriados (12).

Com a evidenciação de que o diacetato de fluoresceína (DF) podia ser utilizado como indicador da viabilidade de células de mamíferos (9), tendo como base a propriedade das células vivas acumular a fluoresceína (fluorocromasia), abriu-se caminho para novas possibilidades como a determinação de viabilidade de células de fungos (11), coloração fluorescente de bactérias (1) e de microrganismos do solo (11).

Outro composto fluorescente, o brometo de etídio (BE), foi utilizado em teste citotóxico (5). Esta substância possui a propriedade de penetrar rapidamente nas células danificadas, formando complexo fluorescente com o material nuclear, ligando-se ao DNA por intercalação,

ocasionando, inclusive, anormalidades mitocondriais; em inúmeros tipos de células, como as leveduras (13).

A combinação de ambas substâncias fluorescentes (DF-BE) foi utilizada para determinar a viabilidade de micobactérias (7) e de células fúngicas em cultivo (3, 4, 8, 9), referindo-se esses autores às amplas perspectivas decorrentes da sensibilidade e rapidez dessa técnica.

Considerando o exposto, o presente trabalho teve como objetivo: padronizar o método de fluorescência (solução de diacetato de fluoresceína e brometo de etídio) para estudo da viabilidade de conídios do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROKIN.

## Material e Métodos

No desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas 3 amostras do fungo *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* procedentes do Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) Brasília-DF, a saber: E-9;

DF1 e DF 10, sendo mantidas em ágar Sabouraud dextrose a 25°C.

**Reagentes e soluções** - A solução estoque de diacetato de fluoresceína (3,6 diacetil fluoresceína-Calbiochem, Los Angeles) foi preparada numa concentração de 5mg/ml de acetona e conservada a -20°C. A solução estoque de brometo de etídio (2,7 diamino, 10 etil, 9 fenil fenantridina - Sigma Chemical, USA) foi obtida em concentração de 1000µg/ml de solução tampão de fosfato (PBS) e estocada a -20°C.

No momento do uso, diluiu-se a solução DF 2500 X e a BE 20 X, ambos em PBS, misturando-se volumes iguais das soluções diluídas.

**Testes de viabilidade** - De cada amostra preparou-se uma suspensão "mãe" de conídios em solução fisiológica. Em seguida, alíquotas de 0,1ml da respectiva suspensão foram misturadas à alíquotas iguais v/v de solução de diacetato de fluoresceína e brometo de etídio em PBS, misturadas pouco antes do uso. As soluções foram incubadas em diferentes períodos de contacto (15, 30, 45, 60 e 90 minutos). Decorridos os tempos estipulados, misturou-se uma gota da suspensão de microrganismos e dos reagentes entre lâmina e laminula, examinando-se em microscópio de fluorescência (Zeiss), equipado com fonte de luz ultravioleta (lâmpada de halogênio 6V, 15 watts).

Os testes foram realizados com todas as amostras a partir de 24 horas até o 85º dia de cultivo em ágar Sabouraud dextrose e incubação a 25°C.

## Resultados

Células não viáveis de *Metarrhizium anisopliae* em contacto com brometo de etídio (BE) apresentaram-se uniformemente coradas em tonalidade vermelha clara e brilhante. Por outro lado, as células viáveis coradas pelo diacetato de fluoresceína (DF) exibiram fluorescência esverdeada, uniformemente distribuída nas células (Figura 1).

Constatou-se, entretanto, que após 78 dias de cultivo, as células viáveis exibiram fluorescência esverdeada mais acentuada na região da parede celular, com a região intracelular emitindo

pouca atividade fluorescente.

Após estudar diferentes períodos de contacto entre as células e as soluções de corantes, verificou-se que uma perfeita diferenciação entre células vivas e mortas foi obtida após 30 minutos a 25°C, na concentração final de 2µg/ml para o diacetato de fluoresceína (DF) e 50µg/ml para o BE.

## Discussão

Estudos referentes à viabilidade de células fúngicas são divididos em dois grupos: os que se baseiam no crescimento e contagem de colônias e os relativos às técnicas microscópicas.

O primeiro grupo apresenta como desvantagem a demora da leitura, que oscila conforme a velocidade de crescimento dos fungos e que é influenciado por fatores nutricionais e do ambiente (6).

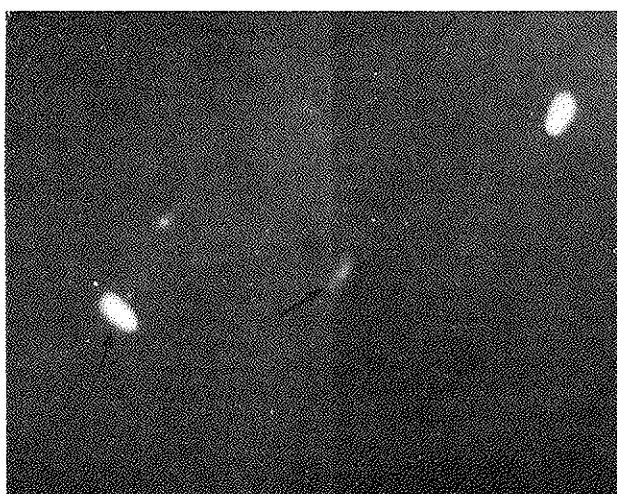
A utilização de técnicas microscópicas, no estudo da viabilidade de fungos, apresenta a vantagem da economia de tempo, da simplicidade, da sensibilidade e da não interferência de fatores nutricionais e ambientais, porém, nesta técnica, a utilização de alguns corantes não permitem perfeita diferenciação entre células fúngicas vivas e mortas (12).

A escolha do brometo de etídio como corante de contraste baseou-se, principalmente, na lenta penetração do mesmo em células fúngicas intactas e na sua rápida penetração nas células danificadas, resultando fluorescência avermelhada uniformemente distribuída na célula (2).

Por outro lado, o diacetato de fluoresceína, em contato com células viáveis, é hidrolisado por enzima esterásica, fornecendo às células intactas coloração esverdeada (2).

Fato que merece menção é a diminuição gradativa da atividade fluorescente a partir da parede celular, após 78 dias de cultivo. Tal comportamento, provavelmente, pode ser atribuído ao fato das células fúngicas adultas serem dotadas de maior número de camadas, estruturalmente mais complexas, que reteriam mais corante, principalmente na região da parede celular, diminuindo, assim, a disponibilidade da fluoresceína livre, ou mesmo, propiciando um retardamento do fluxo de corante para o interior da célula.

Figura 1 - Células vivas (verdes) e mortas (vermelha) de *M. anisopliae* incubadas durante 30 minutos em solução de diacetato de fluoresceína e brometo de etídio (ágar Sabouraud-dextrose, 25°C, 20 dias).



Outra possibilidade, constatada por diversos autores (3, 4, 10) que correlacionaram a cinética fúngica com padrão de coloração do DF-BE, é que amostras cultivadas em fase de declínio e tratadas pelo DF-BE, apresentavam fluorescência menos intensa, ou seja, as células durante este intervalo de tempo encontravam-se em atividade metabólica mínima. Contrariamente, nas fases iniciais de crescimento até a fase log, havia uma fluorescência conspícuia.

Comparativamente ao cultivo, o método fluorescente demonstra maior rapidez na detecção da viabilidade fúngica (30 minutos), permitindo, inclusive, a contagem individual de células fluorescentes, mesmo em número reduzido, sendo, possivelmente, o método mais indicado no estudo do desenvolvimento de culturas de baixa densidade celular.

Pelo exposto, podemos afirmar que o método fluorescente, para o estudo da fisiologia de *M. anisopliae*, constitui importante auxílio para o entomologista, pois é sensível e de rápida execução, apesar de mais oneroso.

#### Summary

*Fluorescent method (fluorescein diacetate and ethidium bromide) for the viability study of Metarrhizium anisopliae*

The fluorescent method was standardized (fluorescein diacetate and ethidium bromide solution) to analyze the viability of *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.). Sorokin, cultivated in Sabouraud - dextrose agar at 25°C. Different periods of contact between cells and fluorescent solution were studied. A perfect differentiation between viable cells (green fluorescence) and no-viable cells (red fluorescence) was verified after 30 minutes, with the final concentration of 2 $\mu$ g/ml to fluorescein diacetate and 50 $\mu$ g/ml to ethidium bromide.

#### Agradecimento

Os autores agradecem a Dra. Elza A.de Luna do CENARGEN - Brasília pelo fornecimento das linhagens de *Metarrhizium anisopliae*.

## Referências Bibliográficas

1. Brunius, G. - Technical aspects of the use of 3', 6' diacetyl fluorescein for vital fluorescent staining of bacteria. *Curr. Microbiol.*, 4:321-323, 1980.
2. Calich, V.L.G.; Purchio, A. & Paula, C.R. - A new fluorescent viability test for fungi cells. *Mycopathologia*, 66:175-177, 1978.
3. Corrêa, B.; Purchio, A.; Paula, C.R.; Gambale, W. - Evaluation of a fluorescent method (fluorescein diacetate and ethidium bromide solution) in the study of the viability of *Cryptococcus neoformans* strains. *Mycopathologia*, 96:91-96, 1986.
4. Corrêa, B.; Purchio, A.; Paula, C.R.; Gambale, W. - Evaluation of a fluorescent method in the study of the viability of *Candida albicans* strains. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, 18:258-263, 1987.
5. Edidin, M. - A rapid quantitative fluorescence assay for cell damage by cytotoxic antibodies. *J. Immunol.*, 104:1303-1306, 1970.
6. European Brewery Convention: yeast group. Estimation of yeast viability. I. *Inst. Brew.*, 68:14-20, 1962.
7. Jarnagin, J.L. & Luchsinger, D.W. - The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a stain for evaluating viability of mycobacteria. *Stain Technol.*, 55:253-259, 1980.
8. Restrepo, A.; Cano, L.E.; Bedout, C.; Brummer, E. & Stevens, A.O. - Comparison of various techniques for determining of *P. brasiliensis* yeast form cells. *J. Clin. Microbiol.*, 16:208-211, 1982.
9. Rojas Pedral, M.M.E. - Avaliação da eficiência do método de fluorescência (solução de diacetato de fluoresceína e brometo de etídio) no estudo da viabilidade de células leveduriformes de *Sporothrix schenckii*. São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas USP, 1983. (Dissertação de Mestrado).
10. Rotman, B. & Papermaster, B.W. - Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolyses of fluorogenic esters. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 55:134-141, 1966.
11. Sodestrom, B.E. - Vital staining of fungi in pure cultures and in soil with fluorescein diacetate. *Soil. Biol. Biochem.*, 9:59-63, 1977.
12. Trevors, J.T.; Merrick, R.L.; Russell, I. & Stewart, G.G. - A comparsion of methods for assessing yeast viability. *Biotechnology Letters*, 5:131-134, 1983.
13. Waring, M.J. - Complex fcrmaton between ethidium bromide and nucleic acids. *J. Mol. Biol.*, 13:269-282, 1965.

Recebido para publicação em 07/03/89

OCCURRENCE OF TREHALOSE MYCOLATE AS THE MAJOR LIPIDIC COMPONENT CARRYING TOXIC PROPERTY IN CLINICAL NOCARDIA ISOLATES

Thuioshi Ioneda  
Neuza Teluko Niigaki  
Edson Tadeu de Almeida

Instituto de Química  
Deptº de Bioquímica USP  
Caixa Postal 20780  
05508 São Paulo SP, Brasil

& Carlos Emílio Levy

Hospital das Clínicas  
Ribeirão Preto SP, Brasil

**Resumo**

*Micolato de trehalose: principal componente lipídico dotado de propriedade tóxica em nocardias isoladas de casos clínicos*

Cepas RP-SN e RP-533 isoladas de dois casos clínicos do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto e identificadas como nocardias, produzem micolato de trehalose com poder rotatório específico de +38,6° e +38,0°, respectivamente. Essa fração glicolipidídica possue atividade toxigênica enquanto a de lipídeos neutros mais ácidos graxos livres e a de fosfolipídeos são desprovidas dessa propriedade.

**Introduction**

Nocardia has as the natural habitat the environment, mainly the surface layers of the soil (8). Invasion of the human body by nocardia takes place either by inhalation of the contaminated dust particles or via wounds which have been in contact with contaminated soil. The most important causative agent of infections amongst species of *Nocardia* is by far *N. asteroides* (5). The invasive power of this organism is not strong, although it may develop as an opportunistic infection in cases of debilitating diseases such as tuberculosis, emphysema, leukemia and bronchiectasis (7) and patients submitted to immunodepressive treatment. Studies carried out on *N. asteroides* 10905 (less virulent) and on *N. asteroides* GUH-2 have shown that 2,3-dihydroxybenzoic acid, a product of a secondary metabolism, may play an

important role in nocardial pathogenicity (4).

This report deals with the identification of trehalose lipid as a toxic component found in microorganisms identified as *Nocardia* which were isolated from clinical cases.

**Materials and Methods**

Microorganisms were isolated from two clinical cases by C.E. Levy in the microbiological laboratory of Hospital Universitário de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, according to procedures described in reference (11). Nocardic acid ( $C_{50}$ -mycolic acid) (2) was identified by analysing the methyl ester derivatives of the organic phase released from lipid deprived cell residue after alkaline hydrolysis (9). Microorganisms were grown for a week at 37°C, on a liquid medium containing: 1% (w/v) yeast extract (Oxoid Ltd, London,

England), 0,5% (w/v) sodium acetate (E. Merck, A.G., Darmstadt, FRG), 1% (w/v) glycerol (Reagen, Rio de Janeiro, Brazil), 0,1% (w/v) sodium chloride (E. Merck). Formaldehyde was added to a final ~1% concentration, and after standing for 2 days, cells were harvested by centrifugation. Lipids were extracted six times with chloroform/methanol (1:1, v/v) and the diethyl ether soluble material obtained by usual procedure (9). Column chromatography was carried out on silicic acid (Carlo Erba, Milano, Italy) and the eluting solvents were: 3% (v/v) ethanol in chloroform, acetone and methanol. Thin-layer chromatography was carried out on silica gel H (E. Merck) using the following solvent systems: n-hexane/diethyl ether/acetone/acetic acid (70/30/11/1, by vol.) (solvent A); chloroform/acetone/methanol/water (50/60/2.5/3, by vol.) (solvent B). For paper chromatography, Whatman no. 1 paper and n-butanol/pyridine/water/toluene (5/3/3/4, by vol.) were used. Lipids on plates were detected under iodine vapors, glycolipids were visualized with anthrone/sulfuric acid (9) and phospholipids with molybdenum-blue reagent (12). Spots on paper chromatograms were revealed with silver nitrate/dip reagent (10). Melting point was determined under Kofler microscopy and optical rotations measured on a Hilger polarimeter with the material dissolved in chloroform. Alkaline hydrolysis and methylation of fatty acids were performed as described in ref. 9.

For "in vivo" experiments, groups of male Swiss mice (18 - 22g) were inoculated with lipid solutions in Nujol (500 $\mu$ g/ml). Each group contained 10 animals and 0.1ml of lipid solution was introduced intraperitoneally every 48h in a total of 5 doses; control group received Nujol. The body weight and the survival were recorded for 30 days.

## Results

The lipid deprived cell residue of microorganisms, designed as RP-SN and RP-533, released fatty acid moiety which after methylation revealed

Table 1 - Physico-chemical characteristics of glycolipids (GL) obtained from nocardia isolated from clinical cases in the Hospital das Clínicas in Ribeirão Preto. Symbols: m.p. = Melting point ( $^{\circ}$ C); s.o.r. = Specific optical rotation.

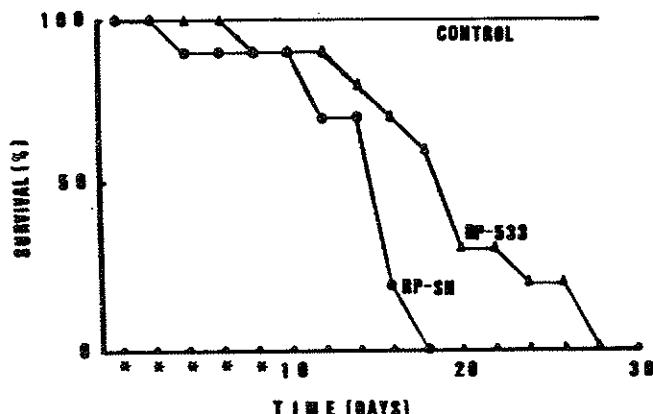
Glycolipids	Characteristics		Alkaline hydrolysis	
	m.p.	s.o.r.	sugar	fatty acid
GL RP-SN	425	+39.6	trehalose	$\sim C_{50}^-$ mycolic acid
GL RP-533	<25	+38.0	trehalose	$\sim C_{50}^-$ mycolic acid

occurrence of spots migrating faster than  $\sim C_{32}$ ,  $\sim C_{40}$ -mycolic acid methyl esters and co-migrating with other  $\sim C_{50}$ -mycolic acid methyl esters. These results agreed with the biochemical identification procedures used (unpublished results) and fits the characteristics observed for *N. asteroides*. Intraperitoneal inoculation of lipid extract in mice caused no death during the period of 30 days.

Fractions from column chromatography of lipid extract were pooled into three main groups: neutral plus fatty acids, glycolipids and phospholipids. Repurification of each of the glycolipid fraction gave a component with a behavior similar to that of standard 6,6'-dicorynomycoloyl trehalose on TLC in solvent B (RF 0.40; RF of standard 0.25). Glicolipids were viscous liquid at room temperature, 25° C, and had specific optical rotation of +38.6° and +38.0°, respectively (Table 1). Each glycolipid released into aqueous phase after alkaline hydrolysis trehalose only, which was identified by paper chromatography in solvent C. On the other hand, the fatty acid moiety after methylation was identified as methyl ester of C50-mycolic acid (Table 1).

Inoculation experiments with the fractions emerged from columns and the purified glycolipids showed that only trehalose mycolate was able to promote toxic effects, leading the treated animals to death (Figure 1).

Figure 1 - Toxicity for mice of trehalose mycolates from clinical *Nocardia* isolates. Ten mice in each group were inoculated intraperitoneally every 48 h (as indicated by asterisks) either with 0.1ml Nujol (control group) or 0.1ml lipid solution in Nujol (500 $\mu$ g/ml) of trehalose mycolate from RP-SN and RP-533.



other fractions displayed no similar property.

### Discussion

*Mycobacterium tuberculosis*, the causative agent of tuberculosis produces a glycolipid 6,6'-dymycoloyl-trehalose (6), known as cord factor which is responsible for the toxic property, and mimicks the histopathology due to mycobacterial infection (1). Demonstration of the presence of trehalose mycolate in nocardia isolates from clinical cases as the component capable of displaying toxic activity constitutes an additional information for understanding the possible mechanism of pathogenesis promoted by nocardia. It is recognised that such mechanism is very complex and not yet well understood (3). However, it may be advanced that trehalose mycolate of nocardia may play also a pivotal role in nocardial infection in a way similar to that of mycobacterial cord factor.

### Summary

*Nocardia* strains isolated from two clinical cases in the Hospital das

Clínicas de Ribeirão Preto, and designed as RP-SN and RP-533 produced trehalose mycolate (specific optical rotation +38.6° and +38.0°, respectively). This lipid displayed toxic activity while neutral lipids plus fatty acids and phospholipids displayed no similar effect.

### Acknowledgments

This work was supported by grants from FAPESP and FINEP to T.I.

### References

- 1.Bekerkunst, A.; Levy, I.S.; Yarkoni, E.; Vilkas, E.; Adam, A. & Lederer, E. - Granuloma formation induced in mice by chemically defined *Mycobacterium* fractions. *J. Bacteriol.*, 100:95-102, 1969.
- 2.Bordet, C. & Michel, G. - Structure et biogénèse des lipides à haut poids moléculaire de *Nocardia asteroides*. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 51:527-548, 1969.
- 3.Davis-Scibienki, C. & Beaman, B.L. - Interaction of *Nocardia asteroides* with rabbit alveolar macrophages: association of virulence, ultrastructural damage and phagosome

- lysosome fusion. Infect. Immun., 28:610-619, 1980.
4. Flistner, G.J. & Beaman, B.L. - Characterization of 2,3-dihydroxybenzoic acid from *Nocardia asteroides* GUH-2. J. Bacteriol., 169:3982-3987, 1987.
5. Kurup, P.U.; Randhawa, H.S. & Gupta, N.S. - Nocardiosis: A review. Mycopath. Mycol. appl., 40:193-219, 1970.
6. Noll, H.; Bloch, H.; Asselineau, J. & Lederer, E. - Chemical structure of the cord factor of *Mycobacterium tuberculosis*. Biochim. Biophys. Acta, 20:299-309, 1956.
7. Puiverer, G. & Schaal, K.P. - Pathogenicity and medical importance of aerobic and anaerobic actinomycetes. In: 'Nocardia and Streptomyces'. Eds. M. Mordarski, W. Kurylowicz & J. Jeljaszewicz. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart. Germany. p.417-427, 1978.
8. Schaal, K.P. & Bickenbach, H. - Distribution of pathogenic nocardiae in soil sample collected in West Germany. In: Proceedings First International Conference on the Biology of Nocardiidae. Ed. G.H. Brownell. Mc Govern Printing Co., Georgia, USA, p.50-51, 1974.
9. Teixeira, M.C.Z.; Ioneda, T. & Asselineau, J. - Glycolipids from *Nocardia asteroides* grown on glucose. Chem. Phys. of Lipids, 37:155-164, 1985.
10. Trevelyan, W.E.; Procter, D.P. & Harrison, J.S. - Detection of sugar on paper chromatograms. Nature, 166:444-445, 1950.
11. Williams, S.T. & Cross, T. - Methods in Microbiology, vol.4, Academic Press, 1971.
12. Vaskosky, V.G. & Kostetsky, E.Y. - Modified spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms. J. Lipid. Res., 90:396-396, 1968.

Recebido para publicação em 07/03/89

## MÉTODO FLUORESCENTE PARA ESTUDO DA VIABILIDADE DE CÉLULAS FÚNGICAS EM MATERIAIS CLÍNICOS

Benedito Corrêa  
Adhemar Purchio  
Walderez Gambale  
Claudete Rodrigues Paula  
& Valéria M. S. Framil

Universidade de São Paulo  
Deptº de Microbiologia  
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374  
05508 São Paulo SP, Brasil

### Resumo

Padronizou-se o método de fluorescência (solução de diacetato de fluoresceína e brometo de etídio), para análise da viabilidade de células fúngicas, em 150 amostras de materiais biológicos (urina, escarro, raspado de mucosa oral, pus, raspado de pele e pelo), provenientes de casos comprovados de micoses humanas diagnosticadas mediante técnicas micológicas clássicas. Após o processamento adequado dos diversos tipos de materiais biológicos, foram retiradas alíquotas de 0,1ml das suspensões obtidas e misturadas a volumes iguais da solução DF-BE (2,0 µg/ml). Para pesquisa de dermatófitos em pelos, colocou-se o material sobre lâmina de vidro contendo 0,1ml de corantes fluorescentes nas mesmas concentrações anteriormente citadas. O tempo de contato ideal entre as células e os corantes foi de 30 minutos, para todos os fungos estudados, resultando perfeita diferenciação entre microrganismos viáveis (fluorescência verde) e não viáveis (fluorescência vermelha).

### Introdução

Os métodos para avaliação da viabilidade de células fúngicas têm sido baseados, até o presente momento, no emprego de diversos processos de coloração ou, mais frequentemente, no cultivo em meios apropriados (18).

Com a evidenciação de que o diacetato de fluoresceína podia ser utilizado como indicador da viabilidade de células de mamíferos (16), tendo como base a propriedade que possuem as células vivas de acumular a fluoresceína (fluorocromasia), abriu-se caminho para novas descobertas, como a determinação da viabilidade de culturas de fungos (17) e coloração fluorescente de bactérias (1).

Outro composto fluorescente, o brometo de etídio, foi utilizado em teste citotóxico (8). Esta substância possui a propriedade de penetrar

rapidamente nas células danificadas, formando complexo fluorescente com o material nuclear.

A combinação de ambas as substâncias fluorescentes (DF-BE) foi utilizada para determinar a viabilidade de micobactérias (10) e de células fúngicas (2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 15) onde os autores referem com entusiasmo as amplas perspectivas que decorrem da sensibilidade e rapidez de execução desta técnica.

Considerando-se a necessidade de estudo mais amplos sobre os agentes fúngicos em materiais biológicos, visando conhecer, através da descrição da viabilidade, vários aspectos do relacionamento agente-hospedeiro, constituiram-se objetivos do presente trabalho: Padronizar o método de fluorescência (solução de diacetato de fluoresceína e brometo de etídio) para análise de viabilidade de células

fúngicas (*C. albicans*, dermatófitos, *M. furfur* e *P. brasiliensis*) em diversos materiais clínicos. Comparar os resultados obtidos com o método fluorescente aos do exame direto clássico e do cultivo.

#### Material e Métodos

Foram estudadas 150 amostras provenientes de casos comprovados de micoses humanas, diagnosticadas mediante técnicas micológicas clássicas, e assim distribuídas: a) candidose (80): escarro (20); mucosa oral (20); urina (20); raspado de pele (20); b) dermatofitose (30): raspado de pele (20); pelo (10); c) pitiriase versicolor (29): raspado de pele; d) paracoccidioidomicose (11): escarro (8); pus (3).

**Reagentes e soluções** - A solução estoque de diacetato de fluoresceína (3,6 diacetil fluoresceína-Calbiochem, USA), foi preparada numa concentração final de 5mg/ml de acetona e conservada a -20 °C.

A solução estoque de brometo de etídio (2,7 diamino, 10 etil, 9 fenil fenantridina - Sigma Chemical USA) foi obtida em concentração de 1000µg/ml de solução tampão de fosfato (PBS) e estocada a -20°C.

No momento do uso, diluiu-se a solução DF 2500X e a de BE 20X, ambas em PBS, misturando-se iguais volumes das soluções diluídas.

**Processamento dos materiais clínicos** - O processamento dos espécies seguiu as normas preconizadas por McGinnis (1980), com algumas modificações.

**Raspado de mucosa oral** - A zaragatoa, utilizada no raspado oral, foi mergulhada em tubo com solução fisiológica e o material prontamente utilizado.

**Escarro** - Volumes iguais de escarro e do agente mucolítico (N-acetil-L-cisteína) foram mantidos em repouso por 1 hora à temperatura ambiente, sendo então acrescentados 10ml de solução fisiológica. O material foi centrifugado por 15 minutos a 2000rpm e o sedimento ressuspensio com solução de saponina 0,3% (Merck). Após

30 minutos de repouso o material foi novamente centrifugado e o sedimento ressuspensio com 2ml de PBS.

**Urina** - Amostras de urina foram centrifugadas por 15 minutos a 2000rpm e os sobrenadantes removidos assepticamente com pipeta Pasteur. Ressuspendeu-se o sedimento com 3ml de solução de saponina 0,3%, deixando-se em repouso por 30 minutos. Em seguida, o material foi novamente centrifugado; o sobrenadante removido e o sedimento ressuspensio em 1ml de PBS.

**Pus** - O pus foi fluidificado, com igual volume de N-acetil-L-cisteína, deixado em repouso por 1 hora à temperatura ambiente e submetido à agitação em Vortex durante 5 minutos com posterior centrifugação a 2000rpm por 15 minutos. O sedimento foi ressuspensio com solução de saponina 0,3%. Após 30 minutos de repouso, a mistura foi centrifugada e o sedimento ressuspensio em 2ml de PBS.

**Raspado de pele** - Escamas de pele foram tratadas com solução de tripsina 2% e mantidas em repouso em estufa a 37°C, por um período de 2 horas. Posteriormente, o preparo foi submetido ao agitador magnético durante 30 minutos e centrifugado a 2000rpm, por 15 minutos. Removido o sobrenadante, 2ml de PBS foram adicionados ao sedimento.

**Pelos** - Pelos e seus fragmentos foram utilizados extemporaneamente.

**Cultivo para controle da viabilidade e identificação das culturas** - Escamas de pele, pelos, mucosa oral, escarro, urina e pus foram semeados em ágar Sabouraud-dextrose acrescido de cloranfenicol (100 µg/ml).

O isolamento de *M. furfur* foi feito com meio especial contendo óleo de oliva.

As amostras semeadas foram mantidas em estufa a 25°C, exceto escamas de pele com *M. furfur* incubadas a 37°C, analisando-se periodicamente o desenvolvimento dos fungos.

A identificação das culturas foi realizada através de técnicas usuais, descritas em livros da especialidade (Kreger Van-Rij, 1984; McGinnis, 1980; Lacaz & Cols., 1984).

Figura 1 - Células leveduriformes viáveis de *C. albicans* presentes em urina, tratado com solução de saponina. Incubação a 25°C por 30 minutos em solução de diacetato de fluoresceína e brometo de etídio (X1000).

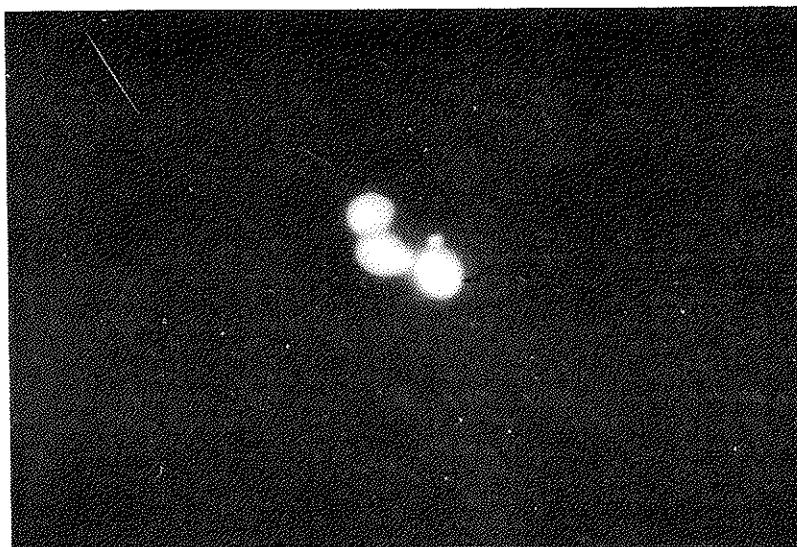


Figura 2 - Fragmentos de dermatófitos vivos e mortos presentes em raspado de pele, tratada com solução de tripsina. Incubação a 25°C por 30 minutos em solução de diacetato de fluoresceína e brometo de etídio (X400).



Figura 3 - Células leveduriformes vivas e mortas de *M. furfur* presentes em raspado de pele, tratado com solução de tripsina. Incubação a 25°C por 30 minutos em solução de diacetato de fluoresceína e brometo de etídio (X400).

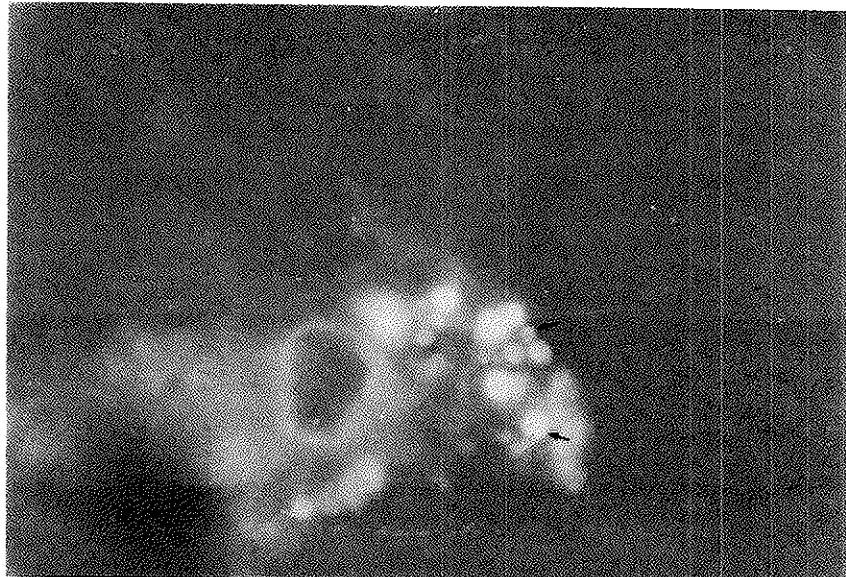


Figura 4 - Filamentos de *M. furfur* viáveis, presentes em raspado de pele, tratado com solução de tripsina. Incubação a 25°C por 30 minutos em solução de diacetato de fluoresceína e brometo de etídio (X400).

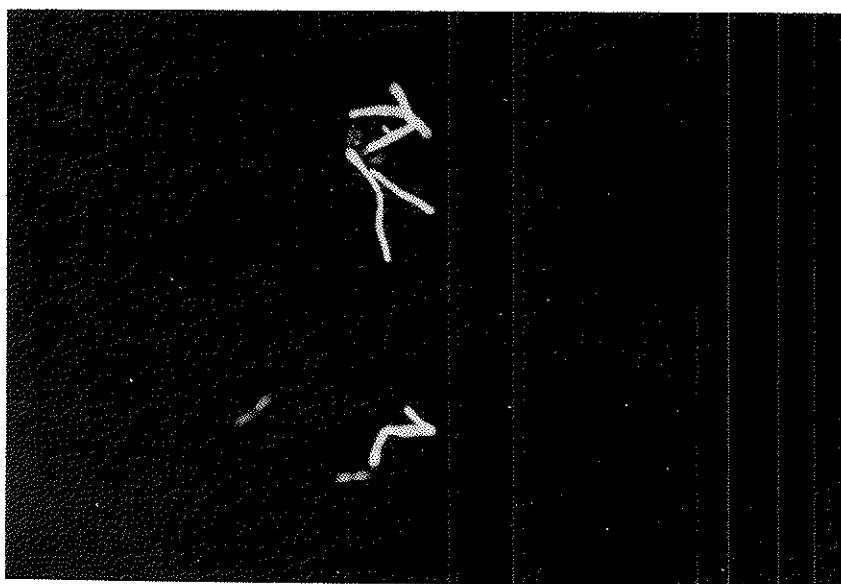


Figura 5 - Esporos vivos e mortos de dermatófitos (*M. canis*) parasitando pelo, incubado a 25°C durante 30 minutos em solução de diacetato de fluoresceína e brometo de etídio (X160).

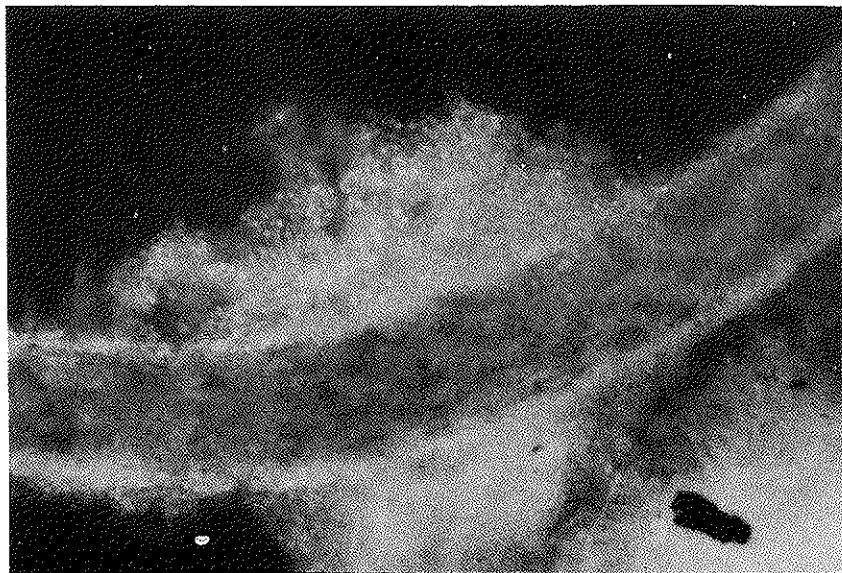


Figura 6 - Esporos vivos e mortos de dermatófitos (*M. canis*), parasitando pelo, incubado a 25°C durante 30 minutos em solução de diacetato de fluoresceína e brometo de etídio (X400).

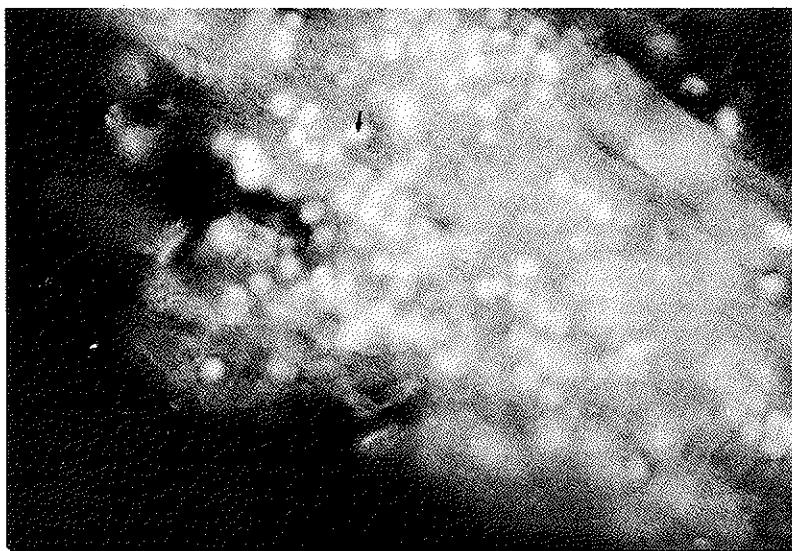
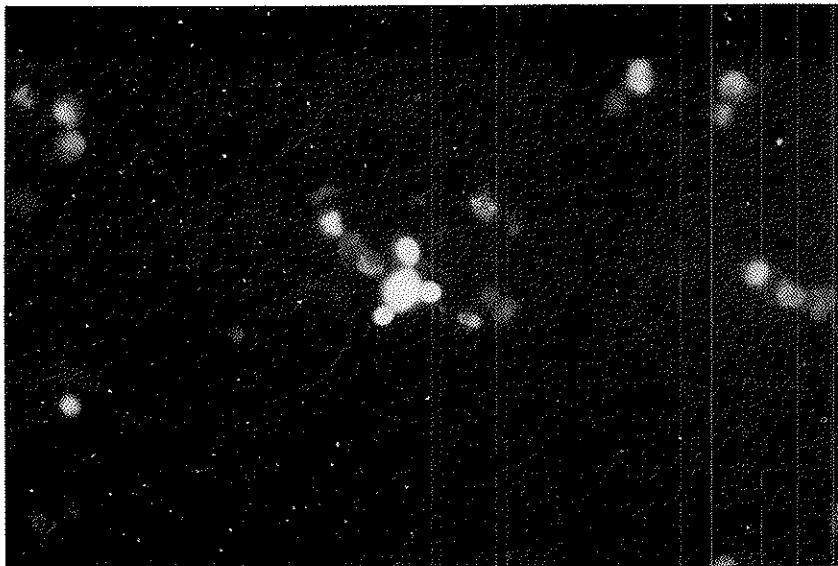


Figura 7 - Células leveduriformes vivas e mortas de *P. brasiliensis*, presentes no escarro, tratado com solução de N-acetil-L-cisteína e saponina, incubado a 25°C durante 30 minutos em solução de diacetato de fluoresceína e brometo de etidio (X400).



**Teste de viabilidade com corantes fluorescentes** - Após processamento adequado dos materiais biológicos, alíquotas de 0,1ml das suspensões obtidas foram adicionados a 0,2ml da mistura DF-BE (2,0 $\mu$ g/ml e 50 $\mu$ g/ml), preparada pouco antes do uso.

As soluções foram submetidas a diversos períodos de contato com as células (5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos) e as suspensões incubadas a 25 e 37°C, a fim de se determinar a maior intensidade de fluorescência no menor tempo de contato.

Decorridos os tempos estipulados, colocou-se 1 gota da mistura entre lâmina e laminula e examinou-se em microscópio de fluorescência.

Para a pesquisa de dermatófitos em pelos, colocou-se o material sobre volumes iguais dos corante DF-BE numa lâmina de microscopia.

Foram realizados testes controles "in vitro" das soluções de tripsina e saponina, empregando-se suspensões de células fúngicas frente a várias concentrações das soluções anteriormente

citadas.

Foi calculado o coeficiente estatístico de concordância K (Kappa) entre o teste fluorescente e o cultivo, descrito por Fleiss (1973).

#### Resultados

Nos diversos tipos de materiais biológicos, o teste de viabilidade com corantes fluorescentes DF-BE, mostrou células não viáveis de *C. albicans*, dermatófitos, *M. surfur* e *P. brasiliensis* com fluorescência de tonalidade vermelha clara e brilhante.

Por outro lado, as células viáveis dos mesmos fungos, exibiram fluorescência esverdeada, uniformemente distribuída (Figuras 1 a 7).

Adotou-se como padrão de concentração dos corantes, 2,0 $\mu$ g/ml para DF e 50 $\mu$ g/ml para BE, ambos em PBS.

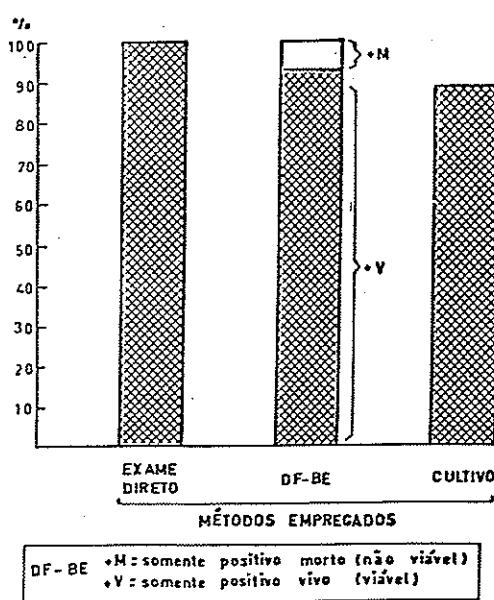
Após estudar os diferentes períodos de contato entre as células fúngicas, presentes nos materiais biológicos previamente tratados, e as soluções de

Tabela 1 - Exames micológicos e testes de viabilidade (DF-BE) realizados em 150 amostras de materiais biológicos provenientes de casos de candidose, dermatofitose, pitiríase versicolor e paracoccidioidomicose.

Simbolos: DF-BE (+) V = Positivo vivo (viável); DF-BE (+) M = Positivo morto (não viável); N = Número de amostras; (%) = Percentual em relação a 150 amostras analisadas.

Micoses e Materiais Clínicos	Número de amostras analisadas	Exame direto (+)	Cultivo (+)	DF - BE (+) Vivo	DF - BE (+) Morto
Nº (%)					
Candidose					
escarro	20 (13,3)	20 (13,3)	20 (13,3)	20 (13,3)	0
urina	20 (13,3)	20 (13,3)	20 (13,3)	20 (13,3)	0
mucosa					
oral	20 (13,3)	20 (13,3)	16 (10,7)	16 (10,7)	4 (2,7)
pele	20 (13,3)	20 (13,3)	18 (12,0)	18 (12,0)	2 (1,3)
Dermatofitose					
pele	20 (13,3)	20 (13,3)	17 (11,3)	17 (11,3)	3 (2,0)
pelo	10 (6,7)	10 (6,7)	10 (6,7)	10 (6,7)	0
pitiríase					
versicolor					
pele	29 (19,3)	29 (19,3)	27 (18,0)	27 (18,0)	2 (1,3)
paracocci					
dioidomicose					
escarro	8 (5,3)	8 (5,3)	3 (2,0)	8 (5,3)	0
pus	3 (2,0)	3 (2,0)	2 (1,3)	3 (2,0)	0
Total	150 (100,0)	150 (100,0)	133(88,7)	139 (92,7)	11(7,3)

Gráfico 1 - Percentuais de positividade em 150 amostras analisadas, segundo os métodos empregados.



corantes (DF-BE), verificou-se uma perfeita diferenciação entre microrganismos viáveis e não viáveis em 30 minutos de contato a 25°C.

A totalidade das amostras analisadas (100%) positivaram-se ao teste fluorescente, levando-se em conta o achado de 92,7% de células vivas e 7,3% de mortas (Tabela 1 - Gráfico 1).

Observou-se que o número de amostras viáveis constatados pelo método fluorescente (139) e pelo cultivo (133), apresentaram-se estatisticamente concordantes ( $K=0,807$ ). Entretanto, no que tange à presença de células viáveis, o DF-BE apresentou um limiar de detecção acima do cultivo (4,0%).

Todas as amostras positivas mortas (não viáveis) pelo método fluorescente, não lograram crescimento fúngico em meio de cultivo.

Ensaios controles das soluções de tripsina e saponina, não resultam na inibição do desenvolvimento de colônias fúngicas.

## Discussão

Estudos referentes a viabilidade de células fúngicas são divididos em 2 grupos: os que se baseiam no crescimento e contagem de colônias e os relativos às técnicas microscópicas.

O primeiro método apresenta como desvantagem a demora da leitura, que oscila conforme a velocidade de crescimento dos fungos, influenciado por fatores nutricionais e ambientais.

A utilização de técnicas microscópicas no estudo da viabilidade de fungos, apresenta a vantagem da economia de tempo, da simplicidade, da sensibilidade e da não interferência de fatores ambientais e nutricionais.

A escolha do brometo de etídio como corante fluorescente de contraste baseou-se, principalmente, na lenta penetração do mesmo em células fúngicas intactas e na sua rápida penetração nas células danificadas, resultando fluorescência avermelhada, uniformemente distribuída, nestas últimas.

Por outro lado, o diacetato de fluoresceína, em contato com células viáveis, é hidrolisado por enzima esterásica, fornecendo às células intactas coloração amarelo-esverdeada brilhante.

Embora a digestão da queratina dos fragmentos de pele seja mais eficiente com o emprego de hidróxido de potássio, a utilização deste reagente tornou-se inviável devido à interferência do pH na ação dos corantes. Partindo dessa premissa, empregou-se a enzima proteolítica (tripsina) como método alternativo para o preparo do material. Esta técnica permitiu a perfeita visualização de dermatófitos, *C. albicans* e de *M. furfur*, viáveis ou não, com detalhes morfológicos dificilmente observados pelo exame clássico.

A solução aquosa de saponina eliminou fluorescências inespecíficas emitidas por hemácias e leucócitos.

De modo geral, o DF-BE possibilitou a visualização nítida e rápida as células fúngicas viáveis, fato este resultante do contraste entre a fluorescência esverdeada emitida pelas referidas células e a emitida pelo materiais celulares presentes nos espécimes, que, embora vermelha, também permitiu diferenciá-los das células fúngicas

mortas que exibiram a mesma coloração.

A concordância estatística total ( $K=1$ ) entre o número de amostras positivas registradas ao exame direto e método fluorescente, deveu-se ao ato, do último, permitir a visualização de células vivas e mortas.

Correlacionando-se o número de amostras viáveis em cultivo e em DF-BE, encontrou-se valores mais elevados (4,0%) com o método fluorescente (Gráfico 1) e (Tabela 1). Tais achados são, portanto, indicadores de um limiar de etecção maior desse método, sendo, portanto, o mais indicado para o estudo da viabilidade de fungos de difícil cultivo e mais exigentes do ponto de vista nutricional (Restrepo e cols., 1982).

Se, por um lado, o exame direto se destaca pela rapidez, baixo custo e relativa sensibilidade, o método fluorescente DF-BE mostra certa morosidade no processamento (dependendo do espécime clínico), boa sensibilidade e possibilidade de diferenciação entre células vivas e mortas, sendo, portanto, um método alternativo e/ou confirmatório perfeitamente aplicável.

## Summary

*Fluorescent method to study the viability of fungi cells in clinical materials*

The utilization of the fluorescent method (fluorescein diacetate-DF and ethidium bromide-BE) to verify the viability of fungi cells was studied in 150 samples of clinical material. After processing of biological samples (urine, oral mucosa scrap, skin scrap, sputum and pus) 0,1ml aliquota of resulting suspension were mixed to equal volumes of DF-BE solution (2,0  $\mu$ g/ml and 50,0 $\mu$ g/ml, respectively). For the examination of dermatophytes in hair, the material was placed in microscopy slides, with 0,1ml of fluorescent dye. The ideal contact time between fungi cells and dye solution was 30 minutes, resulting in perfect differentiation between viable (green fluorescence) and not viable (red fluorescence) cells.

## Referências Bibliográficas

- 1.Brunius, G. - Technical aspects of the use of 3', 6-diacetyl fluorescein for vital fluorescent staining of bacteria. *Curr. Microbiol.*, 4:321-3, 1980.
- 2.Calich, V.L.G.; Purchio, A. & Paula, C.R. - A new fluorescent viability test for fungi cells. *Mycopathologia*, 66:175-7, 1978.
- 3.Corrêa, B.; Purchio, A.; Paula, C.R. & Gambale, W. - Evaluation of a fluorescent method (fluorescein diacetate and ethidium bromide solution) in the study of the viability *Cryptococcus neoformans* strains. *Mycopathologia*, 96:91-6, 1986.
- 4.Corrêa, B.; Purchio, A.; Paula, C.R. & Gambale, W. - Evaluation of a fluorescent method in the study of the viability of *Candida albicans* strains. *Rev. Microbiol. São Paulo*, 18:258-63, 1987.
- 5.Corrêa, B.; Gambale, W.; Paula, C.R.; Chacon-Reche, N.O. & Purchio, A. - Aplicação do método fluorescente diacetato de fluoresceína e brometo de etidio no estudo da viabilidade de *Metarrhizium anisopliae*. Simpósio Nacional de Controle Biológico de Pragas e Vetores, 19, Rio de Janeiro, 1988.
- 6.Corrêa, B., Purchio, A.; Paula, C.R.; Gambale, W. & Chacon-Reche, N.O. - Método fluorescente para o estudo da viabilidade de *Cryptococcus neoformans* em amostras de líquor. XV Congresso Brasileiro de Microbiologia, Ribeirão Preto, 1989.
- 7.Corrêa, B.; Gambale, W.; Paula, C.R. & Palazzo, S. - Morfogênese de *Sporothrix schenckii* "in vivo" e "in vitro" através do método de viabilidade pela fluorescência. XV Congresso Brasileiro de Microbiologia, Ribeirão Preto, 1989.
- 8.Edidin, M. - A rapid quantitative fluorescence assay for cell damage by citotoxic antibodies. *J. Immunol.*, 104:1303-6, 1970.
- 9.Fleiss, J.L. - The measurement and control of classification error in: Statistical methods for rates and proportions. New York, John Wiley, 1973. p.140-54.
- 10.Jarnagin, J.L. & Luchsinger, D.W. - The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a stain for evaluating viability of micobacteria. *Stain Technol.*, 55:253-59, 1980.
- 11.Kreger-van Rij, N.J.W. - The yeasts: as taxonomy study. Amsterdam, Elsevier, 1984. 1082p.
- 12.Lacaz, C.S.; Porto, E.; Martins, J.E.C. - Micologia Médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. São Paulo, Sarvier, 1984. 479p.
- 13.McGinnis, M.R. - Laboratory handbook of Medical Mycology, New York, Academic Press, 1980. 661p.
- 14.Restrepo, A.; Cano, L.E.; Bedout, C.; Brumer, E. & Stevens, A.D. - Comparison of various techniques for determining of *P. brasiliensis* yeast form cells. *J. Clin. Microbiol.*, 16:209-11, 1982.
- 15.Rojas Pedral, M.M.E.; Purchio, A. - Avaliação da eficiência do método de fluorescência no estudo da viabilidade de células leveduriformes de *Sporothrix schenckii*. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.*, 30:197-200, 1988.
- 16.Rotman, B. & Papermaster, B.W. - Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolyses of fluorogenic esters. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 55:134-41, 1966.
- 17.Sodestrom, B.E. - Vital staining of fungi in pure cultures and in soil with fluorescein diacetate. *Soil. Biol. Biochem.*, 9:59-63, 1977.
- 18.Trevors, J.T.; Merrick, R.L.; Russell, I. & Stewart, G.G. - A comparison of methods for assessing yeast viability. *Biotechnology Letters*, 55:131-34, 1983.

Recebido para publicação em 17/03/89

## PRODUÇÃO DE INTERFERON HUMANO DE MEMBRANAS AMNIÓTICAS EM MICROTÉCNICA

Igor Cunha de Oliveira  
 Erna Geessien Kroon  
 Paulo César Peregrino Ferreira  
 & Romain Rolland Golgher

Laboratório de Vírus  
 Deptº de Microbiologia  
 Instituto de Ciências Biológicas  
 Universidade Federal de Minas Gerais  
 Caixa Postal 2486  
 30161 Belo Horizonte MG, Brasil

### Resumo

Foi desenvolvido um sistema de produção de interferon humano de membranas amnióticas (IFN-MA) em microtécnica. Fragmentos de âmnio de 1,4 ou 2,2cm de diâmetro, em placas de microtécnica (24 câmaras), foram infectados por vírus Sendai e o IFN-MA resultante foi titulado. Maiores títulos (12.800 e 13.000 unidades por ml) foram obtidos quando utilizadas quantidades de meio de 0,5ml e 1,0ml; 6,4 unidades hemaglutinantes do vírus Sendai e um fragmento por câmara. Níveis de IFN-MA mais consistentes e altos foram alcançados na região coriônica do âmnio (6.000 a 9.600 unidades/ml) quando comparados com aqueles da região umbilical (860 a 2.500 unidades/ml) e reflexa (200 a 6.200 unidades/ml). O sistema com fragmentos de 2,2cm de diâmetro produziu, em média, quantidades de interferon/ml superiores (9.300 unidades/ml) quando comparado ao da produção do âmnio total (2.200 unidades/ml). Apesar da variabilidade nos títulos produzidos individualmente pelos fragmentos de 2,2cm de diâmetro, devido à economia de tempo e de materiais e aos altos níveis de IFN resultantes, a microtécnica poderá ser empregada quando um grande número de variáveis for investigada.

### Introdução

Interferons humanos, para emprego clínico podem ser produzidos por várias células ou tecidos, especialmente por leucócitos (1), fibroblastos (10), células linfoblastoides (12), âmnio (4) e por bactérias (5) ou fungos (2) modificados por técnicas de DNA recombinante.

As possibilidades da utilização da placenta como fonte de tecido vem sendo investigadas em nosso laboratório há vários anos. Foi verificado que o âmnio é o que produz níveis mais altos e regulares de interferon dos tecidos

placentários (âmnio, córion e vilosidades coriônicas) (9). O vírus Sendai mostrou-se um eficiente indutor (E.G.Kroon, dados não publicados). Este sistema, empregando frascos com 5g (9) ou com 50g de membranas amnióticas têm sido empregado para estudar interferon humano de membranas amnióticas (IFN-MA) em vários aspectos (7).

Pela necessidade de investigações comparativas na produção deste interferon, em condições variadas, foi desenvolvido um novo sistema de produção. O sistema consiste na produção de IFN-MA em microtécnica, onde pequenas quantidades de tecido são

---

Este trabalho recebeu auxílio da FINEP (convênios 4.3.84.0526/00; 81.237.00.00) e outro do FIPEC (Fundo de Incentivo à Pesquisa do Banco do Brasil S.A.).

empregadas, mostrando-se o método econômico e de manipulação simples e rápida.

#### Material e Métodos

**Vírus** - O vírus paraínfluenza 1 (Sendai, amostra Cantell), foi multiplicado em ovos embrionados de galinha; o estoque empregado tinha título hemaglutinante de 640 unidades/ml.

O vírus da encefalomielite de camundongo (EMC) foi reproduzido em células Vero e titulado em microtécnica nas mesmas células, pela determinação da dose infectante para 50% das câmaras WID<sub>50</sub> (8).

**Indução de IFN-MA** - Os âmnios, obtidos de placenta de parto normal, foram separados e lavados em solução salina de Hanks (SSH) com antibióticos. O âmnio de toda a placenta restante (sem os discos, ver abaixo) foi infectado com vírus Sendai diluído 1/10 em SSH, na proporção de 0,4ml/g de tecido. Após 30 minutos de incubação a 37°C, foi adicionada SSH na proporção de 8ml/g de tecido, acrescido de 1% de plasma humano. (inativado e absorvido em polietilenoglicol) e antibióticos (6). Em alguns experimentos, fluido amniótico sintético (E.G.Kroon, em preparo) foi utilizado em lugar da SSH. Os tecidos foram incubados a 37°C e 24 horas depois, o meio foi colhido, seu pH foi acertado para pH2 a 3,5, mantido por 48 horas a 4°C e depois a -20°C, até a titulação da atividade antivírica.

Para a produção em microtécnica, após a lavagem, o âmnio foi cortado em círculos de 1,4cm, com um vazador, ou 2,2cm de diâmetro, com um bisturi a partir de um molde de aço inoxidável. Cada fragmento foi colocado em uma câmara de uma placa com 24 câmaras (Flow Laboratories, McLean, Virginia, EUA) que recebia o vírus indutor por 2 h (círculos de 1,4cm) ou 30 min (círculos de 2,2cm), a 37°C, em atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub>. Meio de cultura foi acrescentado a cada câmara e após 24 horas de incubação nas mesmas condições, os discos de âmnio foram desprezados e uma alíquota de cada sobrenadante foi irradiada com luz ultra-violeta e mantida a -20°C até a

titulação da atividade antivírica.

**Titulação de IFN-MA** - Foi realizada conforme descrita (3) com ligeiras modificações. Foram utilizadas placas de microtécnica com 96 câmaras (Petecil, São Paulo, SP) das quais cada câmara recebia uma diluição dos materiais em série de 2. Células Vero foram colocadas em cada câmara da placa de microtécnica a uma concentração final de 70 mil por câmara e cresceu-se EMC, de 100 a 200 WID<sub>50</sub> por câmara. As placas foram incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Quando o efeito citopático do EMC atingia 75 a 100% das células nos controles de vírus, foi feita a leitura final da titulação. O inverso da diluição que causava 50% da inibição do ECP foi considerada como contendo uma unidade de interferon. Nestas condições, o coeficiente de variação foi de 36%. Os títulos de IFN estão expressos em unidades de laboratório. O padrão de interferon humano MRC 69/19 (5.000 U/ml) mostrou um título médio de 40.000 unidades/ml com este método.

#### Resultados

**Padronização dos fragmentos** - Os círculos de 1,4 e 2,2cm de diâmetro, obtidos com o vazador e com o bisturi e molde, apresentaram pesos médios de 0,06 ± 0,01g e 0,11 ± 0,04g respectivamente. Foi utilizada uma amostragem de 15 fragmentos para cada diâmetro, e os desvios-padrão observados foram considerados satisfatórios.

**Volume de meio e número de discos por câmara** - O próximo passo foi verificar a influência destas duas variáveis para os fragmentos com os dois diâmetros empregados. A Tabela 1 mostra que não há vantagem em se utilizar mais de um disco por câmara, apesar da variação dos títulos de interferon. Com os discos de 1,4cm, o menor volume (0,5ml) parece mais satisfatório devido à economia de material.

**Quantidade de vírus indutor** - Fragmentos de âmnio com 1,4cm de diâmetro foram infectados com diferentes concentrações de vírus Sendai, de 0,64 a 64 unidades

hemaglutinantes e, para confirmação dos dados anteriores, variou-se o volume de meio (0,5 e 1ml) e o número de discos por câmara (1 ou 5). Os resultados revelaram não haver diferenças quando o número de fragmentos foi de um por câmara e o volume de 0,5 ou 1ml. Contudo, quando se aumentou o número de discos para cinco e o volume para 2ml, as quantidades produzidas de IFN-MA diminuiram (dado não mostrado).

**Regiões do âmnio e produção de interferon** - Como os títulos de IFN-MA variavam (ver por exemplo Tabela 1), foram investigadas possíveis diferenças se discos fossem colhidos em regiões distintas do âmnio, a saber: dentro de um raio de aproximadamente 2cm em torno do cordão umbilical ("região umbilical") a que cobre as vilosidades coriônicas ("região coriônica") a que está justaposta ao córion ("região reflexa"). Para isto, quatro placentes foram utilizadas. Destas, seis discos foram retirados das regiões coriônica e reflexa e apenas três (pelo menor tamanho da região) da umbilical.

Os títulos produzidos pelos fragmentos da região coriônica foram mais constantes e elevados (coeficiente de variação entre 20 e 44%) do que a região umbilical (33 a 77%) e reflexa (0 a 88%) (Tabela 2) e por isto os experimentos seguintes foram realizados com o âmnio desta região.

**Variação dos títulos de interferon produzidos** - Devido às diferenças de título produzidas por discos retirados de um mesmo âmnio, levantamento e análise estatística dos dados foram realizados para se conhecer a variabilidade dos resultados.

De um único âmnio, 24 a 36 discos de 2,2cm foram retirados da região coriônica, foi colocado um fragmento em cada câmara e a indução realizada conforme Material e Métodos.

O título de interferon de cada câmara foi determinado e calculou-se a média e o desvio padrão do interferon produzido por todos os discos deste âmnio (média total). Por outro lado, tomou-se os títulos de cada câmara e calculou-se a média do IFN produzido por 2, 4 ou 6 discos tomados aleatoriamente (média parcial) para comparação com a média total. Dos 4 (quatro) experimentos

**Tabela 1 - Influência do volume de meio e número de fragmentos de âmnio humano de 1,4 e 2,2cm de diâmetro na produção de interferon (IFN-MA).**

Símbolos: a = Cada câmara recebeu 0,1ml de vírus Sendai, contendo 6,4 unidades hemaglutinantes para a indução de IFN-MA. Os resultados representam a média dos títulos dos sobrenadantes de três câmaras.

Diâmetro do fragmento (cm)	Número de fragmentos por câmara	Volume de meio por câmara (ml)	Interferon produzido <sup>a</sup> (unidades/ml)
1,4	1	0,5	7.900
	1	1,0	3.200
	1	1,5	1.800
	1	2,0	3.500
	5	2,0	7.500
2,2	1	0,5	7.500
	1	1,0	2.800
	1	1,5	9.300
	3	1,5	2.200
	5	1,5	1.400

**Tabela 2 - Produção de interferon por diversas regiões do âmnio humano (fragmentos de 1,4cm de diâmetro) induzidos pelo vírus Sendai.**

Símbolos: a = Cada câmara recebeu um fragmento de âmnio, 6,4 unidades hemaglutinantes /0,1ml de vírus inductor e 0,5ml de meio. Os resultados representam a média dos títulos dos sobrenadantes de 3 ou 6 câmaras, com seus respectivos desvios-padrão.

Região do âmnio	Nº de fragmentos p/câmara	Interferon produzido <sup>a</sup> (unidades/ml)			
		Âmnio			
		1	2	3	4
Umbilical	3	860 <sup>b</sup> 288	1400 <sup>b</sup> 1006	830 <sup>b</sup> 353	2500 <sup>b</sup> 1931
Coriônica	6	9600 <sup>b</sup> 4250	6000 <sup>b</sup> 1306	9000 <sup>b</sup> 1813	6400 <sup>b</sup> 20
Reflexa	6	6200 <sup>b</sup> 3730	420 <sup>b</sup> 3728	200 <sup>b</sup> 0	2200 <sup>b</sup> 890

feitos, a Tabela 3 representa um típico. A diferença entre os títulos de IFN de cada disco foi considerável, porém a média de produção por seis discos foi comparável à média total. O desvio padrão total situou-se pouco abaixo de 100% da média. Tomado aleatoriamente, o desvio padrão dos títulos de IFN-MA produzido por seis discos foi menor que 100% (4 grupos) e superior a 100% (2 grupos). Como seria de se esperar, quando os grupos eram de dois ou quatro, as médias parciais afastaram-se da média total e os desvios padrão e parciais foram maiores; o aumento do número para oito

**Tabela 3 - Análise estatística da produção de interferon por fragmento de âmnio humano de 2,2cm de diâmetro.**  
**Símbolos:** a = Cada câmara recebeu um fragmento de âmnio, 6,4 unidades hemaglutinantes /0,1ml de vírus indutor e 0,5ml de meio.

	Grupos aleatórios					
	1					
Interferon produzido <sup>a</sup> por fragmento <sup>a</sup>	2.400	2.400	1.800	4.800	2.400	200
Unidades/ml	3.600	900	2.400	300	600	900
	3.600	1.800	900	1.800	1.800	200
	200	1.800	6.400	300	1.800	6.400
	600	4.800	2.400	200	2.400	300
	900	200	200	900	1.800	900
Média parcial	1.880	1.980	2.350	1.380	1.800	1.480
Desvio padrão	1.524	1.589	2.165	1.779	657	2.431
Média total			1.900			
Desvio padrão total			1.697			

discos é inconveniente pela redução das variáveis que poderiam ser investigadas.

**Comparação dos títulos obtidos na produção de interferon por microtécnica com o âmnio total** - De uma placenta foram retirados seis discos de 1,4 ou 2,2cm de diâmetro da região coriônica sendo estes e o restante do âmnio (29,4 a 44,4g) induzido conforme Material e Métodos. Os dados foram organizados na Tabela 4 e mostram que os níveis de interferon produzidos pela microtécnica foram superiores ao restante do âmnio, com a exceção de um grupo. Experimentos comparando-se a produção de IFN-MA com discos de 2,2cm de diâmetro e o sistema de 5g de tecido mostrou títulos mais altos com a microtécnica (dados não mostrados).

#### Discussão

A obtenção de fragmentos com molde e bisturi mostrou-se prática, reproduzível e conveniente para a manipulação em microtécnica. O volume de 1ml de meio e a quantidade de um disco por câmara produziram títulos satisfatórios de interferon (Tabela 1).

Concentrações ótimas de vírus indutor foram atingidas no sistema de fragmentos de 1,4cm de diâmetro com a dose de 0,64 unidades hemaglutinantes/0,1ml ( dado não mostrado), a exemplo do que foi observado com o sistema de 5g ou 50g (7, 9).

Os dados da Tabela 2 indicam que o âmnio coriônico deverá ser empregado

**Tabela 4 - Comparação dos títulos de interferon produzidos em microtécnica e âmnio total.**

**Símbolos:** a = Seis fragmentos de cada diâmetro foram retirados da região coriônica do âmnio e o restante do tecido (âmnio total) foi separado para a indução em um frasco; b = Foram utilizadas 6,4 unidades hemaglutinantes em 0,1ml de vírus e 1ml de meio por câmara. Os sobrenadantes de seis câmaras foram misturados e uma aliquote desta mistura foi titulada.

Âmnio	Interferon produzido <sup>a</sup>	
	Unidades/ml	Âmnio total
<i>Microtécnica<sup>b</sup></i>		
1	4.600	2.400
2	500	1.600
3	3.500	200
4	1.300	400
5	1.600	400
Média	2.300	800
<i>Discos de 1,4cm</i>		
1	800	50
2	3.200	1.600
3	6.400	3.200
4	9.600	2.400
5	12.800	800
6	12.800	2.400
7	19.200	4.800
Média	9.300	2.200
<i>Discos de 2,2cm</i>		
1	800	50
2	3.200	1.600
3	6.400	3.200
4	9.600	2.400
5	12.800	800
6	12.800	2.400
7	19.200	4.800
Média	9.300	2.200

para a produção de IFN; as diferenças verificadas podem ser explicadas pela histologia diversa das regiões amnióticas (11) e pela tração exercida pelo parto na região reflexa.

O número de discos empregados, por variável, deverá ser de seis (Tabela 3) e, como os títulos de interferon produzidos em microtécnica foram constantemente superiores àqueles obtidos pelo restante do âmnio da mesma placenta (Tabela 4), os resultados obtidos na microtécnica poderão ser extrapolados para o sistema de 50g.

Conclui-se que o sistema de produção de interferon em microtécnica é um sistema conveniente para se estudar um grande número de variáveis devido à economia de meio, tecido e outros materiais e à rapidez na execução dos experimentos. Contudo, as diferenças de título encontradas deverão ser muito grandes para serem significativas e a produção em microtécnica deverá ser utilizada apenas para experimentos indicativos.

## Summary

### *Production of human amniotic interferon by microtechnique*

A system for production of human amniotic interferon (IFN-MA) by microtechnique was developed. Disks of amnion tissue (diameter of 1.4 or 2.2cm) in microtiter plates (24 wells) were infected with Sendai virus and titers of IFN-MA were measured. Higher yields (12,800 and 13,000 units per ml) were obtained when 0.5 or 2.0ml of medium, 6,4 hemagglutinating units and one fragment per well were used. Titers of IFN-MA were consistently higher with the chorionic section of the amnion (6,000 to 9,000 units per ml) when compared with the yields of the umbilical section (860 to 2,500 units per ml) and the "reflectum" section (200 to 6,200 units per ml). The disk (2,2cm of diameter) system produced higher titers of IFN-MA (9,300 units/ml) than the amnion from which they were derived (2,200 units per ml). Despite the variability in the titers produced by individual disks (2,2cm of diameter), the microtechnique can be employed when several variables are investigated, due to the economy of time, materials and the high levels of interferon that are induced.

## Agradecimentos

Os autores agradecem a João Rodrigues dos Santos, Bernadete de Jesus Martins, Maria Cristina da Anunciação, Alex Florini de Carvalho e Maria Lúcia Trindade os excelentes serviços técnicos, a Luiz Fernando Lima Reis as sugestões para a execução deste trabalho e a Angela Sana Lopes pela datilografia.

## Referências Bibliográficas

- Cantell, K.; Hirvonen, S.; Kauppinen, H. & Myllyla, G. - Production of interferon in human leukocytes from normal donors with the use of Sendai virus. In: S. Pestka, P. Colowick and N.O. Caplan eds. *Methods in Enzymology*, vol. 78. The Interferons. Part A. p.29-38. London, Academic Press, 1981.
- Deryck, R.K.; Singh, A. & Goeddel, D.V. - Expression of the human interferon gamma DNA in yeast. *Nucleic Acid. Res.*, 11:1819-1837, 1983.
- Ferreira, P.C.P.; Peixoto, M.L.P.; Silva, M.A.V. & Golgher, R.R. - Assay of human interferon by several methods. *J. Clin. Microbiol.*, 9:471-475, 1979.
- Fournier, F.; Falcoff, E. & Chany, C. - Demonstration, mass production and characterization of a heavy molecular weight human interferon. *J. Immunol.*, 99:1039-1041, 1967.
- Goeddel, D.V.; Shephard, H.M.; Yelverton, E.; Leung, D.; Crea, R.; Sloma, A. & Pestka, S. - Synthesis of human fibroblast interferon by *E. coli*. *Nucleic Acid Res.* 8:4057-4074, 1980.
- Kroon, E.G. - Produção de interferon humano de membrana amniótica induzido pelo vírus da doença de Newcastle. Belo Horizonte, 1980 (Tese).
- Kroon, E.G.; Ferreira, P.C.P. & Golgher, R.R. - Produção de interferon humano de membranas amnióticas (IFN-MA). IX Conservação de placenta e de membranas amnióticas (MA). II Encontro Nacional de Virologia, São Lourenço, MG, Brasil, 1984.
- Reed, L.J. & Muench, H. - A simple method of estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg.*, 27:493-497, 1938.
- Silva Novo, M.A. - Produção de interferon em placenta humana. Belo Horizonte, 1980. (Tese).
- Van Damme, J. & Billiau, A. - Large-scale production of human interferon. In: S. Pestka, P. Colowick. and N.O. Caplan eds. *Methods in Enzymology*, vol.78. The interferons. Part A. p.101-110. London, Academic Press, 1981.
- Van Herendael, B.J.; Oberti, C. & Brossen, I. - Microanatomy of the human amniotic membranes. A light microscopic, transmission and scanning electron microscopic study. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 131:872-880, 1978.
- Zoon, K.C. & Buckler, C.E. - Large-scale production of human interferon in lymphoblastoid cells. *Tex. Rep. Biol. Med.*, 35:145-149, 1977.

# A POSSIBLE FIFTH HUMAN ROTAVIRUS SEROTYPE AND AN UNUSUAL SEROTYPE 2, SUBGROUP II ROTAVIRUS STRAIN

Alexandre C. Linhares  
 Joana D'Arc P. Mascarenhas  
 Yvone B. Gabbay  
 Ronaldo B. de Freitas

Instituto Evandro Chagas  
 Fundação Serviços de Saúde Pública  
 Av. Almirante Barroso, 492  
 66050 Belém Pará, Brasil

## Resumo

Uma cepa de rotavírus, obtida de criança diarreica com 22 meses de idade, não reagiu com anticorpos monoclonais para os quatro sorotipos desse agente, emergindo como um possível novo sorotipo. Essa amostra se caracterizou por pertencer ao subgrupo II, exibindo perfil genômico, por eletroforese em gel de poliacrilamida, tipicamente longo. Detectou-se, ainda, outra amostra de rotavírus, oriunda de criança com 19 meses de idade, assintomática, com características sorológicas que a classificaram como sorotíp 2, subgrupo II, também a partir da análise com os anticorpos monoclonais. Não se obtiveram padrões de eletroforese nucleica suficientemente nítidos, bem como não se logrou a replicação vírica dessa cepa em células da linhagem "MA 104", quer a partir da simples suspensão de fezes, quer após efetuada a purificação em gradiente de cloreto de césio. Ambos os achados acima referidos decorreram de estudo longitudinal envolvendo 88 crianças, habitantes da área periférica de Belém, observadas desde o seu nascimento até os três anos de idade.

## Introduction

Rotaviruses have been found to be major enteropathogens throughout the world, affecting mainly infants and young children (5, 8). Rotavirus diarrhoea is of particular importance in developing countries, where malnutrition and severe dehydration account for a highly fatality-rate per year (7).

To date, four human rotavirus serotypes and two subgroups (19) have been described. The determination of both serotypes and subgroups has been achieved by using different techniques and there is an established correlation between serotypes and subgroups of human rotaviruses (4, 11, 16, 20).

In this report we record two unusual findings made during a longitudinal community-based study carried out in Belém, Para, Brazil, aimed at studying the epidemiology and clinical aspects of rotavirus infections from birth to three years of age (12).

## Material and Methods

Our study involved 88 children living in the peripheral area of Belém, Northern Brazil, in general under very poor sanitation conditions. They were followed up from birth to three years of age and faecal samples were obtained fortnightly or whenever symptoms of diarrhoea were present.

Faecal samples were tested for the presence of rotavirus antigen by using the World Health Organization (WHO)'s enzyme-linked immunosorbent assay kit supplied by the Regional Virus Laboratory, East Birmingham Hospital, Birmingham, England (3). The rotavirus-positive samples were routinely sent to the Birmingham WHO Centre for both serotyping and subgrouping by a newly modified assay of high sensitivity and specificity, described by Beards, G.M. (2).

With the purpose of confirming subgroups, the analysis of rotavirus RNA by polyacrylamide gel electrophoresis was carried out, in Belem, essentially as described by Rodger & Col. (14). Briefly, nucleic acid was disrupted with sodium dodecyl sulphate and deproteinized with phenol. Extracted RNA was electrophoresed through a 7.5% polyacrylamide slab gel (dimensions: 20 x 18.5 x 0.15cm), under an electrical current of 35mA, for 4 to 6 hours. Staining of the gels was performed with silver nitrate, by the method of Herring & Col. (10). Strains showing long patterns were classified as subgroup II; short patterns would be correlated with subgroup I. Previously subgrouped strains with both short and long RNA profiles were used as controls.

All diarrhoeic samples within the longitudinal study were also examined for the presence of enteropathogens other than rotaviruses such as: enteroviruses, adenoviruses, bacteria, protozoa and helminths.

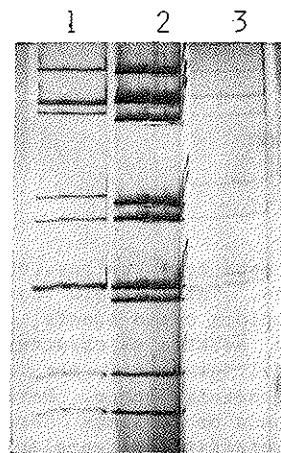
## Results

In the context of a longitudinal study carried out in Belem area (12), sixty-one rotavirus strains were detected, of which two showed unusual characteristics: firstly, a rotavirus that failed to react with the four serotype-specific monoclonal antibodies, and, secondly, a strain belonging to serotype 2, subgroup II.

The strain which did not react with any of the serotype-specific monoclonal antibodies was recovered from stools of a 22 month-old diarrhoeic child. This was the only episode of diarrhoea in his first three years of life. His illness lasted four days typified by:

**Figure 1 - Electrophoretic profile of RNA of the possible fifth human rotavirus serotype.**

Symbols: 1 = Possible fifth serotype; 2 = Subgroup II (Control); 3 = Subgroup I (Control).



aqueous diarrhoea with several evacuations per day, abdominal pain, low grade fever and mild dehydration.

According to the electrophoresis of RNA, which gave a long pattern with comigration of bands 7, 8 and 9 (Figure 1), and by using subgroup specific monoclonal antibodies, the possible new rotavirus serotype belongs to subgroup II. The conventional classification (19) correlates this subgroup with serotypes 1, 3 and 4.

The unusual rotavirus strain belonging to serotype 2, subgroup II was obtained from a 19-month old non-diarrhoeic child, who suffered no rotavirus diarrhoea during his first three years of life. Electrophoresing through polyacrylamide gel gave no clear RNA profile for this strain.

## Discussion

From our current knowledge of rotavirus infection, both findings

reported here are very unusual. We conclude that from its failure to react with the existing 4 serotype-specific antibodies, the strain from the 22 month-old, diarrhoeic child probably represent a new, 5th serotype, which belongs to subgroup II. Other authors (13) have also reported the occurrence of a fifth human rotavirus serotype. Taniguchi & Col. (15) have reported rotavirus-positive stools which could not be directly serotyped by serotype-specific monoclonal antibody ELISA tests. The failure of serotype-specific monoclonal antibodies to identify the serotype-specificity of field strains may be due to the existence of several "monotypes" within a serotype. Strains which lack such reactivities, like ours, should therefore be considered possible new serotypes. Further studies, including cross-neutralization assays, need to be done to insure that the strain is truly a new serotype.

The possible new serotype discussed here was detected in a child suffering from gastrointestinal illness. This rotavirus strain was detected in the absence of any other potential enteropathogens in the same faecal specimen. This finding rises concern regarding the production of an effective rotavirus vaccine, for it is known that the available vaccines only deal with the conventional 1, 2, 3 and 4 serotypes (6). It seems, however, that our proposed fifth serotype is uncommon, as judged by its detection only once during our three-year longitudinal survey.

In spite of differences noted between the genomic profiles of both our proposed new serotype and the subgroup II control particularly with respect to bands 7, 8 and 9-, subgroup can be assigned to our possible fifth serotype on the basis of electrophoretic migration of bands 10 and 11 and, of course, the specific reaction with monoclonal antibodies.

The rotavirus strain belonging to serotype 2, subgroup II, reported here, was not associated with gastrointestinal symptoms. Attempts to grow this strain in tissue culture by methods previously described (17), were unsuccessful, even after virus purification through caesium chloride gradient (1). Attempts to cultivate the

possible fifth rotavirus serotype, described here, were not made yet.

Unusual rotavirus strains have been experimentally produced by other authors (9, 18), including one which possesses "short" RNA pattern and belongs to serotype 2, subgroup II. The occurrence of unusual strains is believed to be a result of genetic reassortment involving two rotavirus strains with heterologous serological and genetic characteristics. In the situation described here we can assume that reassortment took place under natural conditions.

With current interest in the production of anti-rotavirus vaccines, further and broader studies are indicated to establish whether or not the two strains discussed here are of epidemiological importance.

#### Summary

A rotavirus strain obtained from a 22-month old diarrhoeic child did not react with any of the four serotype-specific monoclonal antibodies, emerging as a possible fifth serotype. It belongs to subgroup II and the electrophoresis of its RNA yielded a typical long pattern profile. In addition, another rotavirus strain, from a 19-month old, non-diarrhoeic child, was found to belong to serotype 2, subgroup II, as determined by using group A monoclonal antibodies. No clear genomic profile was obtained by electrophoresis of its RNA, and attempts to grow the latter virus in MA-104 cells - either as crude suspension or after purification through caesium chloride gradient - were unsuccessful. Both findings were obtained during a longitudinal study involving 88 children who were followed up from birth to the age of three years, in the area of Belém, Pará, Brazil.

#### Acknowledgements

This work was supported by a grant from the World Health Organization. Control of Diarrhoeal Diseases Programme. We are indebted to Drs. T.H. Flewett and G.M. Beards, Regional Virus Laboratory, East Birmingham Hospital, Birmingham, England, for carrying out both serotyping and subgrouping. Thanks are also due to Mrs. Gladys Marins and Maria da Conceição Chagas for assistance in the manuscript.

## References

1. Beards, G.M. - A method for the purification of rotaviruses and adenoviruses from faeces. *J. Virol. Methods*, 4:343-352, 1982
2. Beards, G.M. - Serotyping of rotavirus by NAOP-enhanced enzyme-linked immunoassay. *J. Virol. Methods*, 18:77-85, 1987.
3. Beards, G.M.; Campbell, A.D.; Cottrell, N.R.; Peiris, J.S.M.; Rees, N.; Sanders, R.C.; Shirley, J.A.; Wood, H.C. & Flewett, T.H. - Enzyme-linked immunosorbent assay based on polyclonal and monoclonal antibodies for rotavirus detection. *J. Clin. Microbiol.*, 19:248-254, 1984.
4. Beards, G.M.; Pilfold, J.N.; Thouless, M.E. & Flewett, T.H. - Rotavirus serotypes by serum neutralization. *J. Med. Virol.*, 5:231-237, 1980.
5. Bishop, R.F. - Epidemiology of diarrhoeal disease caused by rotavirus. In: Holmgren, J.; Lindberg, A. & Mollby, R. (Eds.). Development of vaccines and drugs against diarrhea. 11th Nobel Conference, Stockholm, P. 158-170, 1985.
6. Black, R.E. & Lanata, C. - Development of rotavirus vaccines. In Press.
7. De Soyza, I. & Feachem, R.G. - Interventions for the control of diarrhoeal diseases among young children: rotavirus and cholera immunization. *Bull. WHO*, 63:569-583, 1985.
8. Flewett, T.H. & Woode, G.N. - The rotavirus. Brief review. *Arch. Virol.*, 57:1-23, 1978.
9. Garbarg-Chenon, A.; Briocout, F. & Nicolas, J.C. - Serological characterization of human reassortant rotaviruses. *J. Virol.*, 59:510-513, 1986.
10. Hering, A.J.; Inglis, N.F.; Ojeh, C.K.; Snodgrass, D.R. & Menzies, D. - Rapid diagnosis of rotavirus infection of viral nucleic acid in silver stained polyacrylamide gel. *J. Clin. Microbiol.*, 21:425-430, 1982.
11. Kapikian, A.Z.; Cline, W.L.; Greenberg, H.B.; Wyatt, R.G.; Kalica, A.R.; Banks, C.E.; James Jr., H.D.; Flores, J. & Chanock, R.M. - Antigenic characterization of human and animal rotaviruses by immune adherence hemagglutination assay (IAHA): evidence for distinctness of IAHA and neutralization antigens. *Infect. Immun.*, 33:415-425, 1981.
12. Linhares, A.C.; Gabbay, Y.B.; Freitas, R.B.; Travassos da Rosa, E.S.; Mascarenhas, J.D.P. & Loureiro, E.C.B. - Longitudinal study of rotavirus infections among children from Belém, Brazil. *Epidem. Inf.*, 102:129-145, 1989.
13. Matsuno, S.; Hasegawa, A.; Mukoyama, A. & Inouye, S. - A candidate for a new serotype of human rotavirus. *J. Virol.*, 54:623-624, 1985.
14. Rodger, S.M.; Bishop, R.F.; Birch, C.; McLean, B. & Holmes, I.H. - Molecular epidemiology of human rotavirus in Melbourne, Australia, from 1973 to 1979, as determined by electrophoresis of genome ribonucleic acid. *J. Clin. Microbiol.*, 13:272-278, 1981.
15. Taniguchi, K.; Urasawa, T.; Morita, Y.; Greenberg, H.B. & Urasawa, S. - Direct serotyping of human rotavirus in stools by an enzyme-linked immunosorbent assay using serotype 1-2-, 3-, and 4-specific monoclonal antibodies to VP 7. *J. Infect. Dis.*, 155:1159-1166, 1987.
16. Thouless, M.E.; Bryden, A.S.; Flewett, T.H.; Woode, G.N.; Bridger, J.C.; Snodgrass, D.R. & Herring, J.A. - Serological relationships between rotaviruses from different species as studied by complement fixation and neutralization. *Arch. Virol.*, 53:287-294, 1977.
17. Urasawa, T.; Urasawa, S. & Taniguchi, K. - Sequential passages of human rotaviruses in MA 104 cells. *Microbiol. Immunol.*, 25:1025-1035, 1981.
18. Urasawa, T.; Urasawa, S. & Taniguchi, K. - Genetic reassortment between two human rotaviruses having different serotype and subgroup specificities. *J. gen. Virol.*, 67:1551-1559, 1986.
19. World Health Organization - Nomenclature of human rotaviruses designation of subgroups and serotypes. *Bull. WHO*, 62:501-503, 1984.
20. Yolken, R.H.; Wyatt, R.G.; Zissis, G.; Brandt, C.D.; Rodriguez, W.H.; Kim, H.W.; Parrott, R.H.; Urrutia, J.J.; Mata, L.; Greenberg, H.B.; Kapikian, A.Z. & Chanock, R.M. - Epidemiology of human rotavirus types 1 and 2 as studied by enzyme-linked immunosorbent assay. *N. Engl. J. Med.*, 299:1156-1161, 1978.

# ATIVIDADE E ENERGIA DE ATIVAÇÃO DA AMILOGLICOSIDASE NA FORMA SOLÚVEL E IMOBILIZADA

Gisella Maria Zanin  
& Flávio Faria de Moraes

Universidade Estadual de Maringá  
Deptº de Engenharia Química  
Caixa Postal 331  
87001 Maringá PR, Brasil

## Resumo

A enzima amiloglicosidase, AMG da Novo Industri S/A, foi caracterizada na forma solúvel e immobilizada em sílica macroporosa de porosidade controlada. A reação estudada foi a sacarificação de uma solução de amido de mandioca, 30% p/v, liquefeito com  $\alpha$ -amilase. As faixas de temperatura e pH cobertas foram respectivamente, 35-80° C e  $1 \leq \text{pH} \leq 7$ . A enzima foi immobilizada pelo método da ligação covalente, utilizando  $\gamma$ -aminopropiltriethoxsilano e glutaraldeído. A energia de ativação da enzima livre e immobilizada foi praticamente idêntica: 13,474 cal/gmol e variou menos de 1% para diferentes pHs. Para pH = 4,5 a atividade específica da enzima immobilizada foi de 90,6% da obtida com enzima livre, sendo 120,5 U/g de suporte e 29,25 U/mg de proteína fixada. Estes resultados representam um acréscimo significativo com relação a trabalhos anteriores do mesmo grupo (12-14).

## Introdução

As principais vantagens da utilização de enzimas immobilizadas em processos industriais são (3, 8, 9, 12):

- a) redução do consumo de enzimas, uma vez que na forma immobilizada estas são usadas por um longo período no reator, ao invés de serem descartadas após a reação como acontece no caso da enzima solúvel;
- b) facilidade de operar o processo na forma contínua com reatores do tipo leito fixo, ou fluidizado;
- c) tornar possível utilizar uma concentração enzimática por volume do reator, muito superior ao caso da enzima solúvel, e por isso alcançar-se altas taxas de conversão com reduzido tempo de residência;
- d) as vantagens a e b associadas permitem a redução do custo operacional do processo se o tempo de meia-vida da enzima immobilizada for suficientemente longo;
- e) a vantagem c conduz à utilização de reatores de volume bastante reduzido e com isso, alcançar-se economia no investimento de capital.

Tendo em vista a aplicação da tecnologia de immobilização de enzimas na hidrólise de biomassas que poderão atuar como fontes renováveis de combustíveis e produtos químicos, estabeleceu-se um programa de desenvolvimento de pesquisas que se inicia pela caracterização das enzimas na forma solúvel e immobilizada (13).

Neste trabalho estão relatados os resultados de determinação da atividade e energia de ativação da amiloglicosidase Novo, livre e immobilizada em sílica de porosidade controlada (SPC), em função da temperatura e pH, na reação de sacarificação de amido de mandioca a 30% p/v, pré-liquefeito com  $\alpha$ -amilase. Trabalhos anteriores (9, 12, 13, 14) exploraram outros suportes e/ou métodos de immobilização.

## Materiais e Métodos

**Atividade enzimática** - Uma unidade de atividade (U) corresponde à quantidade de enzima que libera um micromol de glicose por minuto nas condições de

reação - solução de amido liquefeito 30% p/v, temperatura e pH iguais a 45°C e 4,5, caso não especificados.

**Enzima e Suporte** - Amiloglicosidase de *Aspergillus niger*, fornecida pela NOVO (AMG 150L) com 130,5mg proteína/ml de solução de enzima. Sílica de porosidade controlada (SPC), fornecida pela Corning Glass Works, com diâmetro médio de poros de 375 Å e de partícula de 0,436mm.

**Substrato** - Fécula de mandioca (Copagro-PR) na concentração de 30% p/v e liquefeita com enzima Ternaryl 120L (NOVO) em presença de 70 ppm de CaCl<sub>2</sub>, pH 6,0 e temperatura de 95 - 100°C durante 1 hora. Após o resfriamento da solução o pH era ajustado com solução tampão de Clark-Lubs (pH = 1 e 2) e de McIlvaine (pH = 3 a 7) (10), para os ensaios de atividade em função de pH e temperatura.

**Imobilização da Enzima** A amiloglicosidase foi imobilizada em SPC empregando-se o método de Weetall que consiste das seguintes etapas: (a) silanizar o suporte com solução de γ-aminopropiltrietoxilano a 0,5% v/v durante 3 h a 75°C; (b) lavar com água e secar a 105°C durante 15 h; (c) ativar com solução de glutaraldeído a 2,5% v/v, pH 7,0, durante 45 minutos a 20°C; (d) lavar com água; (e) contactar com uma solução de enzima podendo conter até 100mg proteína/g suporte, durante 15 h a 20°C; f) lavar a enzima imobilizada com água e estocar em solução tampão acetato de sódio 0,02M pH 4,5 a 4°C (15, 16).

**Metodologia experimental** - Os ensaios de atividade em função do pH e da temperatura, para a enzima livre, foram conduzidos em tubo de ensaio onde colocava-se 1ml da solução de amido a 30% p/v no pH de teste. Após atingir o equilíbrio térmico com o banho, adicionava-se 0,5ml de enzima diluída 1:500, agitava-se e deixava-se incubar pelo tempo apresentado abaixo. A inativação da enzima era feita mediante fervura em banho-maria durante 10 minutos. Estes tempos foram selecionados de modo a se ter uma relação linear entre a glicose formada e o tempo, visando reduzir o efeito da inibição pelo produto da reação. Desta forma a reação foi conduzida dentro do critério estabelecido pelo método das velocidades iniciais (4).

	Temperatura (°C)	35	40	45	50	55	60	65
70	75	80						

	Tempo incubação (min)	180	150	120	90
60	20	15	10	5	5

A atividade específica em função do pH e temperatura para a enzima imobilizada, foi determinada pelo método das velocidades iniciais (4, 5), utilizando-se como substrato uma solução de amido liquefeito a 30% p/v. Pesava-se 0,5g (peso seco) de EI em uma cesta de tela e esta era imersa em um reator agitado contendo 50ml de substrato. Amostras de 0,5ml eram retiradas em intervalos de tempo regulares; adicionadas em 4,5ml de água, fervidas durante 10 minutos, resfriadas à temperatura ambiente e mantidas a 4°C até dosagem da glicose formada na reação. Esta, foi determinada pelo método da orto-toluidina (2), enquanto a proteína foi dosada pelo método de Lowry (6), sendo determinada a partir da diferença entre a quantidade de proteína presente na solução original antes da imobilização, e a proteína presente na solução após a imobilização acrescida da proteína presente na água de lavagem do suporte.

Foram ensaiados os seguintes valores de pH: 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 4,5; 5,0; 6,0 e 7,0; e as temperaturas de 35 °C a 75°C com intervalo de 5°C.

## Resultados

Os resultados dos ensaios de atividade específica em função do pH e da temperatura para as enzimas livre e imobilizada encontram-se, respectivamente nas Figuras 1 e 2. Na Figura 3 os dados para pH = 4,5 são plotados na forma da equação de Arrhenius.

## Discussão

A máxima atividade específica para a enzima livre encontra-se na faixa de pH 4,0-4,5, em praticamente todas as temperaturas analisadas (Figura 1). Para a enzima imobilizada o pH ótimo é 4,5 para toda a faixa de temperaturas ensaiadas. (Figura 2). Estes resultados mostram um pequeno deslocamento do pH

Figura 1 - Atividade específica em função de pH e temperatura. Enzima: Amiloglicosidase NOVO - Solúvel.  
Substrato: Solução de amido liquefeito com  $\alpha$ -amilase, 30% p/v.

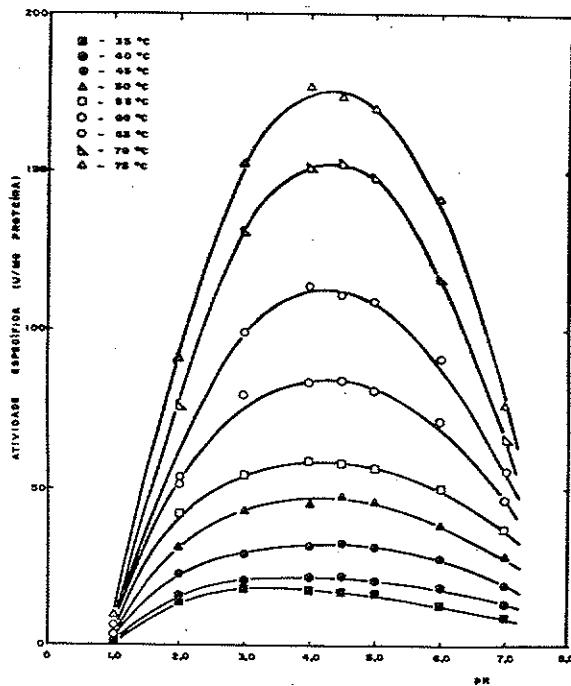


Figura 2 - Atividade específica em função de pH e temperatura. Enzima: Amiloglicosidase NOVO imobilizada em sílica de porosidade controlada. Substrato: Solução de amido liquefeito com  $\alpha$ -amilase, 30% p/v.

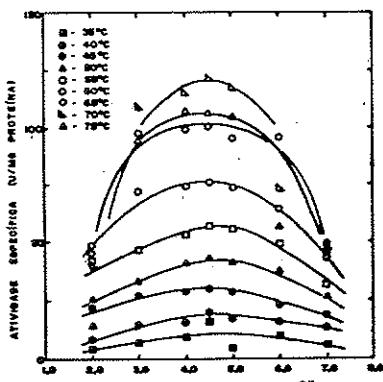
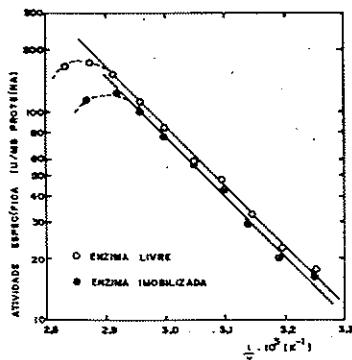


Figura 3 - Gráfico de Arrhenius: Atividade específica em função do inverso da temperatura absoluta. Enzima: Amiloglicosidase NOVO. Substrato: Solução de amido liquefeito com  $\alpha$ -amilase 30% p/v, pH 4,5.



ótimo da enzima livre para a imobilizada.

A atividade específica da enzima livre foi de 32,3 U/mg enquanto a enzima imobilizada apresentou uma atividade de 120,5 U/g de suporte; atividade específica de 29,25 U/mg de proteína e 4,12mg de proteína fixada/g de suporte.

Embora não diretamente comparáveis com os trabalhos anteriores (12 a 14), a atividade de 120,5 U/g de suporte, representa um acréscimo significativo na atividade enzimática obtida por grama de suporte, que é devido às melhores características da estrutura porosa do suporte, à maior quantidade de proteína fixada por grama de suporte e à maior concentração da solução de amido. No entanto, a atividade obtida a 60°C que é de 311,5 U/g de suporte ainda é da ordem de 10% da obtida por Weetall & Col. (11), que são provavelmente os maiores valores já publicados, havendo imobilizado 112mg de enzima/g de suporte, o que explica a maior atividade obtida.

A equação de Arrhenius ajustada aos pontos experimentais da Figura 3 permite a determinação da energia de ativação (cal/mol), para a enzima solúvel e imobilizada, que resultam praticamente idênticas:

$$\text{Atividade específica (AMG solúvel)} = 5,81 \times 10^{10} \exp(-13.474/RT)$$

$$\text{Atividade específica (AMG imobilizada)} = 5,27 \times 10^{10} \exp(-13.472/RT)$$

Logo, para a faixa de temperatura de 35 a 70°C, estas equações indicam que a retenção de atividade da enzima imobilizada é de 90,6% da enzima livre, nas condições de teste. Estes valores de energia de ativação estão de acordo com aqueles encontrados na literatura (1 e 7).

A equação de Arrhenius ajustada para outros pHs (3 e 6) leva a valores de energia de ativação que diferem de menos de 1% do valor acima (16). As equações ajustadas permitem calcular a atividade enzimática para qualquer temperatura intermediária, abaixo de 70 °C. Acima de 70°C a amiloglicosidase já começa a sofrer desnaturação térmica (Figura 3).

O fato de se obter praticamente o mesmo valor de energia de ativação para a enzima livre e imobilizada, indica que para a concentração testada não se observa limitação da velocidade de

reação por efeitos de transferência de massa (8, p.170).

### Summary

### *Activity and energy of activation of soluble and immobilized amyloglucosidase*

Amyloglucosidase, AMG from Novo Industri S/A, has been characterized in soluble form and immobilized in macroporous controlled pore silica. The reaction studied was the saccharification of a 30% w/v solution of  $\alpha$ -amylase liquefied cassava starch. The range of temperature and pH covered were respectively, 35-80°C and 1 ≤ pH ≤ 7. The enzyme was immobilized by the covalent attachment method using  $\gamma$ -aminopropyltriethoxysilane and glutaraldehyde. The free and immobilized enzyme shown practically identical energy of activation: 13,474 cal/gmol, which varied less than 1% for different pHs. For pH = 4,5 the immobilized enzyme activity averaged 90,6% of the free enzyme, giving 120,5 U/g of support and 29,25 U/mg of fixed protein. These values represent a valuable gain over previous results by the same authors (12-14).

### Agradecimentos

Os autores agradecem ao apoio financeiro da FINEP, do CONCITEC e da UEM, bem como os materiais cedidos pela Novo, Corning Glass Works e COPAGRA, que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

### Referências Bibliográficas

- Cabral, J.M.S. - Estudos de imobilização de enzimas pelo método dos metais de transição - Tese de Ph.D., Instituto Superior Técnico de Lisboa, p.327, 1982.
- Cooper, G.R. & McDaniel, V. - The determination of glucose by the Ortho-Toluidine Method - Clin. Chem., 6:159-170, 1970.
- Daniels, M.J. - Industrial Operation of Immobilised Enzymes - Anais do II Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas, Maringá, 10 - 13 de

- dezembro , vol. 1, 167-177, 1985.
- 4.Dixon, M. & Webb, E.C. - Enzymes, 3rd. ed., London, Longman Group Limited, 1979.
- 5.Hawcroft, D. - Diagnostic Enzymology - Analytical Chemistry by Open Learning - James, A.M. ed., London, John Wiley & Sons, 1987.
- 6.Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. & Randall, R.J. - Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem., 193:265-275, 1975.
- 7.Marc, A. - Cinétique et Modelisation de Reacteurs à Glucoamylase Soluble et Immobilisée, Tese Ph.D., INSA, Nancy, p.56, 1985.
- 8.Messing, R.A. - Immobilized Enzymes for Industrial Reactors. New York, Academic Press, 1975.
- 9.Moraes, F.F. de. & Zanin, G.M. - Aplicação de enzimas imobilizadas na hidrólise do amido e celulose. Anais do II Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas, Maringá, 10-13 de dezembro, vol. 1, 132-166, 1985.
- 10.Morita, T. & Assumpção, R.M.V. - Manual de soluções, Reagentes e Solventes - Padronização, Preparação, Purificação. 2ª edição, Editora Edgard Blucher Ltda., 1972.
- 11.Weatall, H.H.; Vann, W.P.; Pitcher, Jr., W.H.; Lee, D.D.; Lee, Y.Y. & Tsao, G.T. - Scale-up Studies on Immobilized, Purified Glucoamylase, Covalently Coupled to Porous Ceramic Support. In: "Methods in Enzymology" - vol. 44 - Immobilized Enzymes", Ed. K. Mosbach, Academic Press, New York, 776-792, 1976.
- 12.Zanin, G.M.; Trintim, R.D. & Moraes, F.F. de. - Imobilização de Enzima em Microesferas de Vidro. Anais do 1º Seminário de Catálise, IBP, Rio de Janeiro, 4-5 de junho, p.116-130, 1981.
- 13.Zanin, G.M. & Moraes, F.F. de. - Amiloglicosidase Imobilizada em Suportes Inorgânicos: Preparação e Estabilidade Operacional em Microrreator de Leito Fluidizado. Rev. Brasileira de Engenharia Química, 7(1).47-58, 1983.
- 14.Zanin, G.M.; Kambara, L.M. e Moraes, F.F. de. - Estudos hidrodinâmicos e de Estabilidade Operacional em Microrreator de Leito Fluidizado para Amiloglicosidase Imobilizada em Sílica - Gel Macroporosa. Anais do 2º Seminário de Catálise, IBP, São Paulo, 18-19 de agosto, p.319-333, 1983.
- 15.Zanin, G.M. & Moraes, F.F. de - Starch Saccharification in an Immobilized Enzyme Fluidized Bed Reactor II - Conversion Tests - 8th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, Gatlinburg, USA, 1986 e III Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas, Maringá, 7-11/dezembro/1987 (Anais em edição).
- 16.Zanin, G.M. - Sacarificação de Amido em Reator de Leito Fluidizado com Enzima Amiloglicosidase Imobilizada. Tese de Doutorado, UNICAMP, 1989.

Recebido para publicação em 28/09/88

# INFLUÊNCIA DA TAXA DE DILUIÇÃO SOBRE A PRODUTIVIDADE E A EFICIÊNCIA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA CONTÍNUA COM *ZYMOMONAS MOBILIS*

Evandir Gonçalves de Oliveira

IAA/PLANALSUCAR

57100 Rio Largo AL, Brasil

& José Otamar F. de Moraes

Deptº de Antibióticos UFPE

50000 Recife PE, Brasil

## Resumo

Ensaios de fermentação alcoólica contínua com *Zymomonas mobilis* Z-1-81 mostraram que o melhor aproveitamento do substrato foi obtido com o sistema operando em regime permanente com taxa de diluição de  $0,095\text{h}^{-1}$ . Nestas condições, a eficiência de fermentação e produtividade em etanol foram respectivamente 77,5% e 3,71 g/l.h. Com taxa de diluição de  $0,206\text{h}^{-1}$  a produtividade foi 5,25 g/l.h., porém a eficiência de fermentação foi 49,5%.

## Introdução

Tradicionalmente, a indústria alcooleira, utiliza leveduras como agente da fermentação, entretanto, há outros microrganismos capazes de serem utilizados. Entre eles destacam-se as bactérias do gênero *Zymomonas*.

Em 1937, Sanchez-Marroquim, citados por Moraes (6), já afirmara ser *Zymomonas mobilis*, um promissor agente da fermentação alcoólica industrial. Mas o avanço das pesquisas nesse sentido só se deu a partir de 1979 por iniciativa de um grupo de pesquisadores australianos, com o desenvolvimento de fermentações em meios concentrados, visando o uso industrial dessas bactérias.

Rogers & Col. (9), obtiveram eficiências de fermentações em sistemas contínuo e por batelada, de até 97% utilizando *Z. mobilis* em meio semi-sintético, tendo a glicose como substrato limitante. Entretanto, quando se utiliza sacarose, muitas linhagens proporcionam rendimentos fermentativos significativamente baixos, tendo em vista a formação dos sub-produtos levana e/ou sorbitol. Viikari (12) desenvolveu fermentações em meio com 15% de sacarose utilizando a *Z. mobilis* VTT-E-78022; obteve rendimento de 75% e

constatou que cerca de 11% da sacarose foi destinada à produção de sorbitol e 10% à produção de levana.

Este trabalho teve sua parte experimental desenvolvida no Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Nele foi estudado o desempenho da linhagem *Zymomonas mobilis* Z-1-81 em sistema contínuo de fermentação utilizando sacarose como substrato limitante.

## Materiais e Métodos

**Microrganismos e condições de cultivo -**  
Foi utilizada *Z. mobilis* Z-1-81 cedida pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Sua conservação foi feita a temperatura de 5° C. Para as fermentações, e propagação do inóculo foi utilizado o meio de Schereder modificado (4) contendo por litro: açúcar cristal 100g; extrato de levedura 5,0g; fosfato monoácido de potássio 1,5g; sulfato de magnésio heptahidratado 0,5g. A esterilização foi feita a 120°C/15 min. com pH ajustado a 6,0 ± 0,1.

**Metodologia analítica -** Para quantificação celular, foi utilizado o

método que relaciona a medida de densidade ótica (expressa em absorbância) a 600nm das suspensões celulares com a concentração (g/l) determinada por peso seco (8). Foi obtida a seguinte correlação linear:  $A = 0,0148 + 1,6131X$  ( $A$  = absorbância;  $X$  = conc. celular), com  $r^2 = 0,99416$ . Para dosagens dos açúcares totais, foi empregado o método colorimétrico do ácido 3,5-dinitro salicílico (DNS) (2). A dosagem de etanol foi feita pelo método do dicromato (3).

**Condução dos experimentos** - As fermentações foram conduzidas em fermentador tipo "mistura completa" de fabricação New Brunswick Scientific Co. Inc., modelo FS-314 adaptado para operar continuamente. A cuba de fermentação com capacidade para 14l, operou com 10l de meio. As operações de alimentação e descarga do fermentador foram feitas por duas bombas marca Sigmamotor modelo T-6S. Para manutenção do volume constante do fermentador, foi adaptado um tubo em U conectado com a mangueira da bomba de descarga do meio. A operação contínua do fermentador foi precedida de uma fermentação em batelada, e a alimentação iniciada no final da fase exponencial de crescimento do microrganismo. As vazões de alimentação variaram de 0,48l/h a 2,06l/h.

#### Resultados e Discussão

A Figura 1 apresenta os dados relativos as concentrações de células, de etanol e de substrato residual para cada taxa de diluição com o sistema em equilíbrio.

Observa-se que para taxas de diluição variando de  $0,048h^{-1}$  a  $0,095h^{-1}$  a concentração celular também aumentou proporcionalmente, enquanto as concentrações de etanol e do substrato residual sofreram variações pouco significativas com a concentração do substrato mantendo-se em torno de 17,5g/l. Entretanto para taxas de diluição acima de  $0,095h^{-1}$ , esses valores foram significativamente alterados, havendo redução nas concentrações de células e de etanol e aumento na concentração do substrato residual. Essas tendências estão de acordo com as curvas teóricas, com

exceção para a curva de concentração celular, cuja anomalia poderá ser justificada pelo fenômeno denominado de desvio do quimiostato quando a fonte de carbono é o substrato limitante. Tendências semelhantes foram obtidas por diversos pesquisadores (1, 5, 7) com as linhagens *Z. mobilis* ZM4 e *Z. mobilis* ATCC 10988, utilizando sacarose, glicose ou frutose como substrato limitante, porém os diferentes teores de açúcar residual para iguais taxas de diluição deverão estar associados ao tipo de substrato que foi utilizado, como também as características de cada cepa.

A Figura 2 mostra as tendências relativas à conversão percentual do substrato, às eficiências das fermentações e as produtividades em etanol nos pontos de equilíbrio de cada taxa de diluição.

Observa-se que o máximo valor obtido da conversão percentual do substrato permaneceu praticamente constante até a taxa de diluição de  $0,095h^{-1}$ . Para taxas de diluição maiores, a conversão do substrato tende a cair progressivamente, proporcionando altos índices de substrato não metabolizado. Este comportamento é bastante lógico, pois é o tempo de contato que vai determinar as concentrações finais de equilíbrio. Tendências semelhantes foram observadas para as eficiências das fermentações, principalmente quando as taxas de diluição foram superiores a  $0,095h^{-1}$ . Pode-se ver que os melhores resultados, sob o ponto de vista de um melhor aproveitamento do substrato, foram obtidos nos pontos de equilíbrio das três menores taxas de diluição, destacando-se como ótimo o ponto de  $0,095h^{-1}$  que apresenta eficiência de fermentação 3,9% superior a correspondente a mais baixa taxa de diluição. Vale ressaltar que mesmo com a taxa de diluição em que a conversão percentual do substrato foi máxima, cerca de 17,5% do substrato não foi aparentemente utilizado pelo microrganismo. Entretanto, pode-se supor que parte deste açúcar residual estaria na forma de levana, que sofreria hidrólise durante os tratamentos das amostras para inversão da sacarose visando a determinação dos açúcares totais.

Com relação à produtividade em etanol, verificou-se que esta foi

Figura 1 - Concentrações de células de *Zymomonas mobilis* Z-1-81, etanol e sacarose para diferentes taxas de diluição nos pontos de equilíbrio do quimiostato. Símbolos: O = Células; Δ = Etanol; □ = Sacarose; D = Taxa de diluição.

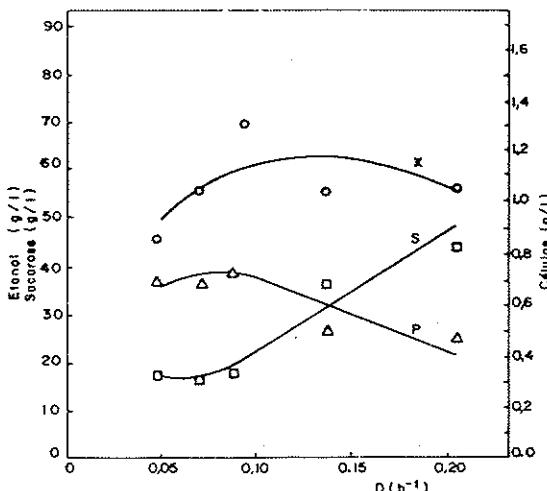
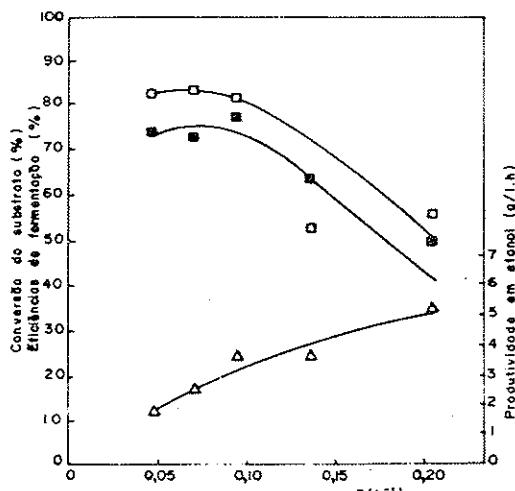


Figura 2 - Conversão percentual do substrato, eficiências das fermentações e produtividades em etanol para diferentes taxas de diluição nos pontos de equilíbrio do quimiostato.

Símbolos: □ = Conversão percentual do substrato -  $(S_0 - S_1)/S_0 \cdot 100$ ; ○ = Eficiência de fermentação; Δ = Produtividade em etanol (g/l.h).



crescente com o aumento da taxa de diluição. Entretanto quando a taxa de diluição foi máxima, cuja produtividade foi de 5,21g/l.h., a eficiência de fermentação foi de apenas 49,5%, indicando que metade do substrato que alimenta o fermentador sai no efluente sem ser metabolizado.

Produtividades extremamente elevadas tem sido conseguidas em fermentações com *Z. mobilis* com reciclo do microrganismo. Rogers & Col. (10) obtiveram produtividade de , até 120g/l.h, utilizando a *Z. mobilis* ATCC 10988 e glicose como substrato limitante. Esses autores conseguiram operar o fermentador com uma taxa de diluição de  $2,7\text{h}^{-1}$ , mantendo a concentração do açúcar residual próximo a zero. Sem reciclo do microrganismo a produtividade máxima alcançada foi de 8g/l.h.

Utilizando *Saccharomyces cerevisiae* em meio de melaço com 151,2g/l de açúcares totais, Vaqueiro (11) obteve em fermentador tubular produtividade de 13,5g/l.h, conversão percentual de substrato de 93,7% quando operou com taxa de diluição de  $0,1483\text{h}^{-1}$ . Maiores

produtividades foram conseguidas, porém a conversão percentual do substrato foi reduzida proporcionalmente com o aumento da taxa de diluição. Vale salientar que a população celular do meio foi mantida em torno de  $10^9$  células/ml por adição contínua de uma suspensão celular no fermentador.

Neste trabalho, os melhores parâmetros sob o ponto de vista de viabilidade do processo, foram conseguidos conseguidos com taxas de diluição de  $0,095\text{h}^{-1}$ , que proporcionou eficiência de fermentação de 77,5% e produtividade de 3,71g/l.h. Estes dados indicam, sob o ponto de vista de um melhor aproveitamento do substrato para conversão em etanol que o desempenho da *Z. mobilis* Z-1-81 foi inferior ao que se conhece da literatura, quando se utiliza leveduras como agente da fermentação. Indicam ainda ser inferior a outras linhagens de *Zymomonas* quando se utiliza glicose ou frutose como substrato limitante. Isto pode estar associado ao fato de ser *Z. mobilis* Z-1-81 uma provável produtora dos subprodutos levana e/ou sorbitol,

quando utiliza-se sacarose como substrato limitante.

### Summary

#### Influence of dilution rate on the productivity and yield of continuous alcoholic fermentation with *Zymomonas mobilis*

Continuous alcoholic fermentation trials with *Zymomonas mobilis* Z-1-81 indicated that the best utilization of the substrate was showed using a dilution rate of  $0,095\text{h}^{-1}$  in the steady state. In these conditions the fermentation yield and ethanol productivity were 77,5% and 3,71g/l.h., respectively. With dilution rate of the  $0,206\text{h}^{-1}$  the productivity was 5,25g/l.h., but fermentation yield was 49,5%.

### Agradecimentos

Aos professores Carlos Edison Lopes (UFPE) e Nei Pereira Júnior (UFRJ) por suas valiosas colaborações durante a realização deste trabalho.

### Referências Bibliográficas

- 1.Beyeler, W.; Rogers, P.L. & Fiechter, A. - A simple technique for the direct determination of maintenance energy coefficient; in example with *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 19:277-80, 1984.
- 2.Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Reber, P.A. & Smith, F. - Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical chemistry, Washington, 28(3):350-6, 1956.
- 3.Guymon, J.F. & Crowell, E.A. - Journal of the Association of Official Agricultural Chemists, Baltimore, 42:393, 1959.
- 4.Laudrin-Seillary, J.; Torrijos, M.; Uribelarrea, J.L. & Goma, G. - Alcoholic fermentation by *Zymomonas mobilis* efect of initial substrate on phisiological parametrs. Biotechnology Letters, 6(7):477-80, 1984.
- 5.Lee, K.V.; Skotnicki, M.L.; Tribe, D.E. & Rogers, P.L. - Kinetic studies on a high productive strain of *Zymomonas mobilis*. Biotechnology Letters, 2(3):339-44, 1980.
- 6.Morais, J.O.F. - *Zymomonas mobilis* e seu possível emprego como agente da fermentação alcoólica. Revista do Instituto de Antibióticos, Recife, 21(1/2):169-82, 1983.
- 7.Nipkow, E.; Beyeler, W. & Fiechter, A. - An Improved Synthetic medium for continuous cultivation of *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. and Biotechnol., 19:237-40, 1984.
- 8.Pelczar, M.; Reid, R. & Chan, E.C.S. - Microbiologia. São Paulo, McGraw-Hill, (Microbiologia, 1), 1981.
- 9.Rogers, P.L.; Lee, K.J. & Tribe, D.E. - Kinetics of alcohol production by *Zymomonas mobilis* at hygh sugar concentrations. Biotechnology Letters, 1:165-70, 1979.
- 10.Rogers, P.L.; Lee, K.J. & Tribe, D.E. - High productivity ethanol fermentations with *Zymomonas mobilis*. Process Biochemistry, 15:7-11, 1980.
- 11.Vaqueiro, M.L.R. - Fermentação alcoólica contínua em fermentador tubular. Rio de Janeiro, 84p. (mestrado - UFRJ - Escola de Química), 1981.
- 12.Viikari, L. - Formation of levana and sorbitol from sucrose by *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. and Biotechnol., 19:252-5, 1984.

Recebido para publicação em 07/11/88

## ESTUDO CINÉTICO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE AMIDO: INIBIÇÃO PELA GLICOSE

Raquel de Lima Camargo Giordano

Universidade Federal de São Carlos  
Deptº de Engenharia Química  
13560 São Carlos SP, Brasil

&amp; Willibaldo Schmidell

Escola Politécnica da USP  
Deptº de Engenharia Química  
Caixa Postal 61548  
05508 São Paulo SP, Brasil**Resumo**

Estudou-se o efeito da adição de glicose na cinética da hidrólise do amido, catalisada por glicoamilase ou amiloglicosidase ( $\alpha$ -D-(1,4) glican-glicohidrolase, EC 3.2.1.3). Determinaram-se, experimentalmente, as velocidades iniciais da reação para diferentes concentrações iniciais de amido e glicose, nas temperaturas de 60, 51, 40 e 30°C, mantendo-se constantes em todos os ensaios o pH 4,2 e a concentração de glicoamilase  $6,05 \times 10^5$  ml enzima/ml solução (atividade da enzima 3426UI a 55°C e pH 4,5). A análise dos resultados pelo método de Lineweaver-Burk não permitiu a identificação do modelo cinético da reação. Através do método de Dixon, verificou-se que a glicose é um inibidor competitivo da velocidade da reação. O ajuste de uma equação tipo Michaelis-Menten com inibição competitiva aos pontos experimentais - através de regressão não linear pelo método dos mínimos quadrados - permitiu a estimativa precisa dos parâmetros cinéticos da reação, com valores de  $K_i$  (constante de inibição) aumentando linearmente com a temperatura, na faixa estudada.

**Introdução**

A produção de xarope de glicose para fins alimentícios, através da hidrólise enzimática de amido, é, na maioria das vezes, a causa do interesse dos pesquisadores por esta reação. No Brasil, contudo, a importância estratégica do etanol - que pode ser produzido a partir de matérias-primas amiláceas hidrolisadas - vem revestir de maior interesse ainda o estudo da degradação enzimática de amido.

Encontram-se registrados na literatura vários estudos da hidrólise enzimática de amido (3, 4, 7, 8, 14) onde diversas tentativas de modelagem da cinética desta reação são feitas. Nesses trabalhos, de um modo geral, era assumido, como hipótese, que a degradação do amido, utilizando-se

glicoamilase, é inibida competitivamente pelo seu produto, glicose. Vallat & Col. (13) estudaram o efeito da glicose na cinética da hidrólise de maltodextrinas, concluindo pela não influência da glicose na velocidade da reação. Esse trabalho, contudo, é passível de críticas, pois, além de poucos resultados experimentais apresentados, suas conclusões foram obtidas utilizando-se a transformação linear de Lineweaver-Burk cuja pouca confiabilidade é afirmação comum de vários pesquisadores (1, 5, 6) que já a estudaram.

Pode-se observar que a inibição pelo produto é assunto ainda polêmico, fazendo-se necessários novos estudos para a obtenção de resultados definitivos, já que esta é uma etapa necessária à definição do modelo

cinético geral da reação. Objetiva-se, assim, neste trabalho, o estudo da influência da glicose na velocidade da hidrólise de amido, catalisada por glicoamilase ou amiloglicosidase ( $\alpha$ -D-(1,4) glican-glicohidrolase, EC 3.2.1.3).

#### Materiais e Métodos

**Materiais** - Foram utilizados amido solúvel da Merck S.A. Indústrias Químicas (Peso Molecular 29300) como substrato; glicoamilase de *A. oryzae*, da Sigma Chemical Company, com atividade de rótulo de 3426 U.I. (uma unidade libera 1 $\mu$ mol de glicose em 1 min, a pH 4,5 e temperatura de 55°C) e glicose P.A. do Laboratório Reagens.

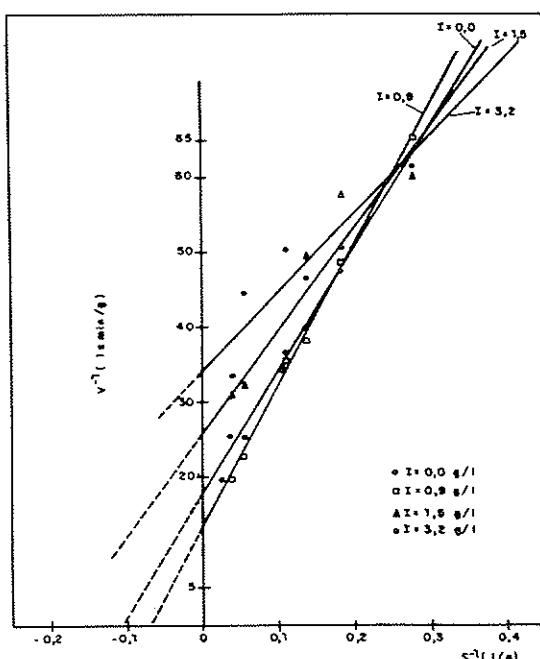
**Métodos Analíticos** - A concentração de glicose foi medida através do método enzimático da glicose-oxidase ( $\beta$ -D-glicose: oxigênio oxidoreduktase EC 1.1.3.4) (10), utilizando-se o kit 3395 da Merck (GOD-PAP).

**Determinação das Velocidades da reação** - As velocidades da reação foram determinadas pelo método das velocidades iniciais, fazendo-se regressão linear entre a concentração de glicose (produto) liberada pela reação e o tempo, utilizando-se o método dos mínimos quadrados. O coeficiente angular da reta ajustada aos pontos experimentais era a velocidade inicial da reação para uma determinada concentração inicial de substrato e de glicose inicialmente adicionada.

A reação ocorria em tubos de ensaio, colocados em banho termostático, nas temperaturas de 60°C, 51°C, 40°C e 30°C. O pH 4,2 (tampão acetato) e a concentração da enzima  $6,05 \times 10^{-5}$  ml enzima/ml solução (diluída em tampão acetato) foram mantidos constantes em todos os ensaios. As soluções de substrato foram preparadas a diferentes concentrações na faixa de 0,96g/l a 36,36g/l. A glicose era adicionada ao meio reacional de forma a se obter diferentes concentrações iniciais na faixa de 0,7g/l a 14,5g/l.

Cada tubo de ensaio continha 10ml de solução a determinadas concentrações iniciais de amido e glicose, correspondente a um tempo diferente de

Figura 1 - Gráfico de Lineweaver-Burk: inverso da velocidade inicial da reação ( $v^{-1}$ ) em função do inverso da concentração inicial de substrato ( $S^{-1}$ ), a diferentes concentrações iniciais de glicose (I). T = 51°C.



reação. Os tempos máximos de reação foram de 30 minutos (60°C) e 60 minutos (51, 40 e 30°C).

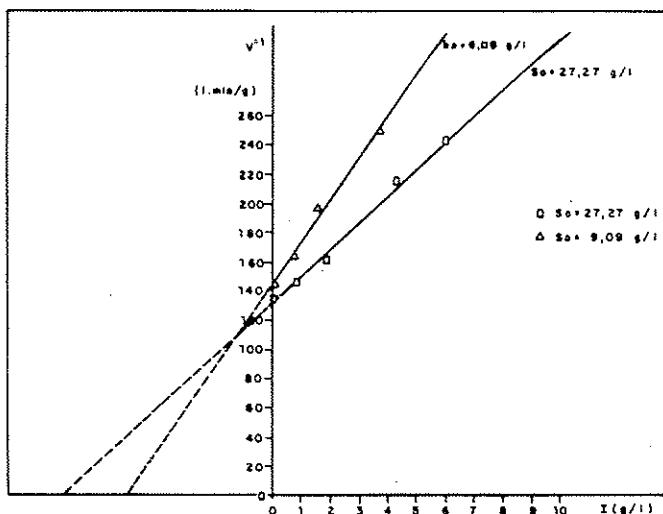
O volume de solução de enzima adicionada a cada tubo era de 0,5ml ou 1ml. A inativação era feita com adição de três gotas de NaOH 8N.

#### Resultados e Discussão

**Identificação do modelo matemático** - A partir dos valores das velocidades iniciais da reação, determinados em função das concentrações iniciais de substrato e glicose, observou-se qualitativamente que havia inibição da hidrólise de amido por seu produto, glicose.

Inicialmente, foi testado o método clássico de Lineweaver-Burk. A Figura 1 mostra os resultados obtidos com a aplicação deste às velocidades iniciais

Figura 2 - Gráfico de Dixon: inverso da velocidade inicial da reação ( $v^{-1}$ ) em função da concentração inicial de glicose (I), a diferentes concentrações iniciais de substrato ( $S_0$ ).  $T = 30^\circ\text{C}$ .



determinadas na temperatura de  $51^\circ\text{C}$ . Pode-se observar, através da Figura 1, que o cruzamento das retas é aleatório, não permitindo a identificação do modelo cinético de inibição. Resultados semelhantes foram obtidos nas temperaturas de  $60^\circ\text{C}$ ,  $40^\circ\text{C}$  e  $30^\circ\text{C}$ .

Pode-se observar também que há um aumento da dispersão dos pontos experimentais com o aumento da concentração de inibidor adicionado. Este é um problema conhecido em ensaios cinéticos de inibição pelo produto pois a determinação de pequenas quantidades de produto liberado pela reação na presença de quantidades iguais ou maiores de produto adicionado é extremamente difícil de ser executada com precisão.

O método de Lineweaver-Burk exige alta precisão dos resultados experimentais para se obterem, através dele, indicações confiáveis em estudos cinéticos - conforme demonstram os trabalhos de Atkins (1), Colquhoun (5) e Dowd e Riggs (6). Os resultados experimentais deste trabalho aparentemente não atingiram o grau de precisão necessário para a aplicação com sucesso do método de Lineweaver-Burk, explicando-se assim a

aleatoriedade observada.

Foi testado a seguir um outro método gráfico. A transformação linear de Dixon (11) foi escolhida. Neste método o inverso das velocidades iniciais são colocadas em gráfico em função da concentração de inibidor, tendo como parâmetro a concentração inicial de substrato. A região de cruzamento das retas indica o modelo cinético de inibição.

A Figura 2 mostra o gráfico de Dixon para a temperatura de  $30^\circ\text{C}$ . Pode-se observar, através dessa figura, uma indicação clara do modelo competitivo ( $V = V_{\max}S/[K_m(1+I/(K_i) + S)]$ ), tendo-se obtido resultados semelhantes para as outras temperaturas estudadas.

O método de Dixon, portanto, foi eficiente e a sua indicação está de acordo com os trabalhos disponíveis na literatura (3, 4, 7, 14). Ele não fornece, contudo, estimativas precisas dos parâmetros cinéticos.

Colquhoun (5), comparou métodos possíveis de serem utilizados na estimativa dos parâmetros cinéticos da equação de Michaelis-Menten e concluiu que os melhores valores eram os fornecidos pelo ajuste do modelo cinético aos pontos experimentais.

Figura 3 - Velocidades experimentais (símbolos) e velocidades previstas (curvas) em função da concentração de substrato ( $S$ ) para diferentes concentrações iniciais de glicose ( $I$ ). Ajuste ao modelo competitivo.  $T = 40^\circ\text{C}$ .

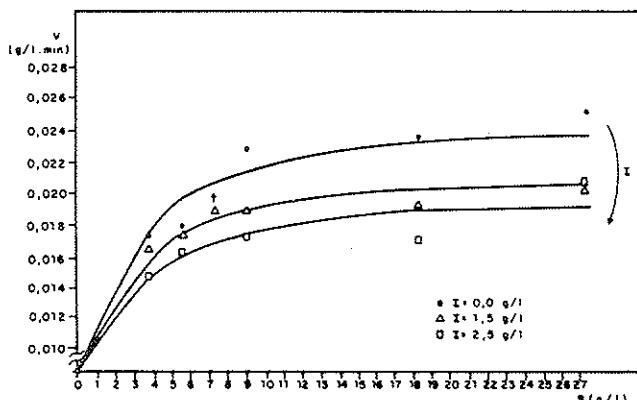


Tabela 1 - Parâmetros cinéticos fornecidos pelo ajuste do modelo competitivo aos pontos experimentais.

T (°C)	$V_{\max}$ (g/l·min)	$K_m$ (g/l)	$K_i$ (g/l)
60	0,0559	1,60	4,30
51	0,0546	6,56	2,42
40	0,0232	0,992	1,77
30	0,00832	0,501	0,364

Assim, baseando-se nesse trabalho, determinou-se os valores dos parâmetros cinéticos  $V_{\max}$ ,  $K_m$  e  $K_i$ , nas quatro temperaturas, através do ajuste do modelo competitivo aos pontos experimentais, utilizando-se o método dos mínimos quadrados não linear (10). Os ajustes, nas quatro temperaturas, analisados segundo os critérios apresentados por Mannervik (9), foram bons. A Figura 3 mostra um exemplo típico, para  $40^\circ\text{C}$ , e a Tabela 1 mostra os valores dos parâmetros nas quatro temperaturas.

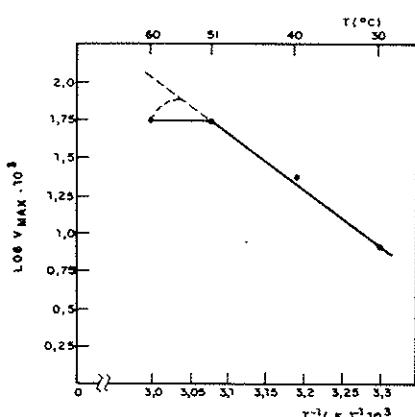
Esse método necessita também, como o de Lineweaver-Burk, de grande precisão experimental para ser utilizado para a identificação de modelo, pois a tentativa de ajuste de outros modelos cinéticos de inibição resultaram na aceitação também dos modelos acompetitivo ( $V = V_{\max} S / [K_m + S(1+I/K_i)]$ ) e não-competitivo ( $V = V_{\max} S / [K_m(1+I/K_i) + S(1+I/K_i)]$ ), segundo os mesmos critérios utilizados para o modelo competitivo. O uso de uma função discriminante, recomendada por Mannervik (9), mostrou que, nas faixas de concentração de substrato e de inibidor nas quais foram realizados os experimentos, este método não permite discernir qual o melhor entre os três mecanismos de reação, pois o erro

experimental é maior que a diferença entre os valores de velocidade previstos por estes modelos.

**Influência da temperatura** - Através da Tabela 1, que mostra os valores de  $V_{\max}$  em função da temperatura, pode-se verificar que a velocidade máxima da reação aumenta com a temperatura. A influência desta, segundo Arrhenius, foi também estudada e a Figura 4 mostra o gráfico de  $\log V_{\max}$  em função do inverso da temperatura. O valor da energia de ativação,  $E_a$ , obtido a partir do ajuste de uma reta aos pontos na faixa de  $30^\circ\text{C}$  a  $51^\circ\text{C}$ , foi de  $17732 \text{ cal.mol}^{-1}$ . A equação da reta ajustada é  $\log (V_{\max} \cdot 10^{-3}) = 13,776 - 3893,8 \cdot T^{-1}$ , com  $r$  (coeficiente de correlação linear) de 0,9995. No trecho de  $51^\circ\text{C}$  a  $60^\circ\text{C}$  verificou-se uma mudança na inclinação da reta, indicando uma possível inativação da enzima glicoamilase.

A influência da temperatura nos valores de  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten) pode ser vista na Tabela 1. Esse parâmetro cinético apresenta uma tendência de diminuição dos seus valores com o decréscimo da temperatura, salvo a  $51^\circ\text{C}$ , indicando um aumento da afinidade da enzima pelo substrato.

Figura 4 - Gráfico de arrhenius para a hidrólise de amido, catalisada por glicoamilase: logaritmo da velocidade máxima ( $\log V_{\text{máx}}$ ) em função do inverso da temperatura ( $T^{-1}$ ).

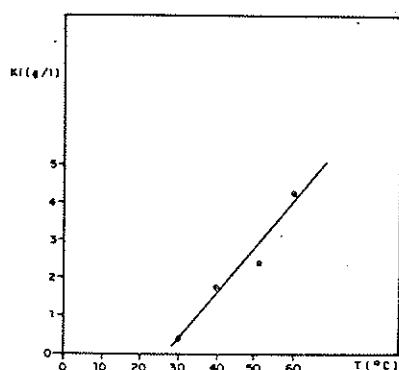


Os valores estimados para a constante de inibição,  $K_i$ , tendem a diminuir linearmente com o decréscimo da temperatura, indicando um aumento do efeito inibidor da glicose, conforme pode ser observado na Figura 5 e Tabela 1. Indícios do aumento da inibição com a diminuição da temperatura, nesta reação, já foram observados por Schmidell & Col. (12) ao estudarem a hidrólise da farinha de mandioca a 55°C e 30°C. Os valores disponíveis para  $K_i$ , na literatura (3, 4, 7), confirmam também este fato.

## Conclusões

- O método de Lineweaver-Burk não se revelou apropriado para estudos cinéticos de inibição pelo produto nas condições experimentais deste trabalho.
- O método de Dixon foi eficiente para a definição de modelos de inibição, mas impreciso para a determinação dos parâmetros cinéticos, para a reação estudada.
- O ajuste direto de um modelo matemático a pontos experimentais mostrou ser o método mais adequado, neste trabalho, para a determinação precisa dos parâmetros cinéticos de uma

Figura 5 - Constante de inibição ( $K_i$ ) em função da temperatura ( $T$ ), para a reação de hidrólise de amido, catalisada por glicoamilase.



equação de velocidade.

4. A hidrólise de amido, catalisada por glicoamilase é inibida competitivamente pelo produto da reação, glicose.

5. A temperatura exerce grande influência nos parâmetros cinéticos da hidrólise de amido, catalisada por glicoamilase. Na faixa de 30°C a 60°C, uma elevação da temperatura implica: no aumento da velocidade máxima da reação; na diminuição da afinidade da enzima pelo substrato, salvo a 51°C, e na diminuição linear do efeito inibidor da glicose.

6. O valor da energia de ativação para a hidrólise enzimática de amido, determinado segundo Arrhenius, é de 17732 cal/mol.

## Notação

$V$	- Velocidade inicial da reação (g/l.min).
$S$	- Concentração inicial de substrato-amido (g/l).
$I$	- Concentração inicial de inibidor-glicose (g/l).
$V_{\text{máx}}$	- Velocidade máxima da reação (g/l.min).
$K_m$	- Constante de Michaelis-Menten (g/l).
$K_i$	- Constante de inibição (g/l).
$E_a$	- Energia de ativação (cal/mol).
$r$	- Coeficiente de correlação do método dos mínimos quadrados lineares.

## Summary

### Kinetic study of starch enzymatic hydrolysis: glucose inhibition

In this work, the effect of glucose addition on the kinetics of starch hydrolysis catalyzed by glucoamylase or amyloglucosidase ( $\alpha$ -D-(1,4) glucan-glucohydrolase, EC 3.2.1.3) has been studied. Initial rates of the reaction, for different initial starch and glucose concentrations, have been determined experimentally at temperature of 60, 51, 40 and 30°C, keeping constant, in all cases, the pH 4.2 and glucoamylase concentration  $6.05 \times 10^5$  ml enzyme/ml solution (activity of enzyme 3426UI at 55 °C and pH 4.5). The analysis of the results using the Lineweaver-Burk method didn't allow the identification of the kinetic model of the reaction. Through the Dixon method it was observed that glucose is a competitive inhibitor of the starch hydrolysis reaction catalyzed by glucoamylase. The fitting of a Michaelis-Menten type equation with competitive inhibition - by non linear regression through the least square method to the experimental data, made possible the accurate determination of the kinetic parameters of this reaction, and the values of  $K_i$  increased linearly with temperature, in the range studied.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à EMBRAPA-PNPE, pelo apoio financeiro à execução deste trabalho.

## Referências Bibliográficas

- Atkins, G.L. & Nimmo, I.A. - A comparison of seven methods for fitting the Michaelis-Menten equation. *Biochem. J.*, 149:775-777, 1975.
- Barham, D. & Trinder, P. - An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase systems. *Analyst.*, 97(2):142-145, 1972.
- Beschkov, V.; Marc, A. & Engasser, J.M. - A kinetic model for the hydrolysis and synthesis of maltose, isomaltose and maltotriose by glucoamylase. *Biotechnol. Bioeng.*, 26(1):22-26, 1984.
- Caldwell, K.D.; Axén, R.; Bergwall, M. & Porath, J. - Immobilization of enzymes based on hydrophobic interaction. II - Preparation and properties of an amyloglucosidase adsorbate. *Biotechnol. Bioeng.*, 18:1589-1604, 1976.
- Colquhoun, D. - A comparison of estimators for a two parameters hyperbola. *Appl. Stat.*, 18:130-140, 1969.
- Dowd, J.E. & Riggs, D.S. - A comparison of estimates of Michaelis-Menten kinetic constants from various linear transformations. *J. Biol. Chemistry*, 240(2):863-869, 1965.
- Fujii, M. & Kawamura, Y. - Synergistic action of  $\alpha$ -amylase and a glucoamylase on hydrolysis of starch. *Biotechnol. Bioeng.*, 27(3):260-265, 1985.
- Kusonoki, K.; Kawakami, K.; Shiraishi, F.; Kato, K. & Mayumi, K. - A kinetic expression for hydrolysis of soluble starch by glucoamylase. *Biotechnol. Bioeng.*, 24:347-354, 1982.
- Mannervik, B. - Regression analysis, experimental error, and statistical criteria in the design and analysis of experiments for discrimination between rival kinetic models. *Methods in Enzymology*, 87:370-390, 1982.
- Marquardt, D.W. - An algorithm for least-squares estimation of non-linear parameter. *J. Soc. Indust. Appl. Math.*, 11(2):431-441, 1963.
- Segel, I.H. - Enzyme kinetics. New York, John Wiley & Sons, Inc., capítulos 1, 2, 3, 4 e 11, 1975.
- Schmidell, W.; Aboutboul, H.; Facciotti, M.C.R. & Maeda, J. - Estudo de algumas variáveis na hidrólise e fermentação alcóolica de farinha de mandioca. *Revista Brasileira de Engenharia*, 3(1):57-70, 1985.
- Valiat, I.; Monsan, P. & Riba, J.P. - Influence of glucose on the kinetics of maltodextrin hydrolysis using free and immobilized glucoamylase. *Biotechnol. Bioeng.*, 27:1274-1275, 1985.
- Weetall, H.H. & Havewala, N.B. - Continuous production of dextrose from cornstarch. A study of reactor parameters necessary for commercial application. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 3:241-266, 1972.

## O ENSINO DA MICROBIOLOGIA: UM DESAFIO!

Wilson Leon

Instituto de Microbiologia UFRJ  
 Centro de Ciências da Saúde, Bloco I  
 Cidade Universitária  
 21941 Rio de Janeiro RJ

& Dolores Izabel M. Barros

Faculdade de Medicina UFRJ  
 Programa de Orientação Psico-Pedagógica  
 e Profissional  
 (POPPE)  
 Centro de Ciências da Saúde, Bloco K  
 Cidade Universitária  
 21941 Rio de Janeiro RJ

### Resumo

A principal finalidade deste trabalho foi identificar, o perfil dos candidatos ao Mestrado do Instituto de Microbiologia da UFRJ, procurando determinar basicamente, se o ensino de graduação oferecido nesta Instituição era capaz de atrair profissionais motivados para a investigação científica em Microbiologia e Imunologia.

### Introdução

O curso de Pós-Graduação do Instituto de Microbiologia (IM) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), ao nível de mestrado, é oferecido para profissionais que tenham cursado na graduação, Microbiologia e Imunologia.

O Curso de Mestrado, é uma etapa inicial da pós-graduação, podendo ser complementada pelo Doutorado e pelo Pós-Doutoramento, dependendo das circunstâncias e conveniências, sejam de ordem pessoal ou da Instituição a que o estudante esteja vinculado.

O principal objetivo do Mestrado no IM é formar docentes-pesquisadores capazes de se engajarem em linhas de pesquisa já estabelecidas, ou no desenvolvimento de tecnologias, seja em indústrias ou centros de formação de recursos humanos.

O IM conta com um plantel de 65 professores com nível de Doutor e pós-doutoramento em sua maioria, distribuídos em quatro diferentes áreas: Imunologia, Microbiologia Geral, Microbiologia Médica e Virologia.

O número de estudantes selecionados

anualmente, tem variado entre 10 e 15, aos quais são concedidas bolsas do CNPq ou CAPES; O curso é realizado em tempo integral, necessitando para tanto, de dedicação exclusiva por parte dos alunos.

Têm sido observado, um desinteresse pela pós-graduação em Microbiologia e Imunologia, por parte dos alunos formados pela UFRJ.

Considerando que a Microbiologia é uma das áreas especialmente importantes para o progresso econômico e social do País (6), e que a Universidade brasileira tem hoje, mais professores melhor treinados, mais equipamentos e mais dedicação exclusiva que há vinte anos (2), pouca demanda por parte dos estudantes desta Universidade aos cursos de pós-graduação oferecidos pelo IM é preocupante.

Assim, foi objetivo deste trabalho, chamar a atenção para a problemática da formação de recursos humanos em Microbiologia e Imunologia, discutindo o ensino de graduação nos domínios do Instituto de Microbiologia, e generalizando, dentro do possível, as suas conclusões para uma política de

ensino mais estimulante e mobilizadora.

### Material e Métodos

A população-alvo deste trabalho consistiu nos candidatos ao Mestrado, inscritos para iniciar o curso em 1989.

A divulgação do Curso de Mestrado foi feita através mala direta para as principais Universidades brasileiras e as inscrições permaneceram abertas por 45 dias.

A seleção para o mestrado consistiu de provas de conhecimentos básicos de Microbiologia e Imunologia, estritamente enquadrados dentro do programa de graduação do IM, entrevistas individuais e proficiência em inglês em caráter não eliminatório.

Os dados individuais foram coletados através fichas de inscrição e análise dos históricos escolares. Os tópicos inquiridos foram baseados nos trabalhos de Castro (3) e Barros (1).

### Resultados

Cento e dez profissionais inscreveram-se para as provas de seleção. Destes, a grande maioria é graduada em Biologia (57%). A segunda maior procura pelo curso foi de profissionais farmacêuticos (24%). Segue-se em igual proporção, médicos e veterinários, 6% de cada grupo. Nutrição e Odontologia apresentaram o mesmo número de candidatos (3%). Apenas um profissional de enfermagem inscreveu-se (0,9%).

De acordo com a Tabela 1, observa-se que a maior parte dos candidatos (87%) é proveniente de outras Universidades que não a UFRJ. Dentre os quatorze candidatos formados pela UFRJ, sete são biólogos, cinco são farmacêuticos, um é médico e outro nutricionista.

Ainda na Tabela 1, pode-se verificar que a maioria dos postulantes ao mestrado (62%) não é recém graduada, tendo sido formada anteriormente a 1988.

A Tabela 2, nos permite concluir que o sexo feminino sentiu-se mais inclinado à Pós-Graduação em Microbiologia (71%), sendo que, o número de solteiros (75%) excedeu em muito o de outros estados civis. Quanto à idade, observa-se que há uma ligeira

predominância de pessoas com mais de 25 anos (55,5%).

Foram selecionados para o Mestrado de 1989 doze estudantes (10,9%). O menor índice de aprovação foi conseguido pelos Biólogos (6,5%), vide Tabela 3.

Na Tabela 4, estão resumidas as informações sobre os 12 candidatos aprovados. Dos quatro biólogos selecionados, dois foram graduados pela UFRJ. A predominância dos novos mestrandos é de terem colado grau antes de 1986.

De acordo com o sexo, temos oito mulheres e quatro homens. Quanto ao estado civil, a distribuição é de sete solteiros e cinco casados. Com relação à idade, seis têm menos de 25 anos.

### Discussão

Anualmente, os docentes do IM ensinam a cerca de 600 alunos, matriculados nos seguintes cursos de graduação da UFRJ: Biologia, Enfermagem, Farmácia, Medicina, Nutrição e Odontologia.

Apesar da disciplina de Microbiologia e Imunologia a nível de graduação, ser frequentemente elogiada pelo corpo discente, como sendo bem estruturada e bem organizada, é pequena a influência de candidatos ao Mestrado do IM, por parte de seus próprios ex-alunos.

São poucos os cursos de Biologia, que tem Microbiologia e Imunologia como disciplinas obrigatórias no bacharelado. Apesar disto, a maioria dos candidatos inscritos, foi de biólogos de outras Universidades, que tiveram de cursar a Microbiologia como disciplina isolada, a fim de se habilitarem para o mestrado.

Paralelamente, observa-se que a maioria dos candidatos tem mais de 25 anos, com respectivas formaturas ocorridas anteriormente ao ano da inscrição para a seleção no IM. Este fato, sugere, que pode existir uma outra motivação para a pós-graduação: a dificuldade encontrada por esses profissionais no mercado de trabalho. Aparentemente, a nova política de concessão de bolsas, pela CAPES e CNPq, favorece em muito tal situação.

Assim, no presente momento, são duas as maiores dificuldades do IM: a) o desinteresse dos ex-alunos da disciplina de graduação, para os cursos de pós-graduação em Microbiologia; b)

Tabela 1 - Origem acadêmico-geográfica e ano de graduação dos candidatos ao Mestrado. \*) Grande Rio: Rio de Janeiro, Nova Iguaçu, Niterói, Petrópolis, Teresópolis, Valença, Caxias, Volta Redonda, Vassouras.

Profissão	Nº de inscritos	Origem Acadêmico-Geográfica:				Ano da Graduação:		
		UF RJ	Grande Rio	Outros Estados	Estrangeiros	até 86	87	88
Biologia	62	07	49	05	01	24	11	27
Medicina	07	01	05	-	01	03	-	04
Nutrição	03	01	-	02	-	02	-	01
Veterinária	07	-	07	-	-	02	03	02
Farmácia	27	05	07	14	01	15	07	05
Odontologia	03	-	02	01	-	-	02	01
Enfermagem	01	-	01	-	-	-	-	01
Total	110	14	71	22	03	46	23	41

Tabela 2 - Características dos candidatos ao Mestrado, quanto ao sexo, estado civil e idade.

Profissão	Nº de inscritos	Sexo		Estado civil:		Idade:	
		M	F	solteiro	outros	- 25	+ 25
Biologia	62	16	46	46	16	26	36
Medicina	07	03	04	06	01	02	05
Nutrição	03	-	03	02	01	-	03
Veterinária	07	04	03	05	02	06	01
Farmácia	27	08	19	20	07	13	14
Odontologia	03	01	02	03	-	02	01
Enfermagem	01	-	01	01	-	-	01
Total	110	32	78	83	27	49	61

ter como candidatos aos seus cursos de pós-graduação, profissionais de discutível talento para a investigação científica.

Nesta instância, só nos interessa desenvolver a problemática enunciada no ítem a: o ensino da Microbiologia em nível de graduação ficou preso à reprodução de tecnologias obsoletas, não se adaptando a novos problemas, principalmente ao avanço da biotecnologia. Enquanto o mundo ouve sobre os "milagres" do DNA recombinante e dos anticorpos monoclonais, o ensino da graduação em Microbiologia, ainda se atém a mudanças de cores em meios de

culturas, e a técnicas bacteriológicas conservadoras, exercidas atualmente por pessoal de nível técnico.

O IM, tal qual a Universidade, não perdeu qualidade; perdeu velocidade. Não piorou, atrasou-se. Não perdeu o conteúdo; perdeu o poder de usar o seu potencial para refazer o seu conteúdo conforme as exigências da sociedade (2). Juliatto (6) afirma que a crise da Universidade brasileira é financeira, dos números, de conteúdo acadêmico do racionalismo e da identidade. O ensino é tradicionalmente livresco e desvinculado da realidade profissional.

Existe um problema extremamente sério

**Tabela 3 - Relação entre as profissões dos candidatos ao Mestrado e o percentual de aproveitamento.**

Profissão	Nº de inscritos	Nº de selecionados
Biologia	62	4 (6,5%)
Medicina	07	2 (28,5%)
Veterinária	07	1 (14,0%)
Farmácia	27	5 (18,5%)
Nutrição	03	-
Odontologia	03	-
Enfermagem	01	-
Total	110	12 (10,9%)

**Tabela 4 - Características dos mestrandos selecionados, quanto à profissão, origem acadêmico-geográfica, sexo, idade e estado civil.**

Alunos selecionados	Profissão	Origem Acadêmico-Geográfica	Ano de Formatura	Sexo	Idade	Est. Civil
1	Biologia	UFRJ	1985	F	-25	Casado
2	Biologia	Grande Rio (N.I)	1985	M	-25	Casado
3	Biologia	UFRJ	1988	F	-25	Solteiro
4	Biologia	Outros estados (MG)	1987	F	-25	Solteiro
5	Farmácia	Grande Rio (UFF)	1980	F	+25	Casado
6	Farmácia	Outros Estados (RS)	1981	F	+25	Casado
7	Farmácia	Outros Estados (MG)	1985	M	-25	Solteiro
8	Farmácia	Outros Estados (RS)	1985	F	+25	Solteiro
9	Farmácia	Outros Estados (BA)	1985	F	-25	Solteiro
10	Medicina	Estrangeira (Argentina)	1973	F	+25	Casado
11	Medicina	Grande Rio (UERJ)	1980	M	+25	Solteiro
12	Veterinária	Grande Rio (UFF)	1986	M	-25	Solteiro

em relação aos esforços de melhoria da qualidade do ensino universitário, que é a ausência de critérios, a respeito do nível de qualidade que deva ser aplicado (9), considerando que o ensino superior é um setor de formação de recursos humanos, para os demais níveis de ensino e para a sociedade (5).

Para poder acompanhar os progressos incessantes do conhecimento científico,

a universidade precisa produzir por meios próprios, pelo menos algumas parcelas daqueles progressos (7, 8).

O fomento da pesquisa científica exige condições especiais, com fluxo crescente de recursos materiais e financeiros (4) e, principalmente, uma política de atração, seleção e retenção de talentos jovens. Assim, observa-se que o ensino da Microbiologia e

Imunologia a nível de graduação, está deixando passar desapercebido os avanços da Imunoquímica, da Engenharia Genética e da Fisiologia Celular. Os estudantes de graduação vem na disciplina mais uma matéria que deverá ser ultrapassada no ciclo básico dos seus estudos, não a considerando como possível especialidade profissional futura.

sobre as características de um discurso. Cadernos de Pesquisa, 65:72-77, 1988.

9. Schwartzman, S. - Ciência, Universidade e Ideologia - A política do conhecimento. 1a. ed. Rio de Janeiro, Zahar Eds., 1981.

Recebido para publicação em 13/02/89

## Summary

### *Teaching Microbiology: a challenge*

This work was designed primarily to identify among candidates to obtain their Master degree at the Institute of Microbiology of the Federal University of Rio de Janeiro whether they are former students of this Institute, considering that ca. 600 people, attend to a regular undergraduate Microbiology course held every year at this Institute. Additionally, some considerations towards job opportunities are also made.

## Referências Bibliográficas

1. Barros, D.I.M. - Proposta de uma abordagem humanista à pedagogia do ensino superior. Rio de Janeiro, 1987 (Tese de Mestrado - Fundação Getúlio Vargas).
2. Buarque, C. - A qualidade da qualidade. Educação Bras., 10:121-129, 1988.
3. Castro, C.L.M. - Quem se matricula em cursos de mestrado e doutorado? Rio de Janeiro, 1980 (Relatório do Instituto de Estudos Avançados em Educação, Fundação Getúlio Vargas).
4. Fernandes, F. - Universidade Brasileira: reforma ou revolução? 2a. ed. São Paulo, Alfa-Omega, 1979.
5. Freitag, B. - Escola, Estado e Sociedade. 4a. ed. São Paulo, Ed. Moraes, 1980.
6. Juliatto, C.I. - Algumas reflexões sobre o ensino superior. Educação Bras., 10:105-120, 1988.
7. Moreira, D.A. - Fatores influentes na avaliação do professor pelo aluno: uma revisão. Educação e Seleção, 1773-87, 1988.
8. Patto, M.H.S. - O fracasso escolar como objeto de estudo: anotações

## INFORMAÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA SBM

**Environmental Biotechnology - Reducing Risks from environmental chemicals through biotechnology**

Editor: G.S. Omenn  
 Editores associados: Colwell, R.;  
 Chakrabarty, A.M.; Morris, L.;  
 McCarty, P.  
 Plenum Press, New York - Londres,  
 1988. 505p.

Publicação de grande importância em área do conhecimento que inicia seu desenvolvimento: a Biotecnologia Ambiental. Um comentário dos editores resume tudo: "No evento anterior discutiu-se o que poderia ser feito nesta área; neste Congresso já foram apresentados vários trabalhos de campo, com bons resultados e embora ainda não se tenha todas as soluções, já se obteve um avanço satisfatório".

Este livro consiste numa coletânea de conferências, discussões (extremamente interessantes), workshops, mesas-redondas e resumos de trabalhos do Congresso sobre "Reducing Risks from Environmental Chemicals through Biotechnology" - realizado em 19-23/07/87 - em Seattle - Washington.

Trabalhos muito interessantes são relatados e discutidos, envolvendo as áreas de Ecologia de Microrganismos, Avanços relevantes na Biologia Molecular e Engenharia Genética, frente à Biotecnologia Ambiental. Papel da Biotecnologia no Controle da Poluição, Minimização dos Riscos da Liberação de Microrganismos no Meio Ambiente, Participação da Comunidade. Políticas de Controle da Poluição, são apresentados muitos dados importantes sobre: biodegradação de hidrocarbonetos, PCB's, organoclorados; biotransformação do mercúrio; limpeza pela ação microbiológica, de águas subterrâneas contaminadas por pentaclorofenol; tratamento anaeróbico de resíduos perigosos, etc.

Uma bibliografia muito ampla é citada bem como a lista das prioridades de pesquisa e a de pesquisadores da área.

Esta publicação apresenta o "estado-da-arte" da Biotecnologia Ambiental e deveria constar do acervo bibliográfico de todos os interessados nesta área do conhecimento e na melhoria da qualidade ambiental.

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

**Genetic Engineering and Biotechnology Yearbook. N. America and Japan Edition 1988/89**

Parts 1-2  
 Alan G. Walton  
 Sharon K. Hammer  
 Elsevier - Amsterdam - Oxford - New York - Tokyo, 1988, 1403p.

Trata-se de uma ampla listagem com endereços de firmas, instituições, laboratórios, com indicação de nomes para contacto bem como linhas de pesquisa ou produtos na área de Biotecnologia.

Praticamente tudo o que está sendo desenvolvido nos Estados Unidos, Canadá e Japão, está exposto nesta publicação.

É uma obra para consulta, devendo constar do acervo de bibliotecas de empresas ou instituições que atuem ou se interessem por Biotecnologia.

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

**Biological, Biochemical and Biomedical aspects of Actinomycetes Symposia Biologica Hungarica. 32. Akadémiai Kiado, Budapest, 1986, Sixth International Symposium on Actinomycetes Biology, Hungary, 1985.**

Szabó, G.; Biró, S. & Goodfellow, M. eds

Apesar da defasagem natural de seu conteúdo que é de 1985 e dos constantes avanços da Biologia, Bioquímica e Biomedicina dos Actinomicetos, os editores apresentam excelente material científico com textos completos sobre as conferências de nove sessões plenárias de forma clara e abreviada, além, de matéria das oito sessões livres e "abstrats" de sete sessões de "posters" nas quais participaram especialistas os mais renomados nos diversos campos de interesse, procedentes de 27 países.

Constam ainda nos dois volumes (883 páginas) apresentados, matéria bastante variada com informação completa de dados, sobre os diversos campos da biologia dos Actinomicetes, tais como: genética, fisiologia e biossíntese de metabolitos primários e secundários perfazendo um total de cento e doze pesquisas cujo interesse maior está voltado aos aspectos genéticos, de caracterização, controle, trocas fenotípicas, regulação e plasmídios, quase que totalmente de actinomicetos produtores de antimicrobianos; bioquímica, compreendendo pesquisas e observações tanto gerais como particuladas, desse grande grupo de microrganismos; morfologia e ultraestruturas com bem pouco número da participações e contribuições que são complementadas por pesquisas no campo da taxonomia cujas observações referentes aos "tipos de paredes" desses microrganismos têm sido filogeneticamente baseados os estudos taxonômicos; patogenicidade e imunologia capítulo de menor número ainda de contribuições talvez pela carência de pesquisadores na área. São apresentados treze trabalhos de pesquisa com enfoques de aspectos bastante variados, desde as condições de pré disposição ao desenvolvimento da actinomicose humana, sensibilidade a antimicrobianos, determinantes de virulência e de infecção na nocardiose humana e animal com atenção maior às interações entre macrófago - *N. asteroides*, estudos histológicos e ultraestruturais dos actinomicetomas humanos até o estabelecimento de diversas classes de Imunoglobulinas no "Farmer's Lung Disease" e identificação de IgG monoclonal em *N. asteroides*; ecologia e epidemiologia

com avaliação crítica bastante ampla, variada e abrangente da ecologia dos mesmos. A cada trabalho segue ampla bibliografia.

Prof. Dr. Eduardo do Nascimento Mós  
Deptº de Microbiologia - ICB/USP  
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374  
Cidade Universitária USP  
05508 São Paulo SP

*Virology & AIDS Abstracts*, 22(1), jan. 1989, 202p.

Cheyney, D.; Gardner, R.A.; Stover, D.D.; Walsh, R. (ed.).  
*Cambridge Scientific Abstracts*, Bethesda, USA

"Virology & AIDS Abstracts" (ISSN 0896 - 5919) é uma publicação que veio substituir, a partir de março de 1988, o conhecido "Virology Abstracts", editado mensalmente desde 1967. Cada número contém aproximadamente 800 resumos, incluindo, também, índices de autor e de assunto. O último número de cada ano (correspondente ao mês de dezembro) apresenta um índice anual cumulativo.

O "Virology & AIDS Abstracts" é publicado pelo "Cambridge Scientific Abstracts" (endereço: 7200 Wisconsin Avenue, Bethesda, MD 20814, Estados Unidos) e relaciona trabalhos desenvolvidos em diferentes áreas da virologia, classificados nas seguintes seções: - Síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS); Taxonomia viral e classificação; Metodologia e estudos de cultura de tecidos; Propriedades físico-químicas, estrutura e morfologia; Ciclo de replicação; Genética viral, incluindo reativação; Interações fago-hospedeira, incluindo lisogénia e transdução; Imunologia; Agentes antivirais; Oncologia; Infecções virais do homem; Doenças associadas a vírus lentos; Infecções virais dos animais; Modelos animais e infecções virais induzidas experimentalmente; Infecções virais dos invertebrados; Infecções virais de fungos e de plantas inferiores; Infecções virais de plantas superiores; Tópicos variados.

Além destes ítems, inclui, ainda:

- Bibliografias e monografias; Conferências, Simpósios e "Proceedings"; Resenhas de livros.

Na seção sobre AIDS, os assuntos são classificados em cinco subseções: - Aspectos moleculares e "in vitro": abrangendo caracterização genética e bioquímica, incluindo sequência de nucleotídeos e química de proteínas; Aspectos imunológicos: compreendendo resposta imune, vacinas, imunomodulação, características antigênicas e estado imune; Aspectos clínicos: contendo diagnose, tratamento, patologia, prevenção, infecções oportunistas, agentes antivirais (atividade "in vitro" e "in vivo"), modelos animais e complexo relacionado à AIDS (ARC); Aspectos epidemiológicos: incluindo levantamentos sorológico, estudos de populações, disseminação da doença, incidência e análise estatística; Outros: apresentando resumos de trabalhos relacionados a aspectos éticos, legais, sociais e também demais assuntos não incluídos nas seções anteriores.

Há 196 resumos sobre AIDS no fascículo em questão, ocupando 27 páginas. Considerando que há um total de 800 resumos, distribuídos em 120 páginas, os assuntos sobre AIDS representam de 20 a 25% do total, evidenciando a importância que a comunidade científica tem dado a este sério problema.

Pelo exposto, fica claro que as consultas ao "Virology & AIDS Abstracts" são imprescindíveis aos virologistas, sejam eles da área de virologia humana, animal ou vegetal. Como consequência, há necessidade de que as Bibliotecas das Universidades e Instituto de Pesquisa mantenham coleções atualizadas desta publicação.

Maria Mércia Barradas  
Seção de Virologia Fitopatológica e Fisiopatologia  
Instituto Biológico - CP 7119  
01051 São Paulo SP

I Simpósio Brasileiro sobre Microbiologia do Solo

O Departamento de Microbiologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária "Campus" de Jaboticabal -

UNESP, junto com a Sociedade Brasileira de Microbiologia, farão realizar, no período de 28/11 a 01/12/89, no Centro de Convenções da FCAV-UNESP, Jaboticabal, o I Simpósio Brasileiro sobre Microbiologia do Solo.

Nesta reunião que tem por objetivo congregar especialistas de todo o país para discutir temas relevantes em Microbiologia do Solo, estarão sendo debatidos os seguintes temas:

- Transformações microbianas de compostos nitrogenados no solo
- Solubilização microbiana de fosfatos naturais
- O enxofre e suas transformações microbianas
- Efeitos de biocidas no solo
- Transformações microbianas de resíduos agroindustriais no solo
- Quantificação de microrganismos no solo

Para maiores informações:

Prof. Dr. Ely Nahas  
Coordenador de Área Microbiologia de Solo/SBM  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP  
Rodovia Carlos Tonami, Km 5  
14870 Jaboticabal SP

IUMS Congress: Bacteriology & Mycology  
Osaka, Japan - 1990

Será realizado em Osaka, Japão, de 16 a 22 de setembro de 1990, patrocinado pela International Union of Microbiological Societies (IUMS), o Congresso: Bacteriologia e Micologia. O referido congresso abrangerá temas das várias áreas relacionadas com a Bacteriologia e Micologia, tais como: Microbiologia Industrial, Biologia Molecular, Microbiologia Médica, etc.

Maiores informações, dirigir-se a  
Dr. Yoshifumi Takeda  
Secretario Geral do Congresso  
Department of Microbiology  
Faculty of Medicine  
Kyoto University  
Yoshida, Konoe-cho  
Sakyo-Ku, Kyoto 606  
Japan





# **PRÓDICA**

Fotocomposição, Diagramação  
Arte, Fotolito e Impressão  
PRÓDICA Gráfica e Editora Ltda.  
Fone: 35-7281