

Revista de Microbiologia

Regina T.



ESFORÇAR PARA NÃO DESMERITAR

OBRA DE

SBM

Sociedade
Brasileira de
Microbiologia

São Paulo — Brasil

Volume 20 Número 1 Jan.-Mar. 1989

Revista de Microbiologia
Editorial da Sociedade Brasileira de Microbiologia
Sociedade Brasileira de Microbiologia

Instruções aos autores

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Exemplo:

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

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

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

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

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

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

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





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

Revista de Microbiología

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

**Assistente de
Diretoria** Maria Helena Colón Silva (SBM)

Aquisição por não-membros Assinatura anual para quatro números 5 OTN'S para o Brasil: US\$ 25.00 via marítima ou US\$ 30.00 (via aérea) para Exterior. Cheques em nome da Sociedade Brasileira de Microbiologia, para o endereço do Diretor Executivo da Revista de Microbiologia.

Acquisition by non-members Annual subscription: US\$ 25.00 (surface mail) or US\$ 30.00 (air mail). Checks for Sociedade Brasileira de Microbiologia, addressed to the Director's office.

Datilografia Deborah Maria da Conceição (SBM)

Impressão Gráfica Editora Hamburg Ltda.

Sociedade Brasileira de Microbiologia

Diretoria	Presidente Maria Therezinha Martins Inst. de Ciências Biomédicas USP Deptº de Microbiologia Av. Prof. Lineu Prestes, 1.374 05508 São Paulo - SP	Vice-Presidente Walderez Gambale Inst. de Ciências Biomédicas USP Deptº de Microbiologia Av. Prof. Lineu Prestes, 1.374 05508 São Paulo - SP
	Secretária Geral Lúcia Martins Teixeira Inst. de Microbiologia-UFRJ Centro de Ciências da Saúde - Bl.1 Ilha do Fundão 21944 Rio de Janeiro - RJ	Tesoureiro Leonardo Perego Jr. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP Conjunto das Químicas Cidade Universitária 05508 São Paulo - SP

Coordenadores de Programas da SBM Microbiologia de Alimentos (Sebastião 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).

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

Endereço Av. Prof. Lineu Prestes, 1.374
05508 - São Paulo - SP
Brasil
Fone: (011) 813-9647
TELEX 11 35085

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

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA
VOLUME 20 JANEIRO-MARÇO 1989 NÚMERO 1
REV. MICROBIOL. (S. PAULO), 20(1)

CONTEÚDO-CONTENTS

	PAG.
Figueiredo A.M.S.; & Benchetrit L.C. Estocagem de bacteriófagos de <i>Streptococcus pyogenes</i> na presença de substâncias crioprotetoras Storage of bacteriophages from <i>Streptococcus pyogenes</i> in the presence of cryoprotective substances	1
Svidzinski, T.I.E.; Oliveira, T.C.R.M. de; & Herrero, F. Diagnóstico laboratorial e importância clínica da <i>Gardnerella vaginalis</i> em pacientes com infecção vaginal The clinical importance and laboratory diagnosis of <i>Gardnerella vaginalis</i> . in patients with vaginal infections	5
Figueiredo, A.M.S.; Velazco, C.; & Benchetrit, L.C. Lisogenia e resistência à tetraciclina em estreptococos do grupo A. Lysogeny and resistance to tetracycline in group A streptococci	10
Rodrigues, D. dos P.; Solari, C.A.; Ribeiro, R.V.; Costa, J.E.C.M.; Reis, E.M.F. dos; Silva F., S.J. da; & Hofer, E. <i>Salmonella</i> em água de praias do município do Rio de Janeiro, RJ <i>Salmonella</i> from sea water collected in the beaches of Rio de Janeiro city	12
Gallardo, P.B.; & Panno, L.C. Control biológico de la marchitez bacteriana de la papa (<i>Solanum tuberosum</i> L.) inducida por <i>Pseudomonas solanacearum</i> E.F. Smith Biological control of bacterial wilt potato induced by <i>Pseudomonas solanacearum</i> E.F. Smity	18
Gallardo, P.B.; Panno, L.C.; & Guichaquelén, V.G. Inhibición "in vivo" de <i>Pseudomonas solanacearum</i> E.F. Smith utilizando la cepa antagonista BC8 de <i>Pseudomonas fluorescens</i> Inhibition "in vitro" of <i>Pseudomonas solanacearum</i> E.F. Smith by using the antagonist BC8 strain of <i>Pseudomonas fluorescens</i>	27
Paula, O.M. de; Borges, A.C.; Guimarães, W.V.; & Silva, D.O. Comportamento de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> na presença dos plasmídios RK2 ou RP4 Behavior of <i>Bradyrhizobium japonicum</i> in the presence of plasmids RK2 or RP4	34
Sant'Ana, Y.X.; Chartone-Souza, E.; Ferreira M. das D. Resistência a drogas e colicinogénia em linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i> isoladas de ribeirões-esgotos e de pacientes em Belo Horizonte, Brasil Drug resistance and colicinogeny of <i>Salmonella typhimurium</i> strains isolated from sewage-contaminated surface water and humans in Belo Horizonte, Brasil	41
Araujo, F.L. de; Nunes, M.P.; & Ricciardi, I.D. Produção de enterotoxina por <i>Moraxella bovis</i> Production of enterotoxin by <i>Moraxella bovis</i>	50
Peres, A.G.; Silva, M.G. da; Silva David, M.T.S. da; & Gontijo F., P.P. Influência do inóculo bacteriano no teste de susceptibilidade as quinolonas pelo método de diluição em ágar Effect of the inoculum on the activity of quinolones using the agar dilution procedure	53

Vasconcellos, S.A.; Ohtsubo, I.; Moretti, A.S.; Ito, F.H.; Passos, E. de C.; Côrtes, J. de A.; & Yasuda, P.H.	Ausência de resposta imunológica humoral em suínos que receberam água de beber contaminada com <i>Leptospira biflexa</i> estirpe Buenos Aires	Absence of humoral immunological response in swines whose drinking water was contaminated with <i>Leptospira biflexa</i> strain, Bueno Aires	56
Vasconcellos, S.A.; Ohtsubo, I.; Moretti, A.S.; Ito, F.H.; Passos, E. de C.; Côrtes, J. de A.; Moreno, A.G.; & Yasuda, P.H.	Emprego do antígeno de <i>L. biflexa</i> estirpe Buenos Aires na reação de soro-aglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da Leptospirose em suínos experimentalmente infectados com <i>L. interrogans</i>	Use of the <i>L. biflexa</i> strain Buenos Aires for performing the microscopic-agglutination test for leptospirosis in swine experimentally infected with <i>L. interrogans</i> serovar pomona	62
Baien, L.; Silva, E.N. da; Andreatti Fº; R.L.; Gaviolle, M.C.; & Cappellaro, C.E.M.P.D.	Conservação da amostra Conn-F de <i>Mycoplasma gallisepticum</i> pelo congelamento e liofilização	Preservation of strain Conn-F of <i>Mycoplasma gallisepticum</i> by freezing and lyophilization	71
Cereda, M.P.; Antonangelo, A.T.B.F.; Gomes, M.I.F.V.; & Goldoni, J.S.	Seleção de leveduras a partir de caldo de sorgo sacarino (<i>Sorghum bicolor</i> L.) em fermentação natural	Selected yeasts from <i>Sorghum</i> juices (<i>Sorghum bicolor</i> , L.) in natural fermentations	78
Lima, E.A. de L.; & Tigano, M.S.	Citologia das estruturas leveduriformes de <i>Beauveria bassiana</i> em meios de cultura líquidos e na hemolinfa de <i>Spodoptera frugiperda</i>	Cytology of the yeast-like structures of <i>Beauveria bassiana</i> in liquid media and in the hemolymph of <i>Spodoptera frugiperda</i>	85
Schoenlein-Crusius, I.H.; Milanez, A.I.	Sucessão fúngica em folhas de <i>Ficus microcarpa</i> L.F. submersas no lago frontal situado no Parque Estadual das fontes do Ipiranga São Paulo/SP	Fungal succession on <i>Ficus microcarpa</i> L.f. leaves submerged in frontal lake in the Parque Estadual das Fontes do Ipiranga São Paulo State, Brazil	95
Cury, A.E.; Miche, M.P.; & Minami, P.S.	Leveduras isoladas de pacientes com câncer: incidência e sensibilidade a antibióticos poliênicos	Incidence and polyene susceptibility of yeasts recovered from cancer patients undergoing antineoplastic therapy	102
Facciotti, M.C.R.; Kilikian, B.V.; Schmidell, W.; & Fachini E.R.	Processo descontínuo de síntese de amiloglicosidase por <i>Aspergillus awamori</i> : influência do pH e da concentração inicial de polissacarídeo	Glucoamylase synthesis in batch process by <i>Aspergillus awamori</i> : influence of pH and initial polysaccharide concentration	108
Fowler, H.G.	Um iridovírus epizoótico de Orthoptera (<i>Gryllotalpidae: Scapteriscus borellii</i>) e sua patogenicidade em cupins (Isoptera: <i>Cryptotermes</i>)	An epizootic iridovirus of orthoptera (<i>Gryllotalpidae: Scapteriscus borellii</i>) and its pathogenicity to termites (Isoptera: <i>Cryptotermes</i>)	115

Ernst M., S.; & Frabraega G., F.

Epidemiologia da raiva em Chile, 1950-1986: Um estudo descriptivo de casos de raiva confirmados pelo laboratório
Epidemiology of rabies in Chile, 1950-1986: a descriptive study of laboratory - confirmed cases

121

Kotait, I.; Peixoto, Z.M.P.; Queiroz, L.H.; Cunha, E.M.S.; Souza, M.C.A.M.
Macruz, R.; & Freitas, C.A. de

"Diagnóstico laboratorial do aborto equino a vírus através de imunofluorescência e soroneutralização"

Laboratorial diagnosis of Equine Virus Abortion through immunofluorescence and serumneutralization test

128

Vieira, A.A.H.; & Nascimento, O.R.

Imobilização de íons Cu²⁺ por compostos de alto peso molecular excretados por *Ankistrodesmus densus* (*Chlorophyceae*) em diferentes idades de cultivo

Copper immobilization by high molecular weight compounds excreted by aging culture of *Ankistrodesmus densus* (*Chlorococcales*)

133

Informação Técnico-Científica SBM

141

ESTOCAGEM DE BACTERIÓFAGOS DE *STREPTOCOCCUS PYOGENES* NA PRESENÇA DE SUBSTÂNCIAS CRIOPROTETORAS

Agnes Marie Sá Figueiredo
 & Leslie C. Benchetrit

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

Recebido para publicação em 03/02/88

Resumo

Foi estudada a infectividade de bacteriófagos temperados de *Streptococcus pyogenes* após estocagens dos mesmos nas temperaturas de -20 a 4°C, durante 35 dias, na presença de diferentes substâncias crioprotetoras comumente utilizadas na conservação de suspensão virais. Os fagos foram inativados rapidamente quando estocados juntamente com os lisados bacterianos, mesmo na presença dos crioprotetores. Maior estabilidade foi obtida após purificação parcial através de lavagens com tampão fosfato de sódio (100.000g/lh) e posterior estocagem na presença dos crioprotetores. Verificamos que os bacteriófagos tiveram a sua infectividade preservada quando estocados a 4°C na presença de sacarose, dimetilsulfóxido, acetato de amônio e dextrana durante 35 dias.

Summary

Storage of bacteriophages from Streptococcus pyogenes in the presence of cryoprotective substances

Inactivation of temperate bacteriophages from *Streptococcus pyogenes* stored at -20°C and 4°C during 35 days in the presence of various cryoprotective substances commonly used for storage of viral suspensions was studied. The additives did not protect the bacteriophages from the inactivation when lysates were stored at low temperatures. Phages partially purified by washing in phosphate buffer (100.000g/lh) and stored in the presence of cryoprotective substances were more stable. We verified that the infectivity of the bacteriophages was retained after storage at 4°C in the presence of sucrose, dimethylsulfoxide, ammonium acetate and dextran during 35 days.

Introdução

Estudos de morfologia, caracterização e genética dos bacteriófagos de *Streptococcus pyogenes* tem sido realizados, principalmente com os fagos virulentos (1, 5, 7, 12, 15). Vários pesquisadores (3, 11) têm citado as dificuldades encontradas no trabalho com esses fagos, mais precisamente com relação aos temperados. Nida & Col. em 1982, relatam as dificuldades de obtenções de altos títulos de fagos temperados desses estreptococos, a fragilidade dos mesmos frente à

*Trabalho realizado com auxílio do CNPq, FINEP (PADCT) e CEPG da UFRJ.

manipulações, alta velocidade de centrifugação e ao processo de purificação em gradiente de cloreto de césio (11).

Hill & Wannamaker em 1981 (8) mostraram que os fagos virulentos são estáveis em temperaturas de 4°C durante uma semana e -20 °C por um mês. Entretanto, em estudos anteriores com bacteriófagos temperados desses estreptococos (3, 4, 6), observamos que ao contrário dos virulentos, os fagos temperados são inativados rapidamente, após poucos dias de estocagem tanto a 4°C como a -20°C.

O presente trabalho relata os resultados encontrados em um estudo sobre a infectividade de fagos temperados de *S. pyogenes* mantidos em baixas temperaturas, na presença de diferentes substâncias crioprotetoras.

Material e Métodos

Amostras bacterianas e bacteriófagos - Os bacteriófagos temperados utilizados neste estudo, foram obtidos dos seguintes estreptococos isolados em nosso laboratório: amostra nº 79-031 (M-não tipável, padrão T B3264), nº 79-187 (tipo M69, padrão T3/13/B3264), nº 79-270 (M-não tipável, tipo T 6), nº 80-019 (tipo M 69, padrão T 3/13/B3264). A amostra designada como K56 (tipo M 12, T 12), descrita anteriormente por Kjens (9), foi utilizada como amostra indicadora para a detecção e titulação dos fagos.

Meios de cultura - O meio utilizado para o crescimento das amostras e indução de fagos foi o caldo N6 composto de 4% de proteose peptona nº 3 (Difco Laboratories), 2% de extrato de levedura (Difco), 0,1M de NaCl, 5mM de Na₂HPO₄, 2, 8mM de glicose e 1,8mM de CaCl₂ (5). O agar R6 foi utilizado para a titulação dos fagos, sendo constituído de 3% de proteose peptona nº 3, 0,05M de NaCl, 0,01M de Na₂HPO₄, 5,5mM de glicose, 5% de soro de cavalo (Instituto Vital Brazil), 2mM de CaCl₂ e agar a 1% (16).

Substâncias crioprotetoras - Foram utilizadas as seguintes substâncias: sacarose (0,2M), gelatina (0,1% P/V), glicerol (10%), dimetil sulfóxido (0,1M), acetato de amônio (0,2M) e dextrana (10%; PM 70.000; Sigma). As soluções crioprotetoras foram preparadas em água destilada em uma concentração 2 vezes maior que a utilizada durante a estocagem e esterilizadas por filtração em membranas (tipo HA, Millipore Corp.).

Procedimento experimental - Os bacteriófagos temperados foram obtidos por indução dos estreptococos com mitomicina C em caldo N6 e posterior propagação na cepa indicadora (6). Os lisados foram esterilizados por filtração em membrana e titulados em um crescimento confluente da amostra K56 (3). Ao lisado adicionou-se a solução crioprotetora (1:1, v/v) e a mistura foi estocada a 4°C e a -20°C. Após o período de estocagem (7 ou 35 dias), a percentagem de fagos viáveis foi calculada, tomando-se como base os títulos de antes e após estocagem. O mesmo procedimento experimental foi utilizado para bacteriófagos sedimentados a 100.000g por 2 horas e ressuspensos em tampão fosfato de sódio 0,01M, pH 7,0, contendo 0,15M de cloreto de sódio.

Resultados

Lisados contendo bacteriófagos temperados das amostras designadas com nos 79.031, 79-187, 79-270 e 80-019 após terem sido estocados durante 35 dias a -20°C, apresentaram uma redução intensa na sua infectividade, mesmo na presença dos agentes crioprotetores estudados. As taxas de sobrevivência ficaram abaixo de 1% do título de fagos (que se situou entre 10⁶ e 10⁷ unidades formadoras de placas de lise/ml). Do mesmo modo, quando esses fagos foram estocados a 4°C, os aditivos utilizados não foram capazes de protegê-los contra a inativação e observamos taxas de sobrevivência semelhantes às obtidas a -20°C. Na maioria das misturas fago/crioprotetor, tanto a 4°C como a -20°C, foi verificado ausência de placas de

lise na cepa indicadora, indicando assim, uma perda total da infectividade viral, após o período de estocagem.

Com o objetivo de verificarmos o comportamento desse bacteriófago durante um período mais curto, um dos fagos estudados (obtido da amostra nº 79-270) foi estocado durante 7 dias. Observamos que ocorreu uma acentuada inativação desses bacteriófagos, mesmo a 4°C, com uma percentagem de sobreviventes variando de 1,0 a 3,8%. Por outro lado, ao estocarmos esses fagos lavados e ressuspensos em tampão fosfato, verificamos que esses vírus puderam ser recuperados quando estocados a 4°C após 35 dias na ausência de quaisquer aditivos, mantendo em torno de 31% da infectividade.

Melhores resultados foram obtidos quando estes fagos foram estocados na presença dos diferentes crioprotetores. Verificamos que na temperatura de 4°C, o acetato de amônio, a dextrana e a sacarose foram capazes de proteger eficientemente a infectividade viral, visto que aproximadamente 100% dos fagos puderam ser recuperados. Por outro lado, observamos que a -20°C ocorreu uma maior inativação desses fagos, uma vez que as porcentagens de fagos infectivos variavam de 10 a 69% para os crioprotetores acima (Tabela 1).

Discussão

Uma variedade de aditivos tem sido utilizados, isolados ou em mistura, para prevenir a inativação pelo congelamento e descongelamento de suspensões virais e de outros microrganismos. Usando como modelo os bacteriófagos T4 e T4BO de *E. coli* tornou-se possível demonstrar três distintos mecanismos de inativação durante congelamento e descongelamento, o denominado choque osmótico, a desnaturação por sais à baixa temperatura e a cristalização eutética. O mecanismo exato pelo qual os aditivos crioprotetores atuam prevenindo os danos causados durante esse processo não foi ainda esclarecido (10, 13).

A eficiência de baixas concentrações de substâncias como a glicose, polivinilpirrolidona, sacarose, glicerol e outras na proteção contra esses danos, foi demonstrada para o fago T4BO de *E. coli* (14). Nesse trabalho, foi observado que dos aditivos crioprotetores utilizados, em ordem decrescente de proteção, os mais eficientes foram acetato de amônio > sacarose > glicerol > dimetil sulfóxido. Os polímeros dextrana e polivinilpirrolidona em concentrações de 10% mostraram eficácia semelhante ao da sacarose nesta mesma concentração. Entretanto, bacteriófagos temperados de *S. pyogenes* congelados a -20°C não foram preservados por tais substâncias.

Em nossos estudos, verificamos que os bacteriófagos temperados de *S. pyogenes* tiveram a sua infectividade preservada quando estocados em presença de certas substâncias crioprotetoras à temperatura de 4°C, após purificação parcial através de lavagens em tampão fosfato de sódio. Os crioprotetores mais eficazes na recuperação da infectividade viral foram o acetato de amônio, a dextrana e a sacarose.

A inativação dos fagos quando presentes no lisado da propagação bacteriana e

Tabela 1 - Estocagem de bacteriófagos temperados de *S. pyogenes* na presença de substâncias crioprotetoras durante 35 dias^a.

Símbolos: a = Os bacteriófagos temperados foram obtidos conforme descrito em Materiais e Métodos e lavados duas vezes em tampão fosfato de sódio 0,01M, pH 7,0, contendo 0,15M de cloreto de sódio. O título inicial de fagos foi de 7,0 x 10⁶ unidades formadoras de placas de lise por mililitro.; b = As percentagens de recuperação da infectividade viral foram representadas como se segue: +, ≤ 10%; ++, 11 a 39%; +++, 40 a 69%; +++, 70 a 100%.

Substâncias crioprotetoras	Concentração	Temperatura de estocagem	
		4°C	-20°C
Nenhuma		++ ^b	+
Sacarose	0,2M	++++	++
Gelatina	0,1%	++	++
Glicerol	10%	+	+
Dimetil sulfóxido	0,1M	++++	+++
Acetato de amônio	0,2M	++++	+++
Dextrana	10%	++++	+++

estocados a 4°C, e a sua parcial estabilidade após lavagens em tampão, parecem sugerir que tais vírus poderiam ser inativados por produtos bacterianos presentes em tais lisados. Esses dados estão de acordo com observações anteriores de que tais bacteriófagos se mantêm mais estáveis após purificação por ultracentrifugação em gradientes de cloreto de césio (2). A adição de certas substâncias crioprotetoras parece impedir ou dificultar tal inativação.

Os fagos temperados não puderam ser satisfatoriamente conservados a -20°C provavelmente devido a alta instabilidade das estruturas desses vírus. Em estudos de ultraestrutura viral realizados por nós, já tínhamos constatado que estes bacteriófagos apresentam-se altamente instáveis, sendo frequente a observação de estruturas fágicas isoladas e usualmente o capsídeo viral apresentam-se vazios, ou seja, sem o ácido nucleico (3).

Referências Bibliográficas

1. Behnke, D. & Malke, H. - Bacteriophage interference in *Streptococcus pyogenes*. *Virology*, 85:118-128, 1978.
2. Benchetrit, L.C.; Gray, E.D. & Wannamaker, L.W. - Hyaluronidase activity of bacteriophages of group A streptococci. *Infect. Immun.*, 15:527-532, 1977.
3. Benchetrit, L.C. & Figueiredo, A.M.S. - Isolation of bacteriophages from *Streptococcus pyogenes*. *Rev. Microbiol. (São Paulo)*, 12:79-83, 1981.
4. Benchetrit, L.C. & Figueiredo, A.M.S. - Hyaluronidase associated with temperate bacteriophages from *Streptococcus pyogenes*. *Rev. Microbiol. (São Paulo)*, 12:125-128, 1981.
5. Clearly, P.P.; Wannamaker, L.W.; Fisher, M. & Laible, N. - Studies of the receptor for phage A25 in group A streptococci: the role of peptidoglycan in reversible adsorption. *J. Exp. Med.*, 145:578-593, 1977.
6. Figueiredo, A.M.S.; Benchetrit, L.C.; Skjold, S.S.; Deziel, M. & Wannamaker, L.W. - Lisogenia em estreptococos do grupo A e avaliação de meios de cultura para detecção de bacteriófagos temperados obtidos desses microrganismos. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 25:16-21, 1983.
7. Friend, P.L. & Slade, H.D. - Characteristics of group A streptococcal bacteriophages. *J. Bacteriol.*, 29:148-154, 1966.
8. Hill, J.E. & Wannamaker, L.W. - Identification of a lysin associated with a bacteriophage (A25) virulent for group A streptococci. *J. Bacteriol.*, 145:696-703, 1981.
9. Kjems, E. - Studies on streptococcal bacteriophages. 3. Hyaluronidase produced by the streptococcal phage-host cell system. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 44:429-439, 1958.
10. Leibo, S.P. & Mazur, P. - Freezing of bacteriophages T4: temperature and rate effects as a function of salt concentration. *Virology*, 38:358-366, 1969.
11. Nida, K.S. & Ferretti, J.J. - Phage influence on the synthesis of extracellular toxins in group A streptococci. *Infect. Immun.*, 36:745-750, 1982.
12. Read, S.E. & Reed, R.W. - Electron microscopy of the replication events of A25 bacteriophages in group A streptococci. *Can. J. Microbiol.*, 18:93-96, 1972.
13. Steele, P.R.M.; Davis, J.D. & Greaves, R.I.N. - Some factors affecting the viability of freeze-thawed T4 bacteriophages. *J. Hyg.*, 67:107-111, 1969.
14. Steele, P.R.M. - Prevention of low temperature denaturation injury in T4BO phage by low concentrations of cryoprotective additives. *J. Hyg.*, 76:453-458, 1976.
15. Stuart, J.G. & Ferretti, J.J. - Transduction of rifampin resistance in group A streptococci. *J. Bacteriol.*, 115:709-710, 1973.
16. Wannamaker, L.W.; Almquist, S. & Skjold, S.S. - Intergroup phage reactions and transduction between group C and group A streptococci. *J. Exp. Med.*, 137:1338-1353, 1973.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL E IMPORTÂNCIA CLÍNICA DA GARDNERELLA VAGINALIS, EM PACIENTES COM INFECÇÃO VAGINAL

Terezinha Inez Estivalet Svidzinski
Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira
& Francisco Herrero

Depte de Farmácia Bioquímica
Fundação Universidade Estadual de Maringá
Av. Colombo, 3690
87020 Maringá PR, Brasil

Recebido para publicação em 05/02/88

Resumo

Foram estudados fluxos cérvico-vaginais de 145 pacientes ambulatoriais com idade entre 16 e 52 anos. Sessenta e cinco pacientes, que apresentavam sintomas clínicos de infecção vaginal foram enquadrados no grupo das sintomáticas. Setenta e seis pacientes sem infecção genital aparente, constituíram o grupo controle, onde não houve isolamento de *Gardnerella vaginalis*. Das 65 pacientes sintomáticas 19 (29%) apresentaram *G. vaginalis* no seu trato genital, 12 (18%) *Trichomonas vaginalis* e 7 (11%) *Candida albicans*. Apenas em um dos casos houve associação de *G. vaginalis* e *T. vaginalis*. Neste estudo a *G. vaginalis* foi o mais importante patógeno isolado de mulheres com infecção vaginal.

Summary

The clinical importance and laboratory diagnosis of Gardnerella vaginalis in patients with vaginal infections

The vaginal discharge of 145 women 16 to 52 years old were studied. 65 patients had symptoms of vaginal infection; 76 patients without symptoms were studied as controls. Of the 65 symptomatic patients, 19 (29%) had *Gardnerella vaginalis*, 12 (18%) had *Trichomonas vaginalis* and 7 (11%) had *Candida albicans* isolated in their genital tracts. Only one of the symptomatic patients had both *G. vaginalis* and *T. vaginalis* isolated. *G. vaginalis* was not isolated in the control group. In this study, *G. vaginalis* is the most common pathogen isolated in women with vaginal infections.

Introdução

Gardnerella vaginalis, bacilo Gram negativo imóvel, pleomórfico, classificado primeiramente como *Haemophilus vaginalis* mais tarde como *Corynebacterium vaginale*, foi isolado do trato genito-urinário feminino por Leopold (2) em 1953.

Muitos trabalhos tem mostrado a importância deste microrganismo em vaginites, cervicites e uretrites pois tem sido isolado mais frequentemente em pacientes com sinais clínicos de infecção, do que em pacientes controles. Alguns estudos clínicos e bacteriológicos realizados nos últimos anos deram muita ênfase à participação de *G. vaginalis* em infecções do trato uro-genital feminino (1, 4, 9, 10, 11).

Por outro lado pesquisadores demonstraram que a *G. vaginalis* pode colonizar assintomaticamente a uretra e a vagina, sem nenhuma associação com vaginites ou uretrites (6, 7, 8).

É de se supor que um número mínimo de *G. vaginalis* esteja de fato, presente na vagina sem contudo causar danos, mas fatores como irritações da mucosa, alterações no metabolismo celular local ou do pH podem conduzir, entretanto, a um aumento rápido do agente patogênico, levando ao aparecimento de infecção, que pode, no caso de gestantes, atingir inclusive o feto.

Várias pesquisas que tentam correlacionar a ocorrência de *G. vaginalis* com formas infeciosas da vagina humana (1, 4, 8, 9, 10) tem apresentado resultados e conclusões que se contradizem exigindo um estudo criterioso sobre a ocorrência desta bactéria nas vaginites.

Na rotina laboratorial são utilizadas normalmente as técnicas bacteriológicas presuntivas e estas não permitem um diagnóstico seguro da infecção causada pela *G. vaginalis*. Este trabalho teve como objetivo estabelecer uma metodologia que pudesse ser introduzida no Laboratório de Ensino e Pesquisas em Análises Clínicas (LEPAC) da Universidade Estadual de Maringá e com isso avaliar a ocorrência de *G. vaginalis* nas pacientes atendidas por este laboratório.

Material e Métodos

Foram estudados fluxos cérvico-vaginais de 145 pacientes ambulatoriais que apresentavam entre 16 e 52 anos de idade. Todas elas foram submetidas a exame ginecológico completo realizado pelo médico ginecologista e obstetra. O médico coletava uma série de dados relativos à saúde da paciente, importantes para o estabelecimento do diagnóstico, e que, aliados ao exame clínico possibilitava triar as pacientes e enquadrá-las em dois grupos. O primeiro constituído de 65 pacientes, foi denominado de sintomático pois estas apresentavam sintomas clínicos, como prurido e aumento de secreção vaginal. Embora o exame microscópico de algumas pacientes revelasse intensa reação leucocitária a maioria apresentava apenas evidência de uma flora normal bacteriana em desequilíbrio. Outras 76 pacientes, representaram o grupo controle ou de assintomáticas; estas não apresentavam nenhuma queixa clínica pois procuravam o médico para exames de rotina. Nestes casos a microscopia indicava reação leucocitária normal e equilíbrio de flora, sugerindo um pH vaginal ácido, dentro da normalidade.

Cada material biológico foi submetido à metodologia indicada a seguir, utilizada por Dunkelberg (3) e Shaw (12).

Imediatamente após a coleta, uma gota do exsudato era colocada sobre lâmina de vidro e acrescentada 1 gota de KOH 20% para observação de odor característico. Outras três lâminas com esfregaço desse material, eram remetidas ao LEPAC, para posteriormente serem coradas pelo Gram possibilitando uma avaliação da reação leucocitária, células epiteliais e características gerais da flora microbiana. Três frascos contendo o material biológico, eram também remetidos ao LEPAC dentro de no máximo 6 horas. Um deles continha 2ml de salina fisiológica a 0,85% e se destinava ao exame microscópico a fresco para pesquisa das "clue cells", leveduras e *Trichomonas* sp. Os outros dois frascos continham meios de transporte apropriados para preservação da bactéria objeto desta pesquisa. O meio de Amies, semi-sólido, tradicionalmente empregado em microbiologia clínica para transporte de vários materiais biológicos, e o meio líquido de proteose peptona nº 3 a 1,5% utilizado por Dunkelberg (2, 3).

No setor de microbiologia o material contido nestes meios de transporte foi repicado para placas com meio de PSD (Proteose Starch Dextrose) e Ágar vaginalis (Ágar sangue humano, preconizado por Greenwood & Pickett (5), utilizando como base o "Columbia ágar base" adicionado de proteose peptona nº 3 Difco). Estes meios foram

incubados por 48 horas, em atmosfera contendo 5 a 10% de CO₂, em estufa microbiológica a 35°C.

Das colônias desenvolvidas no meio de PSD e que se apresentavam esbranquiçadas, opacas, com bordas bem regulares, medindo em média 0,5mm de diâmetro e com forma discretamente cônica, eram confeccionados esfregaços para serem corados pelo método de Gram, com a finalidade de observar a Gram labilidade, achado comum em culturas da *G. vaginalis*. Ainda dessas colônias foram realizadas as provas da catalase, oxidase e repiques para o meio utilizado por Dunkelberg (3) a fim de se avaliar a capacidade de fermentação da glicose, maltose e amido, e para ágar sangue de carneiro com o objetivo de observar a hemólise e crescimento característico na forma de "nuvem". O Ágar V foi utilizado a exemplo do que fez Shaw (11) para fornecer uma característica diferencial a mais ou seja, a evidenciação da beta hemólise difusa que a *G. vaginalis* produz em sangue humano, comportando-se de maneira diferente daquela apresentada no sangue de carneiro. Além disso o seu uso no primeiro isolamento, em função dessa característica, auxilia o observador a suspeitar de crescimento da referida bactéria.

Resultados

Dos 65 casos com sintomatologia de vaginite, foram obtidos 19 culturas positivas para *G. vaginalis*. Das 46 pacientes cujas culturas resultaram negativas, 12 apresentaram infecção por *Trichomonas vaginalis* e 7 por *Candida* sp. Apenas 1 dos casos positivos para *G. vaginalis*, foi observado associação por *Trichomonas vaginalis* (Tabela 1).

Das 76 culturas de secreção vaginal realizada em pacientes assintomáticos, isto é, pacientes consideradas controles, não foi isolado *G. vaginalis*, como também, não foi observada a presença de *Trichomonas vaginalis*, e *C. albicans*.

Comparando-se os testes de diagnóstico presuntivo com a cultura e identificação bioquímica (diagnóstico definitivo) foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 2, que levam a constatar que a pesquisa destas células deve continuar sendo considerada apenas diagnóstico presuntivo de infecção.

Tabela 1 - Achados microbiológicos nos 65 casos sintomáticos, em relação aos microrganismos estudados.

	Nº de casos	%
Isolamento de <i>Gardnerella vaginalis</i>	19	29
Observação de <i>Trichomonas vaginalis</i>	12	18
Observação de <i>Candida albicans</i>	7	11
Isolamento de <i>G. vaginalis</i> e observação de <i>T. vaginalis</i>	1	1
Sem isolamento e/ou observação destes agentes patogênicos	27	41

Tabela 2 - Relação entre o diagnóstico presuntivo e o definitivo da infecção por *G. vaginalis*.

	Nº de casos	%
Presença de "clue cells" com isolamento de <i>G. vaginalis</i>	13	59
Presença de "clue cells" sem isolamento de <i>G. vaginalis</i>	1	5
Ausência de "clue cells" com isolamento de <i>G. vaginalis</i>	4	18
Presença de células epiteliais com bactérias aderidas a superfície (grânulos inespecíficos com isolamento de <i>G. vaginalis</i>)	2	9
Presença de células epiteliais com bactérias aderidas a superfície (grânulos inespecíficos sem isolamento de <i>G. vaginalis</i>)	2	9
Total	22	100

Discussão

Alguns pesquisadores têm demonstrado a colonização assintomática da uretra e vagina pela *G. vaginalis*, sem nenhuma associação com vaginites e uretrites (6, 7, 8), porém em nossos achados nenhuma paciente do grupo controle apresentou *G. vaginalis* em seu trato genital. Embora exista a suposição de que um mínimo de *G. vaginalis* esteja normalmente presente na vagina sem causar danos, nos 76 casos assintomáticos estudados, não foi possível constatar este fato.

Todos os 19 casos de isolamento de *G. vaginalis*, ocorreram em pacientes com sinais clínicos de infecção. Dos 46 casos sintomáticos em que não foi isolado *G. vaginalis* foi observado *Trichomonas vaginalis* em 12 casos e em 7, leveduras do tipo *Candida* sp, que são considerados patógenos comumente relacionados com infecção do trato genito-urinário feminino.

Outros patógenos responsáveis por vaginites, tais como *Mycoplasma* sp, *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* não foram pesquisados, podendo ser esta a explicação de não ter sido possível estabelecer diagnóstico laboratorial em 27 pacientes com sintomatologia clínica.

O diagnóstico presuntivo, estabelecido pelo exame microscópico direto com observação das "clue cells", pode ser comparado aos resultados obtidos após a cultura do material biológico. Foi observado a presença de "clue cells" características em treze dos dezenove casos em que foi isolado *G. vaginalis*. Em quatro casos não foi observado "clue cells" e em dois a presença de células epiteliais com bactérias aderidas à superfície (grânulos inespecíficos) deixaram dúvidas no estabelecimento do diagnóstico presuntivo. Em apenas um caso foi observado a presença de "clue cells" típicas, porém sem isolamento da *G. vaginalis*. A coloração de Gram tem sido utilizada como diagnóstico presuntivo associada ao exame à fresco. Porém, no presente trabalho, esta não trouxe contribuição significativa permitindo observar nos casos de isolamento de *G. vaginalis* apenas a presença de uma flora mista abundante. Em relação a reação leucocitária na maioria dos casos esta foi discreta, embora tenha sido observada a presença abundante de leucócitos em alguns casos. Através destes resultados podemos sugerir que a presença de "clue cells" pelo exame microscópico direto associado a coloração de Gram, deve ser considerada apenas como diagnóstico presuntivo do envolvimento da *G. vaginalis*, sendo que a realização de cultura é essencial para o diagnóstico definitivo.

A metodologia proposta no presente trabalho foi criteriosamente obedecida para todos os casos, proporcionando o isolamento de colônias típicas, que não deixaram dúvidas quanto a morfologia colonial da *G. vaginalis*. Em dois casos o crescimento desta foi discreto acompanhado do desenvolvimento da flora mista bacteriana. A recuperação da *G. vaginalis* foi possível mesmo nestes casos que apresentavam pequena quantidade de microrganismos no material biológico.

Os dois meios de transporte utilizados conservaram adequadamente o material biológico ou seja, foi possível isolar *G. vaginalis* independentemente do meio de transporte utilizado. Porém a Proteose Peptona nº 3 Difco, por ser um meio líquido, possibilitava uma diluição do material biológico fornecendo resultados melhores que o Amies em relação à obtenção, no cultivo em meio sólido, de colônias isoladas com morfologia característica. O meio de Amies devido a sua consistência sólida, não permitia uma boa homogeneização do material biológico. Sugerimos, portanto, a utilização da Proteose Peptona nº 3 Difco para preservação e recuperação adequada da *G. vaginalis*.

O aspecto e o odor do exsudato são comumente utilizados na suspeita clínica de infecção pela *G. vaginalis*. No presente trabalho estes dados não auxiliaram no diagnóstico. O aspecto da secreção e o odor característico, nos casos sintomáticos, variou independentemente do isolamento da *G. vaginalis*.

Através dos resultados obtidos podemos observar que foi possível estabelecer uma metodologia para diagnóstico laboratorial de infecção por *G. vaginalis*. A mesma vem sendo utilizada rotineiramente com êxito no setor de Microbiologia Clínica do LEPAC, podendo ser implantada em qualquer laboratório de Análises Clínicas.

Gardnerella vaginalis foi isolada apenas no exsudato dos pacientes que apresentavam sintomatologia clínica a qual, após tratamento direcionado desapareceu completamente. Este fato, levou-nos a concluir que o referido microrganismo esteja envolvido em processos infeciosos do trato genital feminino, devendo portanto ser pesquisado e o seu isolamento valorizado.

Agradecimentos

Agradecemos ao Dr. Nelson Uchimura, médico ginecologista e obstetra de Maringá, pela realização da triagem clínica das pacientes.

Referências Bibliográficas

1. Baldson, M.J.; Pead, D.L.; Taylor, G.E. & Maskell, R. - *Corynebacterium vaginalis* and vaginitis: a controlled trial of treatment. Lancet, 1:501-503, 1980.
2. Dunkelberg, Jr., W.E. & Weight, I.M. - Growth requirements of *Haemophilus vaginalis*. Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol., 35:129-145, 1969.
3. Dunkelberg, Jr., W.E.; Skaggs, R. & Kellogg Jr., D.S. - Method for isolation and identification of *Corynebacterium vaginalis* (*Haemophilus vaginalis*). Appl. Microbiol., 19:47-52, 1970.
4. Gardner, H.L. & Dukes, C.D. - *Haemophilus vaginalis* vaginitis Amer. J. Obstet. Gynecol., 69:962-976, 1955.
5. Greenwood, Jr. & Pickett, M.J. - Salient features of *Haemophilus vaginalis*. J. Clin. Microbiol., 9:200-204, 1979.
6. Levison, M.E.; Corman, L.C.; Carrington, E.R. & Kaye, D. - Quantitative microflora of the vagina. Am. J. Obstet. Gynecol., 127:80-85, 1977.
7. Lewis, J.F. - *Haemophilus vaginalis*, sexually transmitted disease J. Clin. Path., 56:580-583, 1971.
8. Mc Cormack, W.M.; Hayes, C.H. & Rosner, B. - Vaginal colonization with *Corynebacterium vaginalis* (*Haemophilus vaginalis*). J. Infect. Dis., 136:740-745, 1977.
9. Palhano, Jr., L.; Souza, H.A. & Prest, A.C. - *Gardnerella* (*Haemophilus vaginalis*) e sua importância na clínica ginecológica. Rev. Bras. Anal. Clin., 15:7-12, 1983.
10. Pheifer, T.A.; Forsyth, P.S.; Durfee, M.A.; Pollock, H.M. & Holmes, K.K. - Nonspecific vaginitis role of *Haemophilus vaginalis* and treatment with metronidazole. N. Engl. J. Med., 298:1429-1434, 1978.
11. Rocha, D.T.S.; Formiga, L.C.D.; Villela, L.H.C. & Marques, E.A. - Ocorrência, identificação e preservação de *Gardnerella vaginalis*. Resumo apresentado no XII Congresso Brasileiro de Microbiologia. São Paulo, 1983.
12. Shaw, C.E.; Forsyth, M.E.; Bowie, W.R. & Black, W.A. - Rapid Presumptive identification of *Gardnerella vaginalis* (*Haemophilus vaginalis*) from human blood agar media. J. Clin. Microbiol., 14:108-110, 1981.

LISOGÉNIA E RESISTÊNCIA À TETRACICLINA EM ESTREPTOCOCOS DO GRUPO A

Agnes Marie Sá Figueiredo
 Corsina Velazco
 & Leslie C. Benchetrit

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

Recebido para publicação em 11/04/88

Resumo

Lisogenia em amostras de estreptococos do grupo A foi examinada. Verificou-se que entre as lisogênicas a resistência à tetraciclina era mais comum.

Summary

Lysogeny and resistance to tetracycline in group A streptococci

Lysogeny was examined among group A streptococci. Resistance to tetracycline was more common among lysogenic strains.

Vários estudos indicam que lisogenia é comum em estreptococos do grupo A e que bacteriófagos temperados poderiam estar envolvidos na patogenicidade dos microrganismos (6). Por outro lado, a constatação de que certos produtos estreptocócicos são mediados por fagos sugere que a resistência a certas drogas poderia também ser controlada via fago lisogênico (5). Neste trabalho nós examinamos quanto à presença de lisogenia amostras de estreptococos do grupo A visando detectar uma possível relação entre lisogenia, origem clínica das amostras e susceptibilidade à antimicrobianos.

Foram estudadas 178 amostras estreptocócicas. Estas foram divididas em categorias, de acordo com sua origem clínica (infecções na orofaringe, na pele ou portadores sãos na orofaringe). As amostras foram também agrupadas de acordo com o seu comportamento frente aos antimicrobianos utilizados.

Os fagos foram obtidos através de indução das amostras bacterianas com mitomicina C (2, 4).

O antibiograma das amostras foi realizado conforme técnica já descrita anteriormente (1), utilizando-se os seguintes discos contendo antimicrobianos: ampicilina, 10 μ g; carbenicilina, 50 μ g; cefalotina, 30 μ g; cloranfenicol, 30 μ g; colistina, 10 μ g; eritromicina, 15 μ g; gentamicina, 10 μ g; canamicina, 30 μ g; lincomicina, 2 μ g; ácido nalidíxico, 10 μ g; neomicina, 30 μ g; penicilina G, 10 unidades; sulfametoxazol-trimetoprim, 23,75/1, 25 μ g; tetraciclina, 30 μ g e cefoxitina, 30 μ g.

A concentração mínima inibitória (CMI) para tetraciclina foi determinada para 25 amostras lisogênicas e 21 não lisogênicas. O método utilizado foi o da diluição do antibiótico em meio sólido, descrito por Erisson & Sherris (3).

Foram isoladas 105 amostras de estreptococos do grupo A de lesões na pele, 39 de pacientes com dados clínicos compatíveis com infecções no orofaringe e 34 amostras de pacientes sãos portadores do microrganismo. Observamos lisogenia em 15 (14,3%) das amostras isoladas da pele, em 5 (12,8%) das amostras obtidas de pacientes com infecções no orofaringe e, em 3 (8,8%) de indivíduos portadores. O teste das proporções ($H_0: P_1 = P_2$) não evidenciou diferenças significativas entre lisogenia e a

origem das amostras. Dos antimicrobianos testados, verificamos que apenas para tetraciclina houve uma diferença significativa ($P = 0,04$) entre as percentagens de resistência das amostras lisogênicas e não lisogênicas. Das 23 amostras lisogênicas estudadas, 19 (83%) foram resistentes a esta droga e das 100 amostras não lisogênicas testadas, 60 (60%) apresentaram resistência a tetraciclina. Com o objetivo de se confirmar tais resultados a determinação da CMI foi realizada e verificamos através da análise estatística utilizando o teste U de Mann Whitney que as amostras lisogênicas apresentavam uma tendência marcada a possuirem CMIs mais elevadas.

Esses dados são consistentes com aqueles que atribuem um possível papel ecológico aos fagos endógenos na transferência de resistência a antibióticos em estreptococos, em seu ambiente natural (5). Estudos estão no momento sendo realizados em nosso laboratório visando-se determinar se a transferência de resistência à tetraciclina ocorre via conversão lisogênica.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo CNPq, FINEP, CAPES, CEPG da UFRJ e PADCT.

Agradecemos a Maria Cícera da Silva por seu auxílio técnico nos experimentos desenvolvidos neste trabalho.

Referências Bibliográficas

1. Bauer, A.W.; Kirby, W.H.M.; Sherris, J.C. & Turck, M. - Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45:493-496, 1966.
2. Benchetrit, L.C.; Gray, E.D. & Wannamaker, L.W. - Hyaluronidase activity of bacteriophages of group A streptococci. *Infect. Immun.*, 15:427-532, 1977.
3. Ericsson, H.M. & Sherris, J.C. - Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B Suppl.*, 217:1-90, 1971.
4. Figueiredo, A.M.S.; Benchetrit, L.C.; Skjold, S.S.; Deziel, M. & Wannamaker, L.W. - Lisogenia em estreptococos do grupo A e avaliação de meios de cultura para a detecção de bacteriófagos temperados obtidos desses microrganismos. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 25:16-21, 1983.
5. Hyder, S.L. & Streitfeld, M.M. - Transfer of erythromycin resistance from clinically isolated lysogenic strains of *Streptococcus pyogenes* via their endogenous phage. *J. Infect. Dis.*, 138:281-286, 1978.
6. Quinn, R.W. & Lowry, P.N. - Streptococcal L forms and phage. A clinical-epidemiologic study. *Yale J. Biol. Med.*, 47:86-92, 1974.

SALMONELLA EM ÁGUA DE PRAIAS DO MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO, RJ

Dália dos Prazeres Rodrigues
 Claude André Solari
 Roseli Vígio Ribeiro
 Júlio Eugênio C. Moura Costa
 Eliane M. Falavina dos Reis
 Sebastião J. da Silva Filho
 & Ernesto Hofer

Recebido para publicação em 13/04/88

Deptº de Bacteriologia
 Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ
 Caixa Postal 926
 20010 Rio de Janeiro RJ

Resumo

Investigou-se a presença de *Salmonella* em água de praias localizadas em diferentes áreas do município do Rio de Janeiro. Durante o período de janeiro a dezembro de 1985, 53 amostras foram examinadas, utilizando-se como processo primário para concentração da população microbiana, a filtração de volumes de 1 litro de água através de duas membranas de Millipore ($0,45\mu\text{m}$). Uma membrana foi triturada e suspensa em solução salina tamponada com fosfatos pH 7,4. A outra bipartida, e cada metade semeada em meios de enriquecimento e seletivo-indicadores. Constatou-se a ocorrência de *Salmonella* em 13,2% das amostras, verificando-se a predominância de sorotipos pertencentes ao subgênero I (Le Minor, Véron & Popoff, 1982), representados por *S. typhimurium*, *S. agona* e *S. oranienburg*, principalmente, nas praias mais poluídas por esgotos.

Summary

Salmonella from sea water collected in the beaches of Rio de Janeiro city

A search for *Salmonella* was done from January to December 1985 in fifty-three samples of sea water from beaches localized in distinct areas of the city of Rio de Janeiro. Besides the bacteriological investigation, related to environmental pollution, were considered. The samples were initially processed aiming to the concentration of microbial population, using 1000ml of water filtered through Millipore membranes, $0,45\mu\text{m}$ porosity. For isolation, a membrane was grinded and suspend in phosphate buffer solution (PBS) pH 7,4 and the other one was divided in two parts. Both halves were cultured in enrichment broth and selective plating media. *Salmonella* were detected in 13,2% of samples showing predominance of serovars belonging to the subgenus I (Le Minor, Véron & Popoff, 1982), with *S. typhimurium*, *S. agona* and *S. oranienburg* as prevalent. They were found mainly in sewage polluted beaches.

Introdução

O ambiente marinho, particularmente nas áreas costeiras sofre, de modo constante, Rev. Microbiol., São Paulo, 20(1): 12-17 , Jan./Mar. 1989.

o problema de contaminações de natureza variada. Entre as mais comuns, há o lançamento contínuo de esgotos, tratados ou não, em estuários, praias, rios, etc. Em menor escala, a contaminação microbiana poderá resultar tanto de águas residuais e dejetos lançados por embarcações, principalmente nas zonas portuárias e pesqueiras, como também, de excreções de aves marinhas (1, 22).

Entre os vários patógenos bacterianos veiculados por tal mecanismo, destaca-se a *Salmonella*, sugerida por alguns autores, como um verdadeiro parâmetro para avaliação sanitária de águas, principalmente, por sua capacidade de sobrevivência ou resistência nos diversos sistemas aquáticos (11, 24).

Considerando as limitadas informações em nosso meio sobre o problema em pauta, foi desenvolvido este trabalho no sentido de avaliar a ocorrência de *Salmonella* em água de praias localizadas no município do Rio de Janeiro.

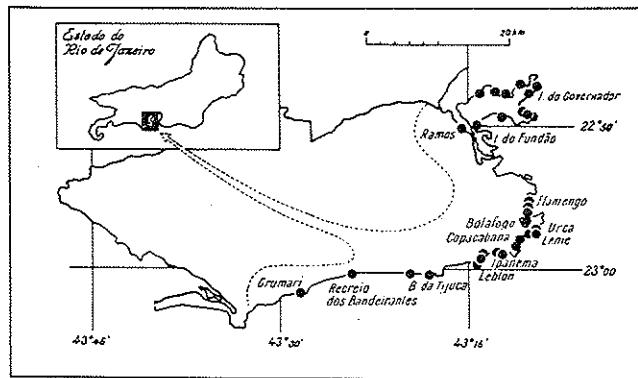
Material e Métodos

Amostragem - Foram selecionadas 22 praias, localizadas no interior e fora da baía da Guanabara, compreendendo a faixa desde a Ilha do Governador até Grumari (Figura 1). No período de janeiro a dezembro de 1985, foram colhidos semanalmente de uma das praias, 2 litros de água em frascos esterilizados. Para a obtenção da amostra, o técnico penetrava no mar até uma distância de um metro e promovia a abertura do frasco a uma profundidade de 30cm (mergulhando todo o antebraço) contra a corrente. As amostras foram conservadas à temperatura de 4 a 8°C, em recipiente de isolamento térmico, sendo analisadas no laboratório, no prazo máximo de 3 horas após a colheita.

Nesta etapa, determinava-se o pH (papel indicador Merck, pH 6.5 a 10.0) e a temperatura.

Figura 1 - Áreas de colheita das amostras.

Símbolos: ● = Pontos de coleta.



Análise laboratorial - A amostra era homogeneizada por agitação manual durante um minuto, e dividida em duas porções de 1000ml. Cada porção era filtrada na membrana de éster de celulose, porosidade 0,45 μ m (Millipore), visando concentrar a população bacteriana. Em seguida, adotaram-se os seguintes procedimentos:

1. Uma das membranas, foi introduzida em tubo contendo 5ml de salina tamponada com fosfatos (PBS), pH 7.4 e, triturada com auxílio de um bastão de vidro estéril. Desta suspensão, foram inoculados volumes de 0,1 e 0,5ml em Agar Sulfito de Bismuto (Difco), respectivamente em superfície e profundidade "pour plate". Inóculos de 1ml foram adicionados ao meio de Rappaport, 1^a modificação de Hofer (4) e em Caldo

Tetrationato, segundo Edel & Kampelmacher (6). Todos os meios foram incubados por 24 horas a 37°C, exceto o último, mantido a 42°C.

2. A outra membrana sofreu bipartição, sendo cada uma das metades introduzidas em tubos contendo 10ml dos meios de enriquecimento assinalados e impondo-se as mesmas condições de cultivo supramencionadas excetuando-se a semeadura em Agar Sulfito de Bismuto.

Os meios seletivo-indicadores utilizados na etapa subsequente, corresponderam ao Agar Sulfito de Bismuto (Difco), Agar Xilose Lisina Desoxicócolato (Difco), Agar Hektoen (Difco) e Agar Eosina Azul de Metíleno (Difco), incubados a 37°C por 24/48 horas.

Após incubação, 5 a 10 colônias suspeitas, isoladas de cada um dos meios seletivo-indicadores, foram repicadas para o meio de triagem de Costa & Vérni (4), seguindo-se a identificação bioquímica definitiva, de acordo com Edwards & Ewing (8) e Costa & Hofer (4).

As amostras caracterizadas bioquimicamente como *Salmonella* foram classificadas segundo a proposição de Le Minor, Véron & Popoff (17), empregando-se os seguintes testes: fermentação do dulcitol, lactose, sacarose; hidrólise da gelatina e do orto-nitro fenil galactopiranosídeo (ONPG); utilização de malonato, d e L-tartarato, mucato e galacturonato; crescimento em KCN; atividades da gama-glutamil transferase, beta-glucuronidase e do bacteriófago 01.

Como etapa final, procedeu-se a caracterização antigênica através da técnica de aglutinação rápida, utilizando antissoros somáticos (O) e flagelares (H), produzidos pelo Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz (4).

Resultados

Das 53 amostras de águas analisadas, obteve-se o isolamento de *Salmonella* em sete oportunidades (13,2%). A distribuição pelos diferentes pontos de coleta está registrada na Tabela 1. Enfatiza-se que foram caracterizadas como praias oceânicas (O), aquelas localizadas fora da barra da baía da Guanabara, situadas entre o Leme e Grumari; as de entrada da baía da Guanabara (E), na faixa do Flamengo à Urca e as localizadas de Ramos à Ilha do Governador, foram classificadas como de interior da baía (I) - Figura 1.

O perfil bioquímico das salmonelas isoladas, indicou que todas as amostras pertenciam ao subgênero I (Le Minor, Véron & Popoff, 1982) e na identificação antigênica, foram reconhecidos nove sorotipos, ocorrendo predominantemente na praia de Ramos (Tabela 1).

No que se refere à metodologia, assinala-se que os processos de membrana triturada e partida ao meio, apresentam similaridade quanto aos resultados quantitativos. Contudo, os resultados são extremamente dispareus quando se relacionam qualitativamente os sorotipos isolados nos dois processos (Tabela 2).

Em relação aos meios de enriquecimento, o de Rappaport modificado propiciou o isolamento de sete amostras de *Salmonella* representando quatro sorotipos, resultado praticamente idêntico aquele obtido através do Caldo Tetrationato (Tabela 2). Quanto a eficiência das associações, meios de enriquecimento/seletivo-indicadores empregados, obteve-se os resultados mais satisfatórios nos esquemas: Rappaport modificado - Agar EMB ou Agar Hektoen e Caldo Tetractionato - Agar Hektoen (Tabela 2).

A técnica de semeadura direta em Agar Sulfito de Bismuto, tanto em superfície como em profundidade, das suspensões de membranas trituradas, só uma única vez possibilitou o isolamento de *S. typhimurium* (exame 02 - Flamengo).

Finalmente, o pH da água oscilou entre 6.5 a 8.9, concentrando-se 83% das colheitas e 100% de exames positivos para *Salmonella* na faixa de 6.5 a 6.8. No tocante a temperatura, que variou de 20 a 34°C, a totalidade dos isolamentos foi obtida entre 26 a 34°C.

Tabela 1 - Frequência dos sorotipos de *Salmonella* em relação às áreas de colheita e a sazonalidade.

Tipo de praia	Nº de colheitas	Exames com <i>Salmonella</i> Nº	Isolamento		Sorotipos
			% Local	Mês	
Oceânica (O)	22	1	4,5	Copacabana	Mai S. agona
Entrada de baía (B)	13	1	7,7	Flamengo	Jan S. typhimurium
Interior de baía (I)	18	5	27,7	I. Governador Ramos	S. montevideo S. oranienburg
				Ramos	S. emek
				Ramos	S. panama
				Ramos	S. hadar
				Ago	S. newlands
				Ramos	S. senftenberg
				Nov	S. agona
				Ramos	S. typhimurium
				Nov	S. oranienburg

Tabela 2 - Comportamento dos diferentes processos e meios de cultura utilizados no isolamento de *Salmonella* em amostras de águas de praias do Rio de Janeiro, RJ.

Símbolos: * Rap = Meio de Rappaport modificado; Te = Caldo tetratônato; BS = Agar sulfito de bismuto; EMB = Agar eosina azul de metileno; HK = Agar entérico Hektoen; XLD = Agar desoxicólate - xilose - lisina; x = Isolamento.

Nº Exame e Origem	Meios de Cultura*						Trituração						Elaiação						Sorotipos	
	Rap			Te			Rap			Te			Rap			Te				
	BS	EMB	HK	XLD	BS	EMB	HK	XLD	BS	EMB	HK	XLD	BS	EMB	HK	XLD	BS	EMB		
02 - Flamengo	x																		S. typhimurium	
06 - Ilha do Governador	x		x		x														S. montevideo	
09 - Ramos	x																		S. oranienburg	
																		x	S. emek	
18 - Copacabana				x															S. panama	
22 - Ramos			x																S. agona	
34 - Ramos					x														S. hadar	
53 - Ramos	x					x		x	x	x				x			x		S. newlands	
							x	x	x										S. senftenberg	
								x					x						S. oranienburg	
									x				x						S. typhimurium	
										x									S. agona	

Discussão

A contaminação de águas da natureza por *Salmonella* é na atualidade um fato perfeitamente reconhecido. Também é sabido que a água do mar, exerce uma influência adversa na sobrevivência dessas e de outras enterobactérias. Este fenômeno não só é decorrente do processo de dispersão, mas de uma série de fatores bióticos e abióticos, que interagem (12). Entretanto, é importante frisar que, nem sempre esses fatores são capazes de eliminar as salmonelas (13), persistindo o risco de transmissão para o homem, principalmente através do pescado (1, 2).

O problema assume uma maior ressonância em águas recreacionais, como nas praias localizadas em estuários e baías, em particular, naquelas que recebem de modo constante descargas poluidoras de esgotos. Este fato foi constatado na presente análise, considerando os resultados obtidos no balneário de Ramos, localizado no interior da baía da Guanabara e confrontando-os com os dados observados para as

demais praias. A área apresentou o maior índice de isolamentos, assim como uma diversidade de sorotipos, todos pertencentes ao subgênero I de *Salmonella* (Tabela 1).

Os tipos sorológicos identificados podem ser caracterizados em quase sua totalidade, como extremamente comuns em nosso ambiente, quer no desenvolvimento de processos entéricos humanos (14, 16, 20, 21) ou ocorrendo em coleções aquáticas naturais ou poluídas (5, 9, 10, 13, 18, 23).

Secundariamente, salienta-se a detecção dos sorotipos *S. emek*, *S. hadar* e *S. newlands*, que talvez escapem a classificação como tipos raros, pois já foram referidos por Fierro (10) em espécimes de esgoto da estação de tratamento da Penha, cujo efluente é lançado na baía da Guanabara, na adjacência da praia de Ramos.

Convém ainda comentar que nesta área e nas redondezas, concentram-se aglomerações populacionais afligidas por sérios problemas de saneamento básico, entre os quais, destaca-se o lançamento "in natura" de dejetos nas águas da baía.

É claro que a presença de *Salmonella* por si só, não representaria um risco imediato para o desencadeamento da infecção, tendo em vista que outros fatores devem ser associados, entre eles a dose infectante, o volume de água ingerida e o grau de resistência do hospedeiro. Neste sentido, são importantes as observações de Mechalias & Col. (19) que apontaram como risco de aquisição da salmonelose a proporção de dois casos em dez mil pessoas, que ocorreria quando a contagem atingisse a 1000 salmonelas em 100ml do veículo aquoso. Aliás, assinala-se que esta relação dificilmente foi relatada em análises de água do mar, além de não ser tão frequente nas águas de esgoto, de acordo com os resultados obtidos por Martins (18). Talvez, a única exceção ao princípio refira-se à *S. typhi*, que apresenta uma dose infectante bem inferior a totalidade dos outros sorotipos, embora seu tempo de sobrevivência seja muito curto na água do mar, segundo observações de Coetzee (3).

Quanto a metodologia, em princípio ressalta-se a variação de tipos de *Salmonella* e a ocorrência de *S. typhimurium* (exame 02 - Flamengo), nos dois processos aplicados (Tabela 2). Quantitativamente, a diferença das duas formas de tratamento das membranas filtrantes, não é considerada significativa, entretanto, a análise qualitativa evidencia uma nítida divergência dos sorotipos caracterizados. Talvez, isto decorra do fator de dispersão das bactérias no meio, associado e resultante do discreto número de microrganismos presentes no volume de água examinado. Curiosamente, nenhuma menção a tal problema foi assinalada na bibliografia consultada, embora no caso de Martins (18) observou-se com a bipartição alguns resultados similares.

Do ponto de vista prático, admite-se que os dois processos sejam válidos (Tabela 2) e que, provavelmente, empregando-se volumes maiores de água, por exemplo, 2 a 3 litros, seria possível obter uma uniformização dos resultados, recorrendo-se apenas a uma das técnicas.

Agradecimentos

À Sra. Deise Paranhos, Auxiliar Técnico de Pesquisa, pelo apoio técnico prestado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento. (Processo nº 402.377/84.).

Referências Bibliográficas

1. Buttiaux, R. - *Salmonella problems in the sea*. Fish as Food-New York. Academic Press, 1962.
2. Carlucci, A.F. & Pramer, D. - An evaluation of factors affecting the survival of *Escherichia coli* in sea water. I and II. *Appl. Environ. Microbiol.*, 8:243-250, 1960.
3. Coetzee, O.J. - The viability of *Salmonella typhi* in sea water. *Publ. Health (Johannesburg)*, 63:5-11, 1963.

4. Costa, G.A. & Hofer, E. - Isolamento e identificação de Enterobactérias. Rio de Janeiro, Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, 120p., 1972.
5. De Paula, O. & Hofer, E. - *Salmonella* em esgotos sanitários da cidade de Niterói - RJ. Folha Médica (BR), 82:621-624, 1981.
6. Edel, W. & Kampelmacher, E.H. - *Salmonella* isolation in nine European laboratories using a standardised technique. Bull. World Health, Org., 41:297-306, 1969.
7. Edel, W.; van Schothorst, M. & Kampelmacher, E.H. - Epidemiological studies on *Salmonella* in a certain area. I. The presence of *Salmonella* in man, pigs, insects, seagulls and in foods and effluents. Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. Orig. A, 325:476-484, 1976.
8. Edwards, P.R. & Ewing, W.H. - Identification of *Enterobacteriaceae*. Communicable Disease Center., U.S. Publ. Hlth. Serv. (Georgia), 258p, 1972.
9. Ferreira, M.D. - Pesquisa de *Salmonella* em águas superficiais de Belo Horizonte, Inst. Ciências Biológicas UFMG, 120p., 1976 (Tese de Mestrado).
10. Pierro, I.A. - Estudo comparativo de diversos esquemas de isolamento de *Salmonella* sp., em águas residuais. Rio de Janeiro, Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, 120p., 1987 (Tese de Mestrado).
11. Geldreich, E.E. - Bacterial population and indicators concepts in faeces, sewage, stormwater and solid wastes. In: - Berg, G., Ed. Indicators of virus in water and food, Ann. Arbor. Sciences, 1977.
12. Greenberg, A.E. - Survival of enteric organisms in sea water. Publ. Health. Rep., 71:77-86, 1956.
13. Hofer, E. & Costa, G.A. - Investigação sobre a ocorrência de *Salmonella* em esgotos sanitários da cidade do Rio de Janeiro. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 70:221-236, 1972.
14. Hofer, E. - Considerações sobre a frequência de sorotipos de *Salmonella* na cidade do Rio de Janeiro. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 72:62-72, 1974.
15. Kampelmacher, E.H.; Fonds, A.W. & Jansen, L.M.N. - Reduction of *Salmonella*, *E. coli*, coliforms and fecal streptococci by chlorination of sewage treatment plant effluents. Water Res. 11:545-550, 1977.
16. Leal, N.C.; Tavares de Sá, A.; Solari, C.A.; Da Silva, S.J. & Hofer, E. - Sorotipos de *Salmonella* isolados de processos entéricos humanos em Recife - Pernambuco, durante o triênio 1978 - 1980. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 82:43-49, 1987.
17. Le Minor, L.; Véron, M. & Popoff, M. - Proposition pour une nomenclature des *Salmonella*. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 133B:245-254, 1982.
18. Martins, M.T. - *Salmonella* no ambiente aquático: significado sanitário. São Paulo, Inst. Ciências Biomédicas - USP., 354p., 1979 (tese de Doutorado).
19. Mechalas, B.J.; Hekimian, K.K.; Schinazi, L.A. & Dudley, R.H. - An investigation in to recreation water quality. Washington, D.C. Environmental Protection Agency. Water Quality Criteria data Book, vol. 4, 1972.
20. Pessoa, G.V.A.; Irino, K.; Calzada, C.T.; Melles, C.E.A. & Kano, E. - Ocorrência de bactérias enteropatogênicas em São Paulo no septênio 1970 - 76, I. Sorotipos de *Salmonella* isolados e identificados. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 38:87-105, 1978.
21. Rodrigues, D.P.; Ribeiro, R.V.; Solari, C.A.; Silva Fº, S.J.; Filgueiras, A.L.L.; Ernadez, D.; Lacerda, M.D.; Reis, E.M.F.; Lopes, D.L.; Hofer, E.; Lindo, J.A.A.; Kexse, S.M.C.; Pantoja, V.L.P.; Silva Fº, G.J.; Scorza, E.C. & Dornellas, M.C.V. - Etiologia bacteriana de gastroenterite infantil de pacientes internados em dois hospitais da Cidade do Rio de Janeiro - RJ. In: XIII Cong. Bras. Microbiol., São Paulo, SP. 1985.
22. Shewan, J.M. - Food poisoning caused by fish and fishery products. Fisch as Food. New York. Academic Press, 1962.
23. Solari, C.A. - *Salmonella agona*: obtenção de possíveis marcadores epidemiológicos. Belo Horizonte, Instituto de Ciências Biológicas - UFMG - 103p., 1983 (Tese de Mestrado).
24. Yoshpe - Purer, Y. & Schuval, H.L. (1972). Apud - Martins, M.T. - *Salmonella* no ambiente aquático: significado sanitário. USP, 354p., 1979 (Tese de Doutorado).

CONTROL BIOLÓGICO DE LA MARCHITEZ BACTERIANA DE LA PAPA (SOLANUM TUBEROSUM L.) INDUCIDA POR PSEUDOMONAS SOLANACEARUM E.F. SMITH

Pedro Bustamante Gallardo
 & Luigi Ciampi Panno

Instituto de Producción Y Sanidad Vegetal
 Facultad de Ciencias Agrarias
 Universidad Austral de Chile
 Casilla 567
 Valdivia, Chile

Recebido para publicação em 02/05/88.

Resumen

En el presente trabajo se estudia la capacidad de *Pseudomonas fluorescens* BC8 para colonizar plántulas de papas (*Solanum tuberosum* L.) y la habilidad para protegerlas de la marchitez bacteriana ocasionada por *Pseudomonas solanacearum*. Para esta finalidad se utilizaron plántulas de papa desarrolladas sobre bandejas consuelo esterilizado, las cuales fueron colocadas en una cámara climática LAB-LINE Biotronette MARK III con un fotoperíodo de 14hrs. luz y una temperatura de 16°C. Al tener las plántulas una altura de 8cms, el suelo fue inoculado con *P. fluorescens* BC8 y 15 días más tarde, se inocularon diferentes suspensiones de *P. solanacearum* 3T. Al analizar bacteriológicamente cada plántula de papa, fue posible recuperar las cepas inoculadas. Los resultados obtenidos indican que, en las bandejas inoculadas con *P. fluorescens* BC8 se logró proteger un 90% de las plántulas de papas, neutralizando concentraciones de $2,1 \times 10^3$ a $2,1 \times 10^9$ UFC.ml⁻¹ de *P. solanacearum*. La cepa BC8 fue capaz de colonizar plántulas de papas por vía radicular y una vez establecida en ellas impidió la entrada del patógeno. Por otra parte, no se detectaron efectos deletéreos en el cultivo por la acción de la cepa BC8.

Summary

Biological control of bacterial wilt potato induced by *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith

The purpose of this research was to investigate the capacity of *Pseudomonas fluorescens* BC8 strain to colonize potato seedlings (*Solanum tuberosum* L.) and the ability to protect them against bacterial wilt induced by *Pseudomonas solanacearum*. Three hundred and sixty potato seedlings were grown on six wooden flats containing steril soil. Flats were incubated at 16°C and were kept at 14-10 Light-Dark photoperiod in a Lab-Line Biotronette Mark III environmental growth chamber. When the seedlings reached a hight of 8cm, the soil was inoculated with a suspension of *P. fluorescens* BC8 and fifteen days later, were inoculated with different suspensions of *P. solanacearum* 3T. Results indicated that all plants from inoculated flats contained both bacterial strains in their inner tissues. *P. fluorescens* BC8 was able to protect 90% of seedlings, neutralizing *P. solanacearum* concentrations of 2.1×10^3 and 2.1×10^9 . The BC8 strains was capable to colonize potato seedlings through the root system and once stablished it was

able to prevent the pathogen infection. Moreover not deleterious effects in plants were detected due to the action of the BC8 strain.

Introducción

La marchitez bacteriana inducida por *Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith, es una enfermedad que afecta a numerosas especies vegetales, entre las que se incluyen importantes cultivos de la familia Solanaceae, tales como papa, tomate, tabaco, pimentón, aji y berenjena (14, 26). Por la amplitud de hospederos y su distribución en Centro y Sudamérica es considerada una de las enfermedades más importantes de la papa (*Solanum tuberosum* L.) (5, 15).

Los síntomas de la marchitez bacteriana son similares a aquellos causados por la falta de agua. En las plantas se presenta marchitez, enanismo y amarillamiento del follaje. Cuando la infección está bien establecida los síntomas en los tubérculos se hacen generalmente evidentes a través del peridermo como una decoloración gris parduzca. Al cortarlos transversalmente estos muestran a menudo una decoloración vascular (15, 21). Este patógeno invade la planta a través de heridas y directamente por el sistema radicular, para implantarse posteriormente en los vasos de mayor diámetro del xilema, produciendo lipolisacáridos extracelulares que impiden el transporte de agua (5, 15, 26).

El Centro Internacional de la Papa (CIP-Lima, Perú), reconoce a ésta enfermedad como la de mayor importancia económica, dentro de las inducidas por agentes bacterianos, ya que puede provocar la pérdida de hasta el 100% del cultivo de una variedad susceptible (5, 21).

Esta enfermedad que se transmite asintomaticamente por tubérculo-semilla fue detectada en papas por primera vez en Chile en 1983 (6, 11).

La presencia de *P. solanacearum* Raza 3 en la Región Metropolitana (Valle Central) y su posterior avance a las regiones V, VI y VII representan un serio obstáculo para la producción de papas; por la cantidad de predios infestados y por constituir un peligro potencial para las regiones IX y X (Sur de Chile), que son las áreas productoras de semilla certificada de papa (1). Aún cuando en una reciente prospección realizada en plantas y tubérculos de papas provenientes de diferentes localidades de la IX y X regiones, no se detectó la presencia de *P. solanacearum* (9).

Diversos estudios han demostrado que *P. solanacearum* puede persistir en el suelo durante muchos años y que es imposible de eliminar bajo condiciones naturales, debido a la amplia gama de hospederos, la alta sobrevivencia en gel suelo, la variabilidad patogénica de esta especie, el inducir infecciones latentes a temperaturas templadas y a que no se dispone de controles químicos que sean económicos, prácticos, y eficaces (3, 5, 8, 12, 21, 22).

Sin embargo, en el área fitopatológica el control de las agallas del cuello, producidas por *Agrobacterium tumefaciens* con la cepa 84 de *A. radiobacter* constituye el ejemplo más exitoso de control biológico y da el paso inicial para la utilización de bacterias productoras de sustancias inhibidoras en el control de importantes enfermedades de plantas cultivadas (25).

De igual forma, estudios realizados anteriormente en nuestro país, demuestran la notable inhibición de cepas nativas de *P. solanacearum* Raza 3 utilizando cepas bacterianas provenientes de los suelos del sur de Chile (7). Destacándose en particular la cepa BC8 de *P. fluorescens*, capaz de producir una bacteriocina denominada Fluocina BC8, la cual inhibe "in vitro" al patógeno (4).

Algunos investigadores consideran que la producción de bacteriocinas otorga ventajas selectivas a la cepa productora en relación a las cepas que son sensibles a dichas toxinas (13). Si esto fuera así, la instalación de una cepa bacteriocinogénica, como es la BC8, en el sistema radicular de una planta podría excluir el desarrollo de otras bacterias capaces de producir una determinada patología.

Este estudio tiene como objetivo determinar si *P. fluorescens* BC8 es capaz de colonizar plántulas de papas desarrolladas en cámaras climáticas y de esta forma protegerlas de la marchitez bacteriana ocasionada por *P. solanacearum*.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas - La cepa BC8 de *Pseudomonas fluorescens* aislada en el Instituto de Microbiología de la Universidad Austral de Chile (UACH), a partir de tubérculos sanos de papas.

La cepa 3T de *P. solanacearum* Raza 3 (Biotipo II), aislada de tubérculos enfermos provenientes de la Región Metropolitana (Santiago) de Chile.

Medios de cultivos - La cepa de *P. fluorescens* BC8 fue desarrollada en agar nutritivo y B de King (19). Por otra parte, la cepa de *P. solanacearum* fue cultivada en el medio de Kelman (agar TZC y agar CPG) a 28°C y repicada cada 4 - 7 días (17).

Semillas de papas - Semilla botánica de papa (*Solanum tuberosum* L.), del Cv. Desirée obtenida en el Instituto de Producción y Sanidad Vegetal de la UACH fue utilizada en el ensayo.

Preparación de suspensiones de *P. fluorescens* BC8 y de *P. solanacearum* 3T - La cepa de *P. fluorescens* BC8 resistente a los antibióticos Penicilina, Eritromicina y Cloramfenicol se sembró en agar nutritivo extracto de levadura y se incubó a 28°C por 24 hrs.

La suspensión bacteriana se preparó agregando 10ml de suero fisiológico (S.F.) 0,9% estéril a las placas. Las colonias se desprendieron con una pipeta Pasteur estéril se recuperaron y depositaron en un matraz Erlenmeyer. La Absorbancia de esta suspensión se determinó a una longitud de onda de 600nm en un espectrofotómetro Sequoia-Turner. En forma alternativa se hizo un recuento de células viables para determinar la concentración de esta suspensión y para realizar el adecuado ajuste a las concentraciones deseadas. La concentración bacteriana de esta suspensión se expresa en unidades formadoras de colonias por ml (UFC.ml-1).

La suspensión de la cepa 3T de *P. solanacearum* se preparó en forma similar a la anterior, variando solamente los medios de cultivos, utilizando para ello placas de agar TZC y CPG.

Inhibición de *P. solanacearum* 3T - Para este propósito se utilizaron 6 bandejas de madera de 40x30x10cms, llenas con 6kgs de una mezcla de suelo orgánico y arena en una proporción de 4:1 y esterilizadas dos veces en autoclave a 100°C por 1 hr. Posteriormente se realizaron análisis bacteriológicos de estos suelos, no detectándose la presencia de bacterias. Después se sembraron en cada bandeja 70 semillas botánicas de papa cv. Desirée. Las bandejas se ubicaron en una cámara ambiental LAB-LINE Biotronette Mark III con un fotoperíodo de 14h. luz a una temperatura de 16°C. Cada bandeja correspondió a un tratamiento diferente y se denominaron T1, T2.... hasta T6. La humedad del suelo previa a la inoculación correspondió a un 35%.

Cuando las plántulas tenían una altura promedio de 8cms., los diferentes tratamientos se inocularon con la cepa de *P. fluorescens* BC8 según el esquema presentado en la Tabla 1. Luego de dos semanas se realizó la inoculación con *P. solanacearum*. En el momento de agregar al suelo las suspensiones de patógeno, la temperatura de la cámara climática se elevó a 28°C.

Los tratamientos fueron irrigados con solución de Hoagland y agua destilada estériles, utilizando una bomba manual, una vez al día y a la misma hora.

Dos semanas después, se procedió a estudiar bacteriologicamente cada plántula de papa desarrollada en los diferentes tratamientos. El procedimiento empleado fue el recomendado por Ciampi & Col. (8).

Resultados

Las plántulas desarrolladas en los tratamientos T1, T2 y T3 presentaron en general un buen aspecto y la altura promedio de ellas fluctuó entre 30 y 35cms. Emergieron un total de 54, 67 y 70 plántulas en T1, T2 y T3. Los síntomas de

marchitez se presentaron en 8, 5 y 4 plántulas de los tratamientos T1, T2 y T3, dando lugar a un 14,8%, 7,5% y 5,7% de manifestación de la enfermedad respectivamente. Esto se aprecia en la Figura 1A, 1B y 1C y la Tabla 2.

Al realizar el análisis bacteriológico de las plántulas desarrolladas en estos tratamientos, se determinó que *P. solanacearum* 3T, se encontraba en los tejidos interiores de todas las plántulas que presentaban síntomas de marchitez. Por otra parte, de las plántulas aparentemente sanas, solo fue posible recuperar *P. fluorescens* BC8.

En los controles utilizados para las cepas de *P. fluorescens* BC8 (tratamiento T4) y de *P. solanacearum* 3T (tratamiento T5) fue posible recolectar la siguiente información. En T4 emergieron un total de 65 plántulas, presentando una altura promedio de 25cms y con abundante follaje verde, de las cuales ninguna presentó síntomas de marchitez (Figura 1D). Al realizar el análisis bacteriológico, *P. fluorescens* BC8 fue aislada en el 100% de las plántulas (Tabla 2).

En T5 emergieron un total de 58 plántulas, con una altura promedio de 14cms, de las cuales 54 presentaban síntomas, notándose con claridad en las hojas basales la manifestación de la enfermedad (Figura 1E). El análisis bacteriológico, permitió detectar a *P. solanacearum* 3T en la totalidad de las plántulas, produciéndose un 100% de infección con el patógeno (Tabla 2).

Por último, en T6 emergieron un total de 67 plántulas con una altura promedio de 25cms y abundante follaje verde, no presentándose síntomas de enfermedad (Figura 1F).

En las placas de agar TZC se presentó escaso desarrollo de colonias bacterianas, ninguna similar a las características culturales de *P. solanacearum* 3T. Por otra parte, solo en algunas placas de agar B de King se presentó desarrollo bacteriano. Siendo muy diferente a las colonias de la cepa BC8, incluso muchas de ellas no producían fluorescencia en el medio.

Discusión

Los resultados obtenidos demuestran que, *P. fluorescens* BC8 es capaz de colonizar plántulas de papas desarrolladas en cámaras climáticas cuando es inoculada por vía radicular. Aún más, al analizar el tratamiento T4, se aprecia que la cepa BC8 no produce síntomas de marchitez o de otro tipo que pueda afectar el normal desarrollo de las plántulas de papas. Esta cepa fue aislada de tubérculos sanos de papas, no produce enzimas pectinolíticas y pertenece al grupo saprófito de las bacterias fluorescentes, correspondiendo según Palleroni (23), a *Pseudomonas fluorescens* Biovar I (datos no publicados).

Por otra parte, la manifestación de la marchitez bacteriana fue reducida

Tabla 1 - Esquema de inoculación de los diferentes tratamientos con las cepas bacterianas de *P. fluorescens* BC8 y *P. solanacearum* 3T.

Símbolos: * = En cada tratamiento se inocula 2lts de las diferentes suspensiones bacterianas; - = Inoculado con 2lts de agua destilada estéril.

Tratamiento*	1ra. Inoculación (<i>P. fluorescens</i> BC8)	2da. Inoculación (<i>P. solanacearum</i> 3T)
T1	6.6×10^6 UFC.ml ⁻¹	2.1×10^9 UFC.ml ⁻¹
T2	6.6×10^6 UFC.ml ⁻¹	2.1×10^6 UFC.ml ⁻¹
T3	6.6×10^6 UFC.ml ⁻¹	2.1×10^6 UFC.ml ⁻¹
T4	6.6×10^6 UFC.ml ⁻¹	~
T5	-	2.1×10^9 UFC.ml ⁻¹
T6	-	-

Tabla 2 - Número y porcentaje de plántulas de papas emergidas, con síntomas de marchitez y aparentemente sanas en los diferentes tratamientos.

TRATAMIENTO	Nº.SEMILLAS SEMBRADAS	PLANTULAS EMERGIDAS Nro. I	PLANTULAS C/MARCHITEZ (<i>P. SOLANACEARUM</i> 3T) Nro. I	PLANTULAS SANAS (<i>P. FLUORESCENS</i>) BCR Nro. I	
				C/MARCHITEZ	PLANTULAS SANAS
T1	70	54	77,1	8	14,8
T2	70	67	95,7	5	7,5
T3	70	70	100,0	4	5,7
T4	70	65	92,9	-	-
T5	70	58	82,9	58	100,00
T6	70	67	95,7	-	-

En la enfermedad (Figura 1E). El análisis bacteriológico detectó a *P. solanacearum* 3T en la totalidad de las plántulas, produciéndose un 100% de infección con el patógeno (Tabla 2).

Figura 1a - Desarrollo de las plántulas de papa (Cv. Desirée) en los diferentes tratamientos.

Símbolos: A(T1) = Inoculado con *P. fluorescens* BC8 (6.6×10^6 UFC.ml $^{-1}$) + *P. solanacearum* 3T (2.1×10^9 UFC.ml $^{-1}$); B(T2) = Inoculado con *P. fluorescens* BC8 (6.6×10^6 UFC.ml $^{-1}$) + *P. solanacearum* 3T (2.1×10^6 UFC.ml $^{-1}$); C(T3) = Inoculado con *P. fluorescens* BC8 (6.6×10^6 UFC.ml $^{-1}$) + *P. solanacearum* 3T (2.1×10^3 UFC.ml $^{-1}$).

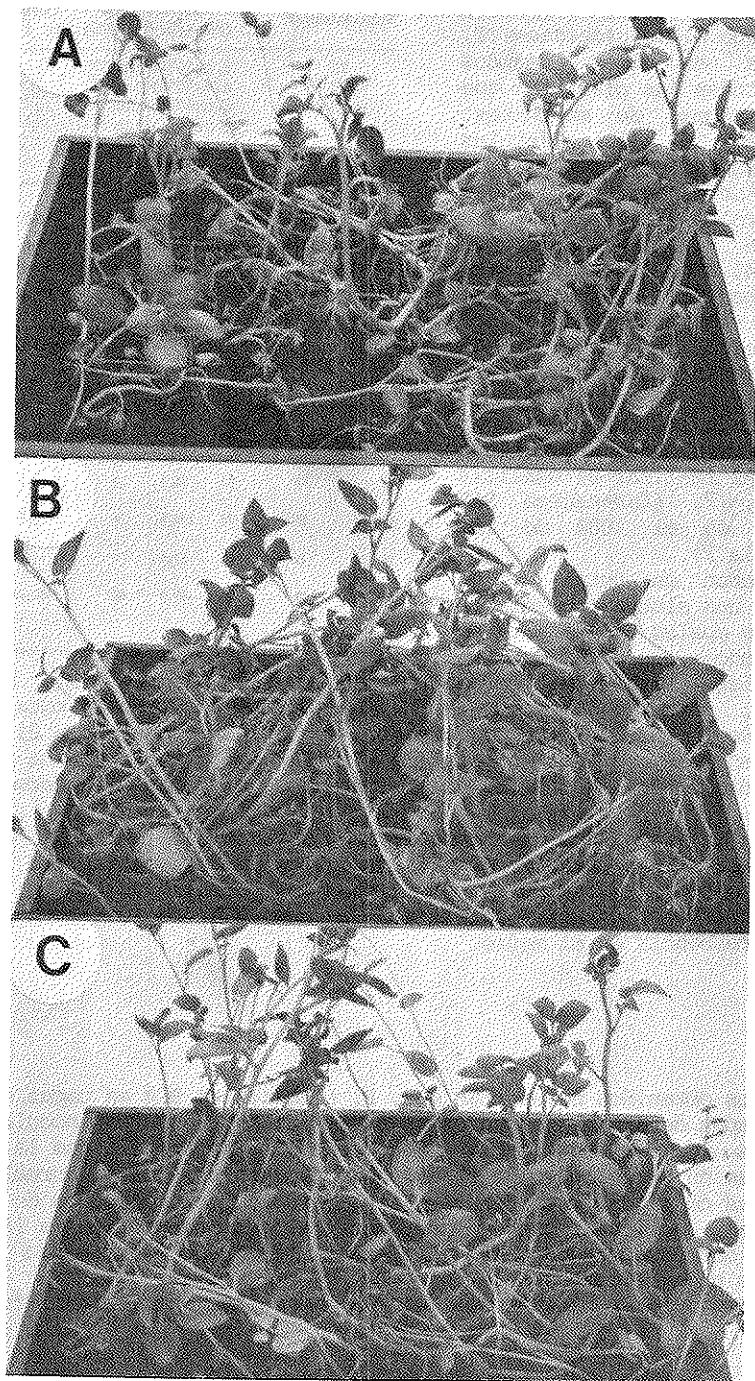
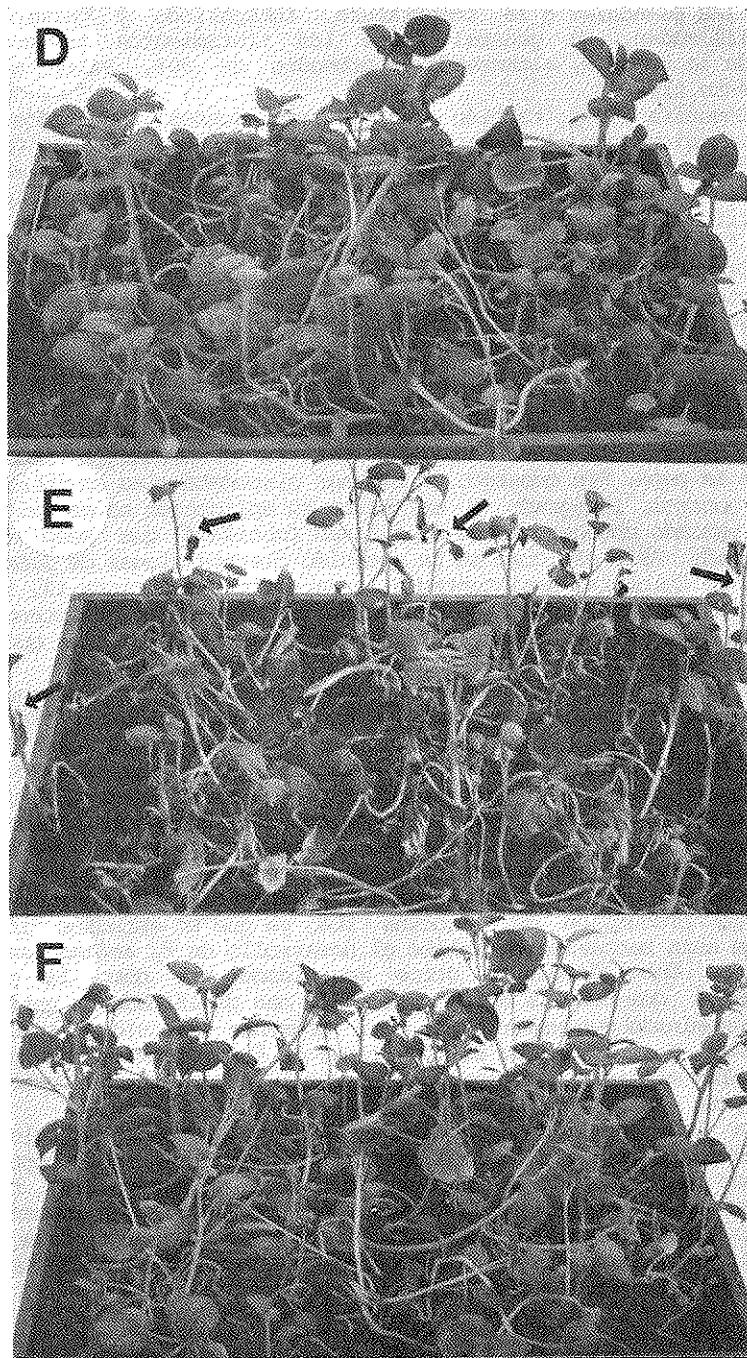


Figura 1b - Desarrollo de las plántulas de papa (Cv. Desirée) en los diferentes tratamientos.
Símbolos: D(T4) = Inoculado con *P. fluorescens* BC8 (6.6×10^6 UFC.ml $^{-1}$); E(T5) = Inoculado con *P. solanacearum* 3T (2.1×10^9 UFC.ml $^{-1}$); F(T6) = Inoculado con agua destilada estéril.



efectivamente a un promedio de 10%. En contraste con el control utilizado (tratamiento T5) en el cual se aprecia que *P. solanacearum* produjo una infección de 100%, presentando la mayoría de las plántulas síntomas visibles de marchitez, e incluso los clasicamente descritos en la literatura, en el cual el ataque del patógeno se inicia en forma lateral, afectando a un tallo en forma primaria extendiéndose posteriormente a toda la plántula (5, 15, 26).

En el tratamiento T6 no se presentó ningún tipo de síntoma y las plántulas se desarrollaron normalmente. Este control fue utilizado como referencia en el desarrollo de las plántulas a la temperatura, fotoperíodo y germinación de las semillas utilizadas. En general todos los tratamientos tuvieron una buena germinación de la semilla, alcanzando un promedio de 90%, valor aceptable para estudios de este tipo.

Kempe and Sequeira (18), también han logrado buenos resultados tratando de controlar biológicamente la marchitez bacteriana. Para ello han utilizado cepas avirulentas de *P. solanacearum* (B 82), incompatible de *P. solanacearum* (70), *P. fluorescens* (W163 y WP95) y otras *Pseudomonas* fitopatógenas. Ellos han logrado reducir significativamente la incidencia y severidad de la enfermedad con las cepas 70 y B 82 de *P. solanacearum* y con la W163 de *P. fluorescens*.

El Brasil Drumond (10), ha estudiado por varias décadas el control de la marchitez bacteriana. En el control biológico ha utilizado una cepa de *Streptomyces griseochromogenes* aislada originalmente en el Japón. El ha empleado esta cepa en forma de peletizado con goma arábiga, cubriendo el tubérculo y sembrándolo en terrenos contaminados. Ha logrado reducir la manifestación de la marchitez hasta un 0% en la segunda siembra de papas en algunas parcelas.

Utilizando principios de control integrado y el uso de semilla libre de bacterias se ha podido disminuir la prevalencia y evitar la diseminación de la marchitez bacteriana de la papa. Sin embargo, en algunas circunstancias es difícil aplicar los métodos de control integrado y en otros su aplicación no es exitosa. Por este motivo se ha buscado obtener clones de *Solanum tuberosum* que sean resistentes a esta enfermedad. Así es como se ha obtenido ciertos clones de *Solanum phureja* (provenientes de Colombia) resistentes a la marchitez bacteriana (2, 5, 24).

De igual forma en Perú, se han seleccionado las variedades resistentes Molinera y Caxamarca. Desafortunadamente esta resistencia no es general, sino que específica a patotipos e independiente de las razas de *P. solanacearum* (5).

Los resultados promisorios obtenidos en este trabajo, hacen pensar que es posible controlar biológicamente a *P. solanacearum* mediante el uso de *P. fluorescens* BC8. Drumond (10) dice que el éxito del control biológico de la marchitez bacteriana radica en la inoculación del antibiógeno al suelo. Algo similar ocurre en este estudio; el éxito del control parece radicar en quien coloniza primero la planta, en el análisis bacteriológico se aprecia que cuando la plántula presenta marchitez, siempre se aisla de los tejidos interiores, *P. solanacearum* 3T. Por el contrario, cuando la plántula se presenta como aparentemente sana, siempre se aisla *P. fluorescens* BC8. El mecanismo por el cual *P. fluorescens* BC8 protege a la plántula podría ser la producción de Flucina BC8, ya que en estudios "in vitro" se ha demostrado que esta bacteriocina inhibe el desarrollo de *P. solanacearum* (4).

Aunque no se debe descartar otros mecanismos tal como la presencia de antibióticos, ya que Howel & Stipanovic (16), han purificado un antibiótico de *P. fluorescens* denominado pyoluteorin, el cual presenta actividad inhibitoria para *Phythium ultimum*, o al hecho que ciertas cepas de *Pseudomonas* producen sideróforos, los cuales quelan el hierro haciéndolo no disponible para los patógenos, impidiendo de esta forma, su desarrollo (20).

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio pareciera no haber inconvenientes para utilizar la cepa de *P. fluorescens* BC8 en el control biológico de la marchitez bacteriana de la papa, aun cuando Vidaver (25) recomienda no utilizar bacterias vivas, ya que podrían comportarse fitopatógenicamente.

Lo realizado en este trabajo es sólo el inicio y otorga una idea general del problema, en el futuro, debe comprobarse el mecanismo mediante el cual *P. fluorescens* BC8 protege a las plántulas de papa.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer al Sr. Marco Antonio Gonzalez por su colaboración en la transcripción del manuscrito.

Referencias Bibliográficas

1. Acuña, R. - Caracterización de la sintomatología ocasionada por la marchitez bacteriana en el cultivo de la papa en el país. Res. com. libres XXXVI Congresso Anual Sociedad Agronomía de Chile. UACH, 1985.
2. Bowman, J.E. & Sequeira, L. - Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in potato: Infectivity titrations in relation to multiplication and spread of the pathogen. Am. Potato J. 59:155-164, 1982.
3. Buddenhagen, I.; Sequeira, L. & Kelman, A. - Designation of races of *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology, 52:726, 1962.
4. Bustamante, P.; Ciampi, L. & Guaiquil, V. - Inhibición "in vitro" de *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith. utilizando la cepa antagonista BC8 de *Pseudomonas fluorescens*. Rev. Microbiol., São Paulo (en prensa), 1988.
5. Centro Internacional de la papa. - Marchitez Bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) de la Papa en América Latina. Lima, CIP 120pp., 1984.
6. Ciampi, L. - Bacterial wilt of Potato in Chile. Plant Disease, 68:822-823, 1984.
7. Ciampi, L.; Bustamante, P. & Polette, M. - Isolation of soil bacteria with inhibitory activity to *Pseudomonas solanacearum*. In: Civerolo, E., Collmer, A., Davis, R., & Gillaspie, A., Eds. - Plant Pathogenic bacteria. The Netherlands. Nijhoff Publishers, 733-739pp., 1987.
8. Ciampi, L.; Sequeira, L. & French, E. - Latent Infection of potato tubers by *Pseudomonas solanacearum*. Am. Potato J., 57:377-386, 1980.
9. Ciampi, L. & Silva, R. - Prospección de *Pseudomonas solanacearum* en plantas y tubérculos de papas en la X Región. Agro Sur, 13:91-98, 1985.
10. Drummond, O. - Investigaciones para el combate de la marchitez bacteriana de la papa realizada en el período de 1957 a 1982 en Rio de Janeiro. En: Centro Internacional de la Papa (Ed.) Marchitez Bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) de la Papa en América Latina. Lima, CIP, 83-89pp., 1984.
11. Fernandez, C. - Determinación de la Marchitez Bacteriana causada por *Pseudomonas solanacearum* en papa. E.F. Smith. Agricultura Técnica (Chile), 44:173-174, 1984.
12. Graham, J.; Jones, D.A. & Lloyd, A.B. - Survival of *Pseudomonas solanacearum* race 3 in debris and latently infected potato tubers. Phytopathology, 69:1100-1103, 1979.
13. Hardy, K.G. - Colicinogeny and related phenomena. Bact. Rev., 39:464-515
14. Hayward, A. - Characteristic of *Pseudomonas solanacearum*. J. Appl. Bacteriol., 27:265-277, 1964.
15. Hooker, W. - Compendio de las enfermedades de la Papa. Lima, CIP, 166pp., 1980.
16. Howell, C. & Stipanovic, R. - Suppression of *Pythium ultimum* induced damping off cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic pyoluteorin. Phytopathology, 70:712-715, 1980.
17. Kelman, A. - The relationship pf pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on tetrazolium medium. Phytopathology, 44:693-695.
18. Kempe, J. & Sequeira, L. - Biological control of bacterial wilt of potatoes: Attempts to induce resistance by treating tubers with bacteria. Plant. Dis., 67:499-503, 1983.
19. King, E.O.; Ward, M.K. & Raney, D.E. - Two simple media for the demonstration, of pyocyanin and fluorescein. J. Lab. Clin. Med., 44:301-307.
20. Leong, L. - Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plants pathogens. Ann. Rev. Phytopathol., 24:187-209, 1985.
21. Martin, C. - La marchitez bacteriana de la papa; *Pseudomonas solanacearum*. Boletín de información Técnica No. 13. Lima, CIP, 15pp. 1981.

22. Nielsen, L. - Longevity of *Pseudomonacearum solanacearum* in potato tubers and culture in cold storage. Am. Potato J. 40:344-348, 1963.
23. Palleroni, J. - Family I. *Pseudomonas* winslow, Broadhurst, Buchanan, Kruwiede, Rogers and Smith 1917. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 9th Ed. Vol. 1 pp.141-219. (Krieg, N. and Holt, J., Eds.). Baltimore. London, 1983.
24. Thurston, H. & Lozano, J. - Resistance to bacterial wilt of potatoes in Colombian clones of *Solanum phureja*. Am. Potato J. 45:51-55, 1968.
25. Vidaver, A.K. - Prospects for control of phytopathogenic bacteria by bacteriophages and bacteriocins. Ann. Rev. Phytopathol. 14:451-465, 1976.
26. Walker, J. - Plant Pathology. Mc. Graw Hill Book Co. New York, 819pp., 1969.

INHIBICIÓN "IN VITRO" DE PSEUDOMONAS SOLANACEARUM E.F. SMITH UTILIZANDO LA CEPA ANTAGONISTA BC8 DE PSEUDOMONAS FLUORESCENS

Pedro Bustamante Gallardo
 Luigi Ciampi Panno
 & Victor Guaiquil Guichaquelén

Instituto de Producción y Sanidad Vegetal
 Facultad de Ciencias Agrarias
 Universidad Austral de Chile
 Casilla 567
 Valdivia - Chile

Recebido para publicação em 02/05/88.

Resumen

En el presente trabajo se analiza la capacidad bacteriocinogénica de *Pseudomonas fluorescens* BC8 y la habilidad de inhibir "in vitro" la cepa 3T de *Pseudomonas solanacearum* Raza 3. Además se estudia si esta capacidad inhibitoria se encuentra ligada a la presencia de plásmidos. Los resultados obtenidos muestran que la cepa BC8 inhibe "in vitro" a *P. solanacearum* encontrándose involucrada una bacteriocina denominada "Fluocina BC8". La cual en microfotografías electrónicas se presenta como una partícula de forma bacilar de tamaño uniforme con un largo aproximado de 150nm y un diámetro de 25nm y compuesta de un tubo interno y una vaina que la recubre externamente. La capacidad bacteriocinogénica de *P. fluorescens* BC8 no se encontraría mediada por elementos extracromosomales, pues no fue posible detectarlos mediante los análisis electroforéticos.

Summary

Inhibition "in vitro" of Pseudomonas solanacearum E.F. Smith by using the antagonist BC8 strain of Pseudomonas fluorescens

The bacteriocinogenic ability of isolate BC8 of *Pseudomonas fluorescens* to inhibit strain 3T of *Pseudomonas solanacearum* was studied. The relationship between the inhibitory capacity and the presence of plasmids was studied too. Results showed that *P. fluorescens* BC8 inhibits *P. solanacearum* "in vitro". This effect was caused by a bacteriocin ("Fluocin BC8"). In the electronic microphotographs this particle showed a rod shape, approximately 150nm. long, 25nm. diameter and composed by an outer sheath and inner core. The bacteriocinogenic ability of strain BC8 was not related by non-chromosomal elements, because was not possible detect it by using electrophoretic analysis.

Introducción

La permanente preocupación de los investigadores por erradicar o controlar enfermedades de origen bacteriano, los ha inducido a pesquisar en los mas diversos sistemas la presencia de agentes que posean algún tipo de acción antibacteriana específica. Desde hace algunas décadas el estudio de la bacteriocinogenia - o la capacidad que presentan ciertas cepas para producir toxinas bacterianas -

bacteriocinas - ha demostrado que estas tienen acción inhibitoria o son letales para ciertos microorganismos (10, 17).

Al estudiar cepas colicinogénicas, se han obtenido los mayores conocimientos respecto de las bacteriocinas, de tal manera que en *Escherichia coli*, se ha llegado a determinar con precisión la identidad de la toxina, llamada colicina, los mecanismos que rigen la expresión de este carácter y la transmisibilidad ligada a un plásmido que ha sido denominado factor "Col" (10).

Las bacteriocinas generalmente son proteínas y matan a una bacteria sensible de una o varias maneras. Afectan la síntesis proteica, la estabilidad del DNA, el flujo de energía y la integridad de la membrana plasmática, lo cual refleja, la heterogeneidad de estos compuestos (18).

La producción de bacteriocinas, es controlada por la presencia de elementos extracromosomales. De igual forma, la sensibilidad a ellas también puede ser una propiedad plásmido determinada. Sin embargo, en algunas bacterias son los genes cromosomales quienes codifican para la producción de bacteriocinas (18).

Por otro lado, la marchitez bacteriana inducida por *Pseudomonas solanacearum* es una de las más importantes enfermedades de la papa (*Solanum tuberosum L.*) y se encuentra ampliamente distribuida en Centro y Sudamérica (3).

En Chile, esta bacteria fitopatógena fue detectada por primera vez en papas en 1983 (4, 6). Posteriormente en un estudio realizado en 1985, se detectó la presencia de cepas bacterianas provenientes de suelo, capaces de inhibir el desarrollo de *P. solanacearum* (5).

El presente trabajo tiene como objetivos determinar la capacidad bacteriocinogénica de una cepa de *Pseudomonas fluorescens* y su habilidad para inhibir una cepa de *P. solanacearum*. Además se pretende determinar si la capacidad inhibitoria de *P. fluorescens* se encuentra ligada a la presencia de plásmidos.

Material y Metodos

Cepas bacterianas - Como productora de bacteriocinas se utilizó la cepa BC8 de *P. fluorescens* aislada en el Instituto de Microbiología de la Universidad Austral de Chile (UACH), a partir de tubérculos sanos de papas.

Como bacteria sensible se utilizó la cepa 3T de *P. solanacearum* Raza 3 (Biotipo II), aislada de tubérculos con síntomas de marchitez provenientes de la Región Metropolitana (Santiago) de Chile.

Medios de cultivos - La cepa de *P. fluorescens* fue desarrollada en agar nutritivo y B de King (15). Por otra parte, la cepa de *P. solanacearum* fue cultivada en el medio de Kelman (agar TZC y agar CPG) a 28°C y repicada cada 4-7 días (14).

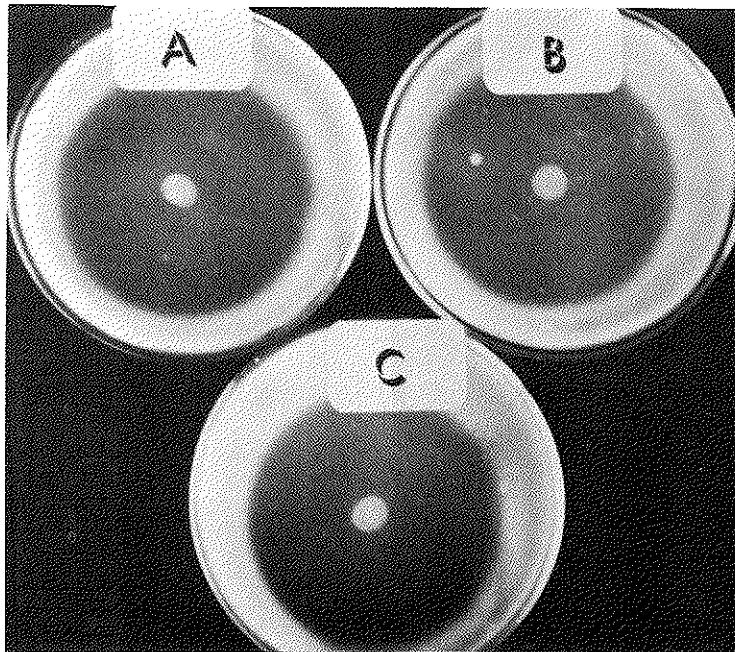
Para la producción de bacteriocinas fueron utilizados agar nutritivo adicionado de extracto de levadura (ANE) y caldo nutritivo extracto de levadura (CNE). En la purificación de plásmidos fue usado el medio de Luria-Bertani (L-B) (16).

Detección y producción de bacteriocinas - Los procedimientos empleados fueron lo recomendados por Fredericq (7) y Vidaver & Col. (19).

Microscopía electrónica - Suspensiones de los extractos crudos obtenidos con el método de Vidaver & Col. (19) se tiñeron para la microscopía siguiendo la técnica descrita por Glauert (9). Las preparaciones fueron montadas sobre grillas de cobre cubiertas con una película de colodión y observadas en un microscopio electrónico PHILLIP EM-300.

Purificación de plásmidos de *P. fluorescens* BC8 - Esta fue realizada mediante tratamiento con SDS en medio alcalino según Birnboim y Doly (1) y Maniatis & col. (16).

Figura 1 - Placas de ANE que muestran el efecto inhibitorio de *P. fluorescens* BC8 (centro) sobre *P. solanacearum* 3T (cepa indicadora o sensible). Las placas A, B y C tienen un tapiz de 1×10^8 , 5×10^8 y 1×10^9 UFC/ml de *P. solanacearum* 3T respectivamente.



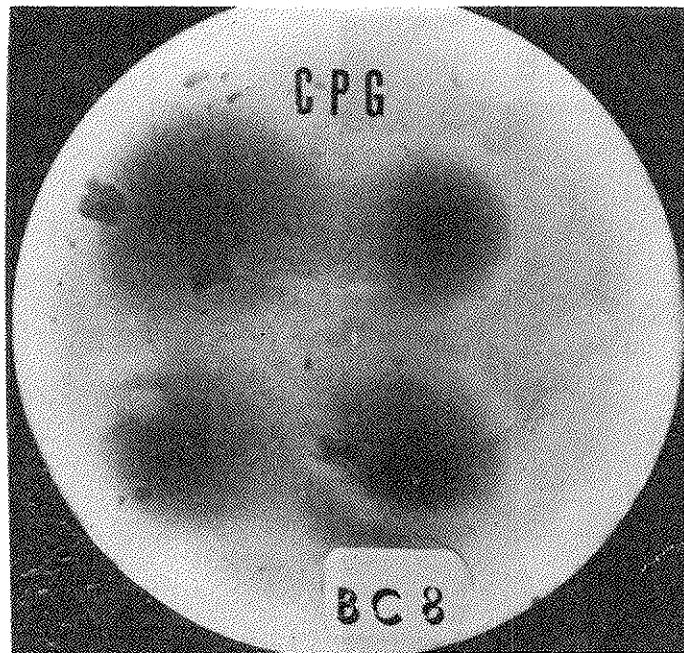
Resultados

En la Figura 1 se presenta una fotografía de placas en las que se aprecia la inhibición de *P. solanacearum* 3T por la acción de *P. fluorescens* BC8. En el centro de las placas de ANE se muestra al desarrollo de la cepa BC8 después de 48h a 28°C. A pesar que las tres placas presentan distintas concentraciones de la bacteria sensible o indicadora (*P. solanacearum*), el tamaño de las zonas de inhibición permanece de similar tamaño.

En la Figura 2 se aprecia que, gotas de 5 μ l de los extractos crudos de *P. fluorescens* BC8 obtenidos mediante el método de Vidaver & col. (19) produjeron halos de inhibición sobre un tapiz de 1×10^9 unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml) de la cepa 3T y al estudiar estos extractos bajo microscopía electrónica se pudo observar partículas con un patrón morfológico correspondiente a estructuras de forma bacilar con un largo estimado de 150mm. y un diámetro aproximado de 25mm, compuesta de un tubo interno y una vaina que lo recubre externamente (Figura 3).

La Figura 4 muestra una electroforesis en gel de agarosa de los ácidos nucleicos de la cepa BC8. El surco 1 lleva DNA del fago lambda digerido con Hind III como patrón de peso molecular. Los surcos 2, 3, 4 y 5 corresponden a diluciones de 1:100, 1:50, 1:25 y 1:10 respectivamente de 1 μ l de la muestra de ácidos nucleicos purificados de la cepa BC8. En las diferentes diluciones analizadas no se aprecia

Figura 2 - Placas de agar CPG con un tapiz de 1×10^9 UFC/ml de *P. solanacearum* 3T sobre el cual se ha depositado gotas de 5µl de los extractos crudos obtenidos de *P. fluorescens* BC8, apreciándose zonas claras de inhibición de *P. solanacearum* 3T.



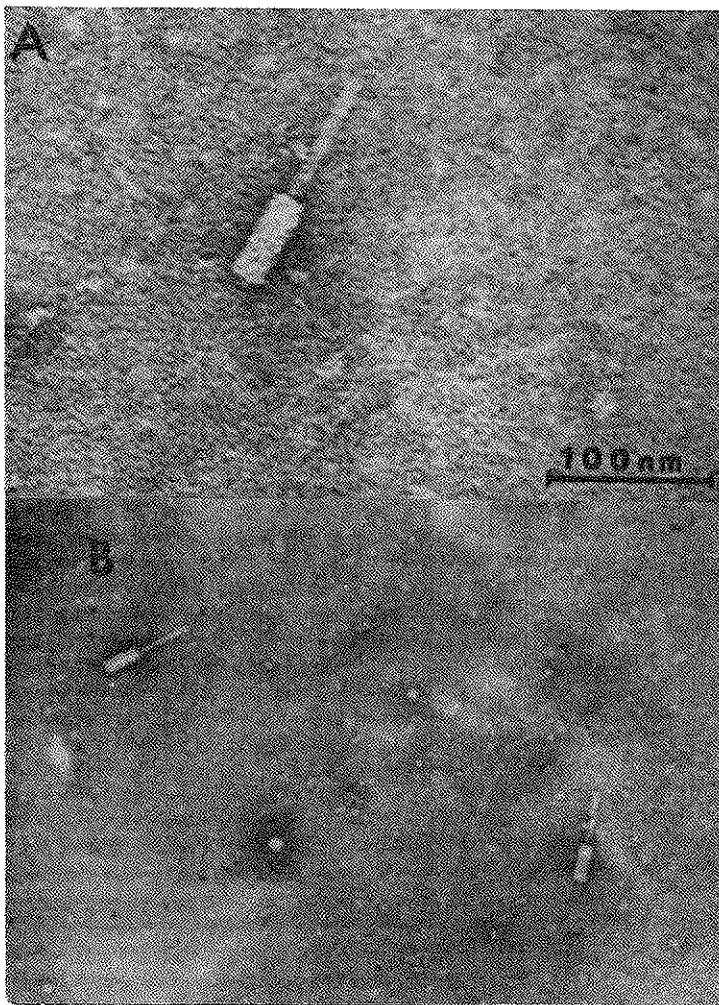
la presencia de plásmidos, solamente en el origen del gel es posible notar una banda correspondiente a DNA cromosomal.

Discusión

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio es posible demostrar, la capacidad que presenta la cepa de *P. fluorescens* BC8, para inhibir en condiciones "in vitro" el crecimiento de *P. solanacearum*. Este efecto inhibitorio ha sido demostrado en un medio sólido, como son las placas de agar ANE. Al parecer, el tamaño de la zona inhibitoria depende mas bien de la capacidad de expandirse en el medio, que de las concentraciones de la bacteria sensible. Sin embargo, la cantidad y constitución del medio así como el tiempo de incubación de la cepa BC8 hacen variar el diámetro de esta zona inhibitoria (datos no publicados).

En este trabajo utilizamos una temperatura de 28°C, por ser ésta la óptima para el desarrollo de *P. solanacearum*, pretendiendo darle así mayores posibilidades de crecimiento al patógeno. Vidaver & Col. (19), estudiando la producción de bacteriocinas en cepas fitopatógenas del género *Pseudomonas* ha determinado como óptimo, una temperatura de 20-24°C y 25ml de agar/placa. Cantidades mayores o menores influirían en la manifestación y claridad de los halos de inhibición. Al

Figura 3 - Microfotografías electrónicas de partículas de "Fluocinas BC8" parcialmente purificadas y teñidas con acetato de uranilo 1%. Partículas de tipo baciliforme en la cual se aprecia una fina conformación helicoidal, formada por un cilindro interno y una vaina externa con las siguientes dimensiones: largo 150nm; diámetro 25nm. y paso de espiral a 5nm. 300.000X.



estudiar los extractos crudos de la cepa BC8, bajo microscopía electrónica, las microfotografías revelan partículas tipo bacteriocinas similares a las piocinas aisladas de *P. aeruginosa* (8, 11, 12).

Por otra parte, al depositar gotas de estos extractos sobre un tapiz de *P. solanacearum*, se produjeron evidentes zonas de inhibición. Desconocemos el mecanismo por el cual esta partícula actúa sobre *P. solanacearum*. Sin embargo, en estudios realizados con "piocinas" ha sido posible demostrar efectos de lisis celular. Estas partículas son capaces de unirse a receptores dispuestos en la membrana celular y de esta forma producir cambios metabólicos irreversibles que llevan a la muerte celular (8). De igual forma, se ha estudiado el modo de acción de la agrocinina 84 producida por *Agrobacterium radiobacter*, la cual inhibe específicamente la síntesis de DNA de *A. tumefaciens* (19).

Reeves (17) denomina "Fluocinas" a todas las partículas producidas por *P. fluorescens*. Siguiendo éste criterio, la bacteriocina aislada en este trabajo ha sido denominada "Fluocina BC8".

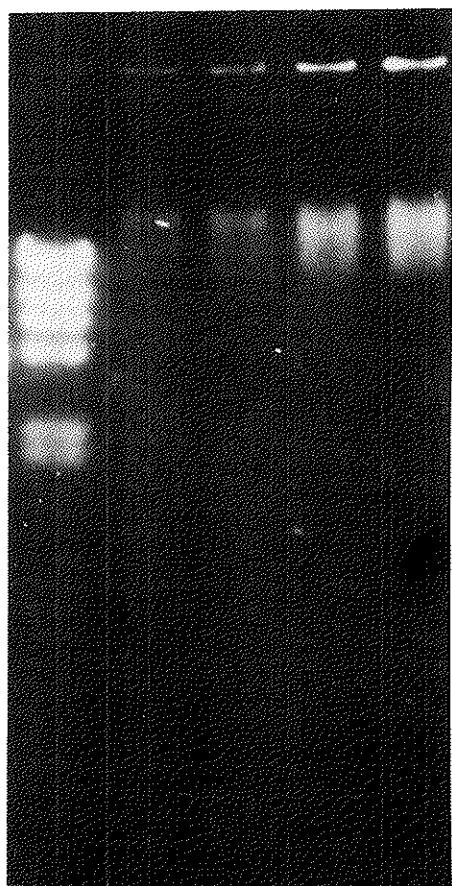
Bradley (2) ha señalado que *P. fluorescens* es capaz de producir tres tipos diferentes de "fluocinas", entre las cuales se encuentra una de forma bacilar, similar a la encontrada en este estudio. Además, sugiere que las bacteriocinas pueden clasificarse en dos grandes grupos, el primero, partículas de bajo peso molecular, tripsina sensible y termoestable. El segundo de alto peso molecular, tripsina resistente y termolábil. Del origen de las bacteriocinas se especula mucho, algunos sugieren que debido a la similitud de la piocinas con la cola del bacteriófago T4 de *Escherichia coli*, estas deberían provenir de un tipo defectuoso de fago lisogénico (12).

Los resultados preliminares obtenidos en la detección de plásmidos de la cepa BC8, permite pensar que la producción de "Fluocinas BC8", no es dependiente de estos, ya que, en las corridas electroforéticas no fue posible determinar elementos extracromosomales. Por lo tanto, se podría decir primariamente que, la información genética que codifica para estas sustancias se encontraría ubicada en el genoma de *P. fluorescens* BC8.

Otras bacteriocinas producidas por *Pseudomonas* sp poseen su información genética en el cromosoma bacteriano (19). Al realizar el mapeo genético de la piocina R₃ se ha determinado que el operón que codifica para esta sustancia se localiza en las proximidades del marcador triptófano del genoma de *P. aeruginosa* (13). Para

Figura 4 - Electroforesis de ácidos nucleicos de *P. fluorescens* BC8 en gel agaroso al 1% en buffer TE.
Símbolos: 1 = DNA de bacteriófago Lambda digerido con HIND III; 2, 3, 4 y 5 = Diluciones de la muestra de ácidos nucleicos; a = DNA cromosomal.

(KPB) 1 2 3 4 5



confirmar o refutar los resultados preliminares obtenidos se debe continuar trabajando en este aspecto. De igual forma, la fluocina BC8 aislada debe ser estudiada con el propósito de caracterizarla y conocer mas de su estructura. Además, deben realizarse estudios de cinética de infección de la bacteria sensible y del espectro antibacteriano de esta partícula.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer al Sr. Marco Antonio Gonzales por su colaboración en la transcripción del manuscrito.

Referencias Bibliográficas

1. Birnboim, H. & Doly, L. - A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids. Res.* 7:1513-1523, 1979.
2. Bradley, D.E. - Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriol. Rev.*, 31:23-314, 1967.
3. Centro Internacional de la Papa. - Marchitez Bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) de la Papa en América Latina. Lima, CIP 120pp., 1984.
4. Ciampi, L. - Bacterial wilt of Potato in Chile. *Plant Dis.*, 68:822-823, 1984.
5. Ciampi, L.; Bustamante, P. & Polette, M. - Isolation of soil bacteria with inhibitory activity to *Pseudomonas solanacearum*. In: Civerolo, E., Collmer, A., Davis, R., & Gillaspie, A., Eds. - Plant Pathogenic bacteria. The Netherlands. Nijhoff Publishers, 733-739pp., 1987.
6. Fernandez, C. - Determinación de la Marchitez Bacteriana causada por *Pseudomonas solanacearum* en papa. E.F. Smith. Agricultura Técnica (Chile). 44:173-174, 1984.
7. Fredericq, P. - Actions antibiotiques reciproques chez les Enterobacteriaceae. *Rev. Belg. Pathol. Med. Exp.*, 19:1-107, 1948.
8. García-Quintana, H.; Hernandez, A.; Asenjo, S. & Polette, M. - Ultraestructura de piocinas de *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Med. Chile*, 107:479-485, 1979.
9. Glauert, A. In: Kay, B., Ed. Techniques for electron microscopy - Oxford, 254-310pp., 1965.
10. Hardy, K.G. - Colicinogeny and related phenomena. *Bact. Rev.*, 39:464-515, 1975.
11. Higgerd, T.B.; Baechler, Ch.A. & Berk, R.S. - In vitro and in vivo characterization of pyocin. *J. Bacteriol.*, 93:1976-1986, 1967.
12. Kageyama, M. - Studies of a pyocin I. Physical and Chemical properties. *J. Biochem (Japan)*, 55:49-53, 1964.
13. Kageyama, M. & Inagaki, A. - Genetic mapping of pyocin R3 factor in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 20:257-258, 1974.
14. Kelman, A. - The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on tetrazolium medium. *Phytopathology*, 44:693-695, 1954.
15. King, E.O.; Ward, M.K. & Raney, D.E. - Two simple media for the demonstration, of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.*, 44:301-307, 1954.
16. Maniatis, T.; Fritsch, E. & Sambrook, J. - Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York., 1982.
17. Reeves, P. - The Bacteriocins. *Bacteriol. Rev.*, 29:24-45, 1965.
18. Vidaver, A.K. - Bacteriocins: The lure and reality. *Plant Dis.*, 67:471-475, 1983.
19. Vidaver, A.K.; Mathys, M.L.; Thomas, M.E. & Schuster, M.L. - Bacteriocins of the phytopathogens *Pseudomonas syringae*, *P. glycinea* and *P. phaseolicola*. *Can. J. Microbiol.*, 18:705-713, 1972.

COMPORTAMENTO DE *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* NA PRESENÇA DOS PLASMÍDIOS RK2 OU RP4*

Olney Marci de Paula

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

Recebido para publicação em 17/06/88

Arnaldo Chaer Borges
Walter Vieira Guimarães
& Daison Olzany Silva

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

Resumo

O comportamento de *Bradyrhizobium japonicum* W46C, W52C e W60C, em presença dos plasmídios RK2 ou RP4 foi estudado em relação ao tempo de geração, à sobrevivência das células e estabilidade dos plasmídios à radiação ultravioleta e a cinética de transferência do plasmídio RK2. Os isolados de *B. japonicum* W46C, W52C e W60C apresentaram tempos de geração acima de 10 horas quando cultivados em meio HM-YEM, pH 6,6. A presença dos plasmídios RK2 ou RP4 aumentou o tempo de geração dos transconjugantes, de 3,3 a 35,2%, dependendo do isolado utilizado no cruzamento. A sobrevivência das transconjugantes foi afetada diferentemente pela radiação ultravioleta, sendo sempre maior quando a incubação foi feita em presença de luz. A presença do plasmídio RP4 nas células de W60C parece interferir no sistema de reparo do ADN por fotorreativação. Grande estabilidade dos plasmídios RK2 ou RP4 à radiação ultravioleta foi observada nos transconjugantes, mesmo com 25 segundos de irradiação. A frequência de transmissão do plasmídio RK2 foi aumentada cerca de 10 vezes quando a célula doadora foi irradiada por 15 ou 25 segundos. Esta constatação sugere que a radiação ultravioleta pode ser utilizada para facilitar a transferência de plasmídios R em *B. japonicum*.

Summary

Behavior of Bradyrhizobium japonicum in the presence of plasmids RK2 or RP4

The behavior of *Bradyrhizobium japonicum* isolates W46C, W52C and W60C, in the presence of the plasmids RK2 or RP4, was studied with respect to generation time, cell survival and plasmid stability after exposure to ultraviolet radiation, and the kinetics of plasmid RK2 transfer. The *B. japonicum* W46C, W52C and W60C isolates presented generation times above 10 hours when cultiva-

* Parte da tese de mestrado em Microbiologia Agrícola/UFV do primeiro autor.

ted in HM-YEM medium, pH 6.6. The presence of plasmids RK2 or RP4 increased transconjugant generation times by 3.3 to 35.2%, depending on the isolate used in the mating. Transconjugant survival was differently affected by UV radiation and was always greater when the incubation was done in presence of light. The presence of plasmid RP4 in the W60C cells appears to interfere in the system of DNA repair by photoreactivation. High RK2 and RP4 plasmid stability was observed in the transconjugants, even with 25 seconds of irradiation. The plasmid RK2 transmission frequency was increased approximately 10 times when the donor cells were irradiated during 15 or 25 seconds. This result suggests that UV radiation can be employed to facilitate R plasmids transfer in *B. japonicum*.

Introdução

Bradyrhizobium (Kirchner, 1896) Jordan 1982, é a nova denominação dada ao gênero de bactérias incluído na família *Rhizobiaceae* (Conn, 1938), que possui a característica de formar nódulos em raízes de plantas leguminosas originárias de regiões tropicais e, também, em algumas de zonas temperadas, que apresentam crescimento lento em meio extrato de levedura-manitol. Bactérias desse gênero produzem uma reação alcalina em meio de sais minerais com manitol e apresentam uma concentração molar de G+C no ADN, calculada pela temperatura de desnaturação média (T_m) correspondente a 61 - 65%, exceto para estirpes provenientes de nódulos de *Lotononis* (16). A espécie tipo *B. japonicum* forma nódulos em espécies de *Glycine* (soja) e em *Macroptilium atropurpureum* (siratro). Ainda segundo Jordan (16), o gênero *Bradyrhizobium* é heterogêneo e a relação taxonômica dos componentes ainda não está bem entendida. Já existem sugestões de separação de *B. japonicum* em pelo menos 3 grupos, de acordo com os estudos da homologia do ADN, sendo possível que, em futuro, essa espécie possa vir a ser desmembrada em várias espécies ou biovars (13).

O processo de nodulação das raízes e a fixação do nitrogênio atmosférico pela bactéria *B. japonicum* ocorre às expensas de determinantes genéticos da planta e da bactéria. Na bactéria, entre os determinantes que fazem parte dos genes denominados nif, encontram-se os que conferem a capacidade de iniciar e estabelecer o processo infeccioso, conhecidos como inf (infectividade); de formar nódulos (nod) e de fixar o N₂ atmosférico (fix) (2, 23).

O mapeamento e a análise genética destes determinantes têm sido efetuados utilizando-se rizóbios de diferentes grupos de inoculação (14, 18, 23). Em algumas espécies estes determinantes tem sido evidenciados em plasmídios (1, 11, 12, 15, 18, 25). O estudo de plasmídios tem resultado em um maior conhecimento sobre a genética dos rizóbios de crescimento rápido em meio extrato de levedura - manitol, que fazem parte do gênero *Rhizobium* Frank 1889, do que os de crescimento lento. A obtenção de mutantes auxotróficos desses últimos é mais difícil e o mapa de marcas cromossômicas ainda está em elaboração. Contudo, genes requeridos para a nodulação já foram transferidos de *B. japonicum* para *Azotobacter vinelandii* (19) e plasmídios do grupo de incompatibilidade P₄ já foram transferidos, por conjugação, dentro e entre estirpes de *B. japonicum* sorologicamente distintas (9, 21).

A introdução de plasmídios em uma célula bacteriana pode promover alterações no seu comportamento pela presença de informações genéticas adicionais. Em *A. vinelandii*, a presença de plasmídios do grupo IncP ou IncQ resultou em alteração na morfologia das colônias, reduziu o tamanho das células, aumentou a produção de exopolissacarídeo e diminuiu a capacidade de fixação do N₂ atmosférico das células (7). Em rizóbio, a introdução dos plasmídios pRDL e R68.45 resultou em transconjugantes com menor capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico (17). A presença de plasmídios pode resultar também em alterações na permeabilidade da célula (10), no tempo de geração (17) e na virulência do patógeno (20), entre outras características.

O presente trabalho teve como objetivo estudar as alterações ocorridas em células de *B. japonicum* portadoras dos plasmídios RK2 ou RP4.

Material e Métodos

As culturas bacterianas utilizadas, suas características e suas origens estão relacionadas na Tabela 1. Elas foram mantidas em tubos de cultura contendo meio ágar-HM-YEM de Cole & Elkan (3), em geladeira, sendo reativadas em meio HM-YEM, a períodos de seis meses.

Para o crescimento das células foi utilizado o meio HM-YEM de Cole & Elkan (3). Os plasmídios RK2 e RP4 foram transferidos das doadoras *Escherichia coli* J53 R⁺ para as receptoras *B. japonicum* R⁻, pelo processo de conjugação, em meio líquido (9).

As curvas de crescimento dos transconjugantes *B. japonicum* R⁺ e das receptoras *B. japonicum* R⁻ em meio HM-YEM foram determinadas em espectrofotômetro Spectronic 20, Bausch & Lomb, sendo a absorbância lida a 540nm. Foram utilizados 0,5ml de cada cultura previamente crescida em meio HM-YEM, pH 6,6, à 28°C por 72 horas, para inocular 15ml do meio HM-YEM contidos em frascos Erlenmeyer de 250ml. Os frascos foram incubados a 28°C e a absorbância foi lida a diferentes intervalos de tempo. A fase logarítmica de crescimento foi determinada graficamente ajustando-se a equação da reta para o cálculo do tempo de geração de cada cultura.

A sensibilidade dos transconjugantes *B. japonicum* R⁺ e das receptoras *B. japonicum* R⁻ à radiação ultravioleta (UV) foi testada em meio ágar HM-YEM. As suspensões de células em fase logarítmica de crescimento foram diluídas e alíquotas de 10µl foram transferidas para a superfície do meio para formar 10 micropontos por placa. Após a secagem das micropontos em temperatura ambiente, as placas foram expostas à radiação UV por 0, 5, 10, 20 e 25 segundos, utilizando-se uma lâmpada UVS-11, "Short Wave", fixada a 12cm da superfície do meio. Um conjunto de placas irradiadas foi incubado em presença e outro em ausência de luz, a 28°C por 96 a 120 horas. Para cada tempo de exposição, foram feitas 2 repetições de cada diluição. Após a contagem das colônias, foi determinada a curva de sobrevivência.

A estabilidade dos plasmídios RK2 e RP4 foi testada nos transconjugantes, após a aplicação da radiação UV. Inicialmente, os transconjugantes foram cultivados em meio HM-YEM contendo 50µg/ml de canamicina e, em seguida, alíquotas de 10µl de diluições apropriadas das células foram inoculadas em meio HM-YEM. Após a secagem das micropontos, as placas foram irradiadas com UV por 0, 15 e 25 segundos, utilizando-se uma lâmpada de UV, UVS-11 "Short Wave", fixada a 12cm da superfície do meio. As placas foram incubadas à 28°C por 120h, em ausência de luz. A seguir, várias colônias de cada placa foram transferidas para caldo HM-YEM contendo 50µg/ml de canamicina. A presença de crescimento celular foi determinada pela turvação do meio de cultura após a incubação a 28°C por 120h.

A cinética de transmissão do plasmídio RK2 em *B. japonicum*, após a aplicação da radiação UV, foi determinada utilizando-se o transconjugante W52CK como doadora e a estirpe SEMIA 586 como receptora. A seleção foi feita em meio HM-YEM contendo 100µg/ml de canamicina e a contra-seleção em 100µg/ml de gentamicina. As células doadoras e receptoras foram cultivadas individualmente em meio líquido HM-YEM até a fase logarítmica de crescimento. A seguir, as células doadoras foram submetidas à radiação UV por 0, 15 e 25 segundos e misturadas com as células receptoras. Para o tempo de exposição zero, misturou-se 0,5ml da suspensão de células doadoras e 4,5ml da suspensão de células receptoras com 5ml do meio HM-YEM. Para o cruzamento com doadoras irradiadas por 15 segundos utilizou-se 0,4ml da suspensão de doadoras, 2,8ml da suspensão de receptoras e 3,2ml de meio HM-YEM. O cruzamento com doadoras irradiadas por 25 segundos foi feito misturando-se 0,75ml da suspensão de doadoras, 3ml da suspensão de receptoras e 3,75ml de meio HM-YEM. Todos os cruzamentos foram incubados a 28°C na ausência de luz e após 0, 6, 12 e 24h, foram interrompidos por agitação vigorosa. A seguir, foram espalhadas na superfície do meio HM-YEM, contendo 100µg/ml de canamicina e 100µg/ml de gentamicina, 0,1ml de cada uma das três misturas e das diluições 10⁻¹. Após incubação à 28°C por 120h na ausência de luz, o número de transconjugantes foi determinado. A população de células doadoras após cada tempo de irradiação foi determinada espalhando-se 0,1ml de células irradiadas, em diluições adequadas, na superfície do meio HM-YEM, sem antibiótico. Após incubação à 28°C por 120 horas, na ausência de luz, determinou-se o número de células doadoras.

Resultados e Discussão

As culturas de *B. japonicum* W46C, W52C e W60C, isoladas de nódulos de soja (9), apresentaram tempos de geração acima de 10h quando cultivadas em meio HM-YEM, pH 6,6 (Tabela 2). Segundo Vincent (24), *B. japonicum* apresenta um tempo de geração que pode variar de 6 a 14h, em meio com extrato de levedura e pH entre 5,5 e 7,5. No meio HM-YEM, um meio semi-sintético, contendo extrato de levedura, os valores dos tempos de geração encontrados para os isolados W46C, W52C e W60C se enquadram naqueles indicados para a espécie.

A presença dos plasmídios RK2 ou RP4 resultou em aumentos distintos nos tempos de geração dos transconjugantes (Tabela 2). A percentagem desses aumentos sobre a cultura original parece ser função de uma interação plasmídio X célula receptora original, e não uma característica conferida exclusivamente pelos plasmídios. Kennedy & Col. (17) observaram que a introdução do plasmídio pRD1 e R68.45 em rizóbio do grupo "cowpea" resultou em aumento do tempo de geração dos transconjugantes. O mecanismo responsável por esta alteração não foi esclarecido. Deve-se, no entanto, ressaltar que tanto os plasmídios pRD1 e R68.45 usados por Kennedy & Col. (17) quanto os plasmídios RK2 e RP4, utilizados neste trabalho, pertencem ao grupo de incompatibilidade IncP, indicando comportamento comum entre eles.

As curvas de sobrevivência dos isolados originais e dos transconjugantes de *B. japonicum*, após vários períodos de irradiação com UV, estão representadas nas Figuras 1, 2 e 3. As culturas irradiadas com UV e incubadas em presença de luz (Figuras 1A, 2A e 3A) apresentaram maior percentagem de células sobreviventes que as mesmas culturas irradiadas e incubadas em ausência de luz (Figura 1B, 2B e 3B), indicando que o sistema de reparo por fotorreativação está presente e se expressando, o que também ocorre em outras espécies bacterianas (8).

Em ausência de luz, os transconjugantes W46CK e W46CP foram mais sensíveis à radiação UV do que a W46C original (Figura 1B), sendo que essa diferença se acentuou com o tempo de irradiação. Após 25 segundos de irradiação, a cultura W46C apresentou em torno de 12% de sobreviventes ao passo que nos transconjugantes W46CK e W46CP esse valor se situou em torno de 4%. Também na incubação em presença de luz a percentagem de células sobreviventes dos transconjugantes, após 25 segundos de irradiação com UV foi menor do que as da cultura original (Figura 1A). A presença dos plasmídios RK2 ou RP4 aparentemente não alterou o comportamento da cultura original após a irradiação e incubação em presença ou ausência de luz (Figura 2). No entanto, a presença de plasmídio RP4 aumentou a resistência à radiação UV do transconjugante W60CP quando a incubação foi feita em presença de luz (Figura 3A).

Tabela 1 - Características relevantes e origem das culturas de *Bradyrhizobium japonicum* utilizadas.

Símbolos: Ap = Ampicilina; Cm = Cloranfenicol; Km = Canamicina; Tc = Tetraciclina; r = Resistente; s = Sensível.

Culturas de <i>B. japonicum</i>	Características relevantes	Plasmídios	Origem
SEMIA 586	Tipo selvagem		MIRGEN-P. Alegre-RS
W46C	Ap ^r Cm ^r Tc ^r Km ^s		UV - Viçosa - MG
W52C	Ap ^r Cm ^r Tc ^r Km ^s		UV - Viçosa - MG
W60C	Ap ^r Cm ^r Tc ^r Km ^s		UV - Viçosa - MG
W46CK	Ap ^r Cm ^r Tc ^r Km ^r	RK2	UV - Viçosa - MG
W52CK	Ap ^r Cm ^r Tc ^r Km ^r	RK2	UV - Viçosa - MG
W60CK	Ap ^r Cm ^r Tc ^r Km ^r	RK2	UV - Viçosa - MG
W46CP	Ap ^r Cm ^r Tc ^r Km ^r	RP4	UV - Viçosa - MG
W52CP	Ap ^r Cm ^r Tc ^r Km ^r	RP4	UV - Viçosa - MG
W60CP	Ap ^r Cm ^r Tc ^r Km ^r	RP4	UV - Viçosa - MG
			UV - Viçosa - MG

Tabela 2 - Tempo de geração das culturas originais e dos transconjugantes de *Bradyrhizobium japonicum* em meio HM-YEM, pH 6,6.

Culturas de <i>B. japonicum</i>	Plasmídios	Tempo de geração (horas)	Aumento sobre cultura original %	
			Originais	Transconjugantes
W46C		10,8		
W52C		10,6		
W60C		12,2		
W46CK	RK2	14,6		35,2
W52CK	RK2	11,2		5,7
W60CK	RK2	13,8		13,1
W46CP	RP4	13,6		25,9
W52CP	RP4	12,8		20,7
W60CP	RP4	12,6		3,3

Figura 1 - Percentagem de células sobreviventes de *Bradyrhizobium japonicum* W46C, W46CK e W46CP, após diferentes períodos de exposição à radiação ultravioleta e incubação em presença (A) e em ausência de iluminação (B). Médias de dois experimentos.

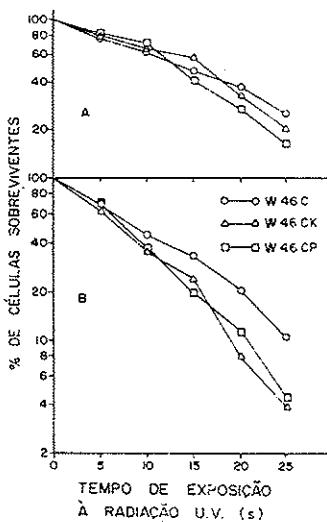


Figure 2 - Percentagem de células sobreviventes de *Bradyrhizobium japonicum* W52C, W52CK e W52CP, após diferentes períodos de exposição à radiação ultravioleta e incubação em presença (A) e em ausência de iluminação (B). Médias de dois experimentos.

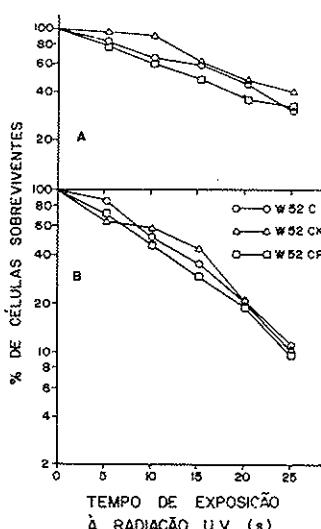
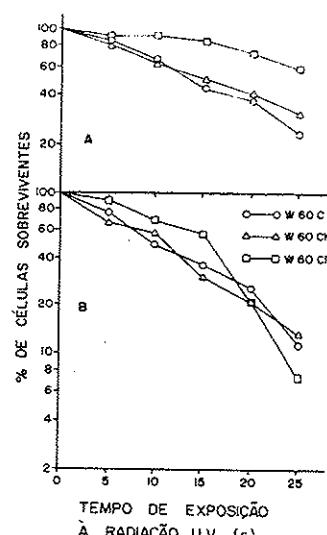


Figure 3 - Percentagem de células sobreviventes de *Bradyrhizobium japonicum* W60C, W60CK e W60CP, após diferentes períodos de exposição à radiação ultravioleta e incubação em presença (A) e em ausência de iluminação (B). Médias de dois experimentos.



Algumas das alterações causadas no comportamento das células pela presença de plasmídios tem sido explicadas pela incompatibilidade existente entre eles, onde aquele que é introduzido interfere com a expressão de plasmídios já existentes na célula (6). No presente trabalho, a alteração no comportamento celular não parece estar relacionada com incompatibilidade plasmidial, uma vez que a capacidade de sobreviver à radiação UV depende da expressão dos sistemas de reparos das células e os genes envolvidos nestas funções geralmente são cromossomais.

Grande estabilidade dos plasmídios RK2 e RP4 à radiação UV foi observada em transconjugantes de *B. japonicum*, uma vez que essas células submetidas à radiação UV por até 25 segundos não perderam a característica de resistência à canamicina conferida pelos plasmídios. Essa expressão fenotípica indica que as células hospedeiras garantiram a capacidade de replicação dos plasmídios.

A cinética de transmissão do plasmídio RK2 em *B. japonicum*, após exposição das células doadoras a diferentes períodos de irradiação com UV, está representada na Figura 4. Quando as células doadoras foram irradiadas por 15 segundos, a frequência de transmissão do plasmídio RK2 aumentou cerca de 10 vezes em relação às doadoras não irradiadas e, o tratamento das doadoras por 25 segundos produziu uma frequência de transmissão maior do que no de 15 segundos, nos diferentes tempos de exposição (Figura 4). Dunigan & Col. (4) relatam que a radiação UV aumenta a transferência de genes em razão do estímulo à ocorrência de eventos de recombinação entre os genes plasmidiais e cromossomais. Estímulos dessa radiação à transferência de genes cromossomais, mediada por plasmídios, têm sido constatados em outras bactérias (5, 23). Apesar do efeito letal da radiação UV em células de *B. japonicum* (Figuras 1, 2 e 3), a frequência de transferência do plasmídio RK2 foi consideravelmente aumentada (Figura 4). Esta constatação indica que a radiação UV pode ser utilizada para facilitar a transferência de plasmídios R em *B. japonicum*.

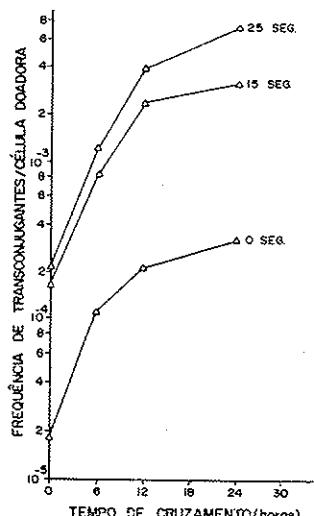
Figure 4 - Frequência de transconjugantes após a exposição das células doadoras de *B. japonicum* W52CK à radiação ultravioleta por 0, 15 e 25 segundos e cruzamentos com a receptora SEMIA 586 por 0, 6, 12 e 24 horas.

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Os professores agradecem ainda ao CNPq a distinção conferida pela concessão de bolsas de pesquisa.

Referências Bibliográficas

1. Barbour, W.M.; Mathias, J.N. & Elkan, G.H. - Evidence for plasmid - and chromosome - borne multiple nif genes in *Rhizobium fredii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50:41-44, 1985.
2. Beringer, J.E. - The development of *Rhizobium* genetics. *J. Gen. Microbiol.*, 116:1-7, 1980.
3. Cole, M.A. & Elkan, G.H. - Transmissible resistance to penicillin - G, neomycin and chloramphenicol in *Rhizobium japonicum*. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 4:240-253, 1973.
4. Dunigan, L.K. & Cannon, F.C. - The genetic control of symbiotic properties in *Rhizobium*: evidence for plasmid control. *Plant and Soil, Special Volume*, 101:73-79, 1971.
5. Evenchik, Z.; Stacey, K.A. & Hayes, W. - Ultraviolet induction of chromosome transfer by autonomous sex factor in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.*, 56:1-14, 1969.
6. Falkow, S. - Infection multiple drug resistance. London, Pion Limited, 1975.
7. Glick, B.R.; Brooks, H.E. & Pasternak, J.J. - Physiological effects of plasmid DNA transformation on *Azotobacter vinelandii*. *Can. J. Microbiol.*, 32:145-148, 1986.
8. Grossman, L.; Braun, A.; Feldberg, R. & Mahler, I. - Enzymatic repair of DNA. *Ann. Rev. Biochem.*, 44:19-43, 1975.
9. Guimarães, W.V.; Borges, A.C.; Silva, D.O. & Cassini, S.T.A. - Transfer of IncP-1 drug resistance plasmids from *Escherichia coli* to *Rhizobium japonicum*. *Rev. Microbiol.*, 12:129-133, 1981.
10. Hesslewood, S.R. & Smith, J.T. - Envelope alterations produced by R factors in *Proteus mirabilis*. *J. Gen. Microbiol.*, 85:146-152, 1974.
11. Hirsch, P.R. - Plasmid - determined bacteriocin production by *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.*, 113:219-228, 1979.
12. Hynes, M.F.; Simon, R.; Miller, P.; Nirhaus, K.; Labes, M. & Pühler, A. - The two megaplasmids of *Rhizobium meliloti* are involved in the effective nodulation of alfalfa. *Mol. Gen. Genet.*, 202:356-362, 1986.
13. Hollis, A.B.; Kloss, W.E. & Elkan, G.H. - DNA:DNA hybridizations studies of *Rhizobium japonicum* and related *Rhizobiaceae*. *J. Gen. Microbiol.*, 123:215-222, 1981.
14. Johnston, A.W.B. & Beringer, J.E. - Chromosomal recombination between *Rhizobium* species. *Nature*, London, 267:611-613, 1977.
15. Johnston, A.W.B.; Beynon, J.L.; Buchnan - Wollaston, A.V.; Setchel, S.M.; Hirsch, P.R. & Beringer, J.E. - High frequency transfer of nodulating ability between strains and species of *Rhizobium*. *Nature*, London, 276:634-636, 1978.



16. Jordan, D.C. - Genus II. *Bradyrhizobium*. In: Krieg, N.R. & Holt, J.G. eds. Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore, Williams & Wilkins, v.1, section 4, 242-244p., 1984.
17. Kennedy, C.; Dreyfus, B. & Brockwell, J. - Transfer, maintenance and expression of P plasmids in strains of "cowpea" rhizobia. *J. Gen. Microbiol.*, 125:233-240, 1981.
18. Masterson, R.V.; Russel, P.R. & Atherly, A.G. - Nitrogen fixation (nif) genes and large plasmids of *Rhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.*, 152:928-931, 1982.
19. Maier, R.J.; Bishop, P.E. & Brill, W.J. - Transfer from *Rhizobium japonicum* to *Azotobacter vinelandii* of genes required for nodulation. *J. Bacteriol.*, 134:1199-1201, 1978.
20. New, P.B.; Scott, J.J.; Ireland, C.R.; Farrand, S.K.; Lippincott, B.B. & Lippincott, J.A. - Plasmid pSa causes loss of LPS-mediated adherence in *Agrobacterium*. *J. Gen. Microbiol.*, 129:3657-3660, 1983.
21. Pilacinski, W.P. & Schmidt, E.L. - Plasmid transfer within and between serologically distinct strains of *Rhizobium japonicum* using antibiotic resistant mutants and auxotrophs. *J. Bacteriol.*, 145:1025-1030, 1981.
22. Rajchert-Trypil, M. Dobrzánski, W.T. - Influence of mutagenic agents on the integration of the F episome into the chromosome of *Escherichia coli* K12·F⁺. *J. Gen. Microbiol.*, 54:47-57, 1968.
23. Stanley, J. & Dunican, L.K. - Intergeneric mobilization of *Rhizobium* nif genes to *Agrobacterium* and *Klebsiella*. *Mol. Gen. Genet.*, 174:211-220, 1979.
24. Vincent, J.M. - *Rhizobium*: general microbiology. In: Hardy, R.W.F. & Silver, W.S. eds - A treatise on dinitrogen fixation. Section III - Biology. New York, John Wiley, 1977.
25. Zurkowski, W. - Molecular mechanism for loss of nodulation properties of *Rhizobium trifolii*. *J. Bacteriol.* 150:999-1007, 1982.

DRUG RESISTANCE AND COLICINOGENY OF *SALMONELLA TYPHIMURIUM* STRAINS ISOLATED FROM SEWAGE-CONTAMINATED SURFACE WATER AND HUMANS IN BELO HORIZONTE, BRAZIL

Yeda Xênia Sant'Ana
Edmar Chartone-Souza

Recebido para publicação em 18/08/88

Depto de Biologia Geral
Instituto de Ciências Biológicas UFMG
Av. Antonio Carlos, 6627
30161 Belo Horizonte MG, Brasil

Maria das Dores Ferreira

Depto de Microbiologia
Instituto de Ciências Biológicas UFMG

Summary

Two hundred and thirty *Salmonella typhimurium* strains from sewage-contaminated waters, and 30 *S. typhimurium* from patients in Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil, were assayed for resistance to 10 antimicrobial agents and for colicinogeny. Resistance was found in 7.39% of *S. typhimurium* from the open sewers and in 96.6% of strains from patients. The resistance markers spectra for *S. typhimurium* from sewers showed a maximum of five markers; in contrast, with one exception, five was the minimum number of resistance markers for strains from patients. In conjugation assays, the transferred resistance markers were single, double or, at most, triple, even when the donor was multiply-resistant. Of the strains isolates, 2.17% of strains from sewage and 6.7% of strains from patients were colicinogenic. All colicinogenic isolates produced colicin Ib. Most *S. typhimurium* from humans had similar plasmid profiles whilst there was variation in the plasmid profiles of strains from sewers.

Resumo

Resistência a drogas e colicinogenia em linhagens de *Salmonella typhimurium* isoladas de ribeirões-esgotos e de pacientes em Belo Horizonte, Brasil

Duzentas e trinta amostras de *Salmonella typhimurium* isoladas de águas contaminadas por esgotos (ribeirões Arrudas e Onça) e 30 amostras de *S. typhimurium* isoladas de casos clínicos, em Belo Horizonte, Minas Gerais, foram analisadas em relação à resistência a 10 agentes antimicrobianos e colicinogenia. Observou-se 7,39% de resistência para amostras coletadas nos esgotos e 96,6% em amostras de doentes. O modelo de resistência das amostras de *S. typhimurium* isoladas de esgotos apresentou um máximo de cinco marcadores; em contraste, as amostras oriundas de pacientes, com uma única exceção, apresentaram o mínimo de cinco

marcadores de resistência, cada uma. Nos experimentos de conjugação, os marcadores de resistência transferidos foram simples, duplos, ou, no máximo, triplos, mesmo quando o doador apresentava múltipla resistência. Salienta-se que, 2,17% das amostras de esgotos e 6,7% de casos clínicos eram colicinogênicas, produzindo apenas a colicina do tipo Ib. A maioria das amostras de *S. typhimurium* isoladas de pacientes apresentava perfis de bandas plasmidiais similares, enquanto ocorreram variações nos perfis plasmidiais das amostras originadas de águas contaminadas por esgotos.

Introduction

Resistance plasmids in *Salmonella* have been subject of extensive research because of their importance for Public Health in Britain (3), Malaysia (11) and Brazil (4, 18, 19, 25, 29).

Other types of plasmid which studies may have a role in the control of bacterial population are those which code for colicinogeny (Col.). Many properties of coliconogeny plasmids are similar to those of the R-plasmid (12).

The objectives of this study were to determine the frequency of resistance to 10 antimicrobial agents and the conjugative nature of this resistance in *S. typhimurium* from sewage-contaminated surface water (Arrudas and Onça) and from patients examined at outpatient clinics or in hospitals in Belo Horizonte, to determine the colicinogeny of these strains. It has been the intention of this study, as well, to carry out a preliminary analysis of the plasmidial pattern in some strains of both collections of *S. typhimurium* and its transconjugants.

Material and Methods

Bacterial strains - The two populations were comprised of 230 *S. typhimurium* strains named "BH", isolated from Arrudas and Onça streams, in Belo Horizonte, State of Minas Gerais, during 1973 and 1974, and 30 *S. typhimurium* named "ED", isolated from outpatient clinics and nosocomial patients, in Belo Horizonte, from 1979 to 1981. Strains were provided by the Central Laboratory of the Fundação Ezequiel Dias and were identified by methods of Edwards and Ewing (7), by authors and Dr. E. Hofer at FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

Media and Growth conditions - Levels of resistance were determined using the plate dilution technique, with drug concentrations starting at 1 μ g/ml and increasing in multiples of 2 up to 8,192 μ g/ml. The medium used was Mueller-Hinton agar (Difco). The following drugs were used: nalidixic acid (Nx), Sigma; ampicillin (Ap) and kanamycin sulfate (Km), Bristol; mercury dichloride (Hg), Merck; sodium cephalotin (Ce), Lilly; chloramphenicol (Cm), tetracycline hydrochloride (Tc) and rifampicin (Rf), Lepetit; streptomycin sulfate (Sm), Fontoura-Wyeth and gentamicin sulfate (Gm) Schering.

Isolates were classified as resistant when grew in the drug concentrations of 8 μ g/ml or more, except for rifampicin, for which the level selected was 16 μ g/ml due to the high level of natural resistance observed.

Plasmid transfer - All resistant isolates from open sewers and a representative sampling of isolates from patients were submitted to conjugation using the method of Watanabe and Fukasawa (32). The following receptor strains were used in intergeneric conjugation assays: *E. coli* K₁₂ Sm^r, non-lactose fermenting (Lac⁻), resistant to 500 μ g/ml streptomycin, and noncolicinogenic (Col⁻); *E. coli* K₁₂ Sm^r Rf^r, a mutant resistant to 100 μ g/ml rifampicin derived from the previous *E. coli* K₁₂ Sm^r strain; *E. coli* K₁₂ Nx^r Rf^r, lactose fermenting (Lac⁺), and resistant to 100 μ g/ml nalidixic acid and rifampicin.

The following *S. typhimurium* strains, prepared in this laboratory, were used as receptors in intragenetic conjugation assays: BH 063, a mutant resistant to 100 μ g/ml nalidixic acid, and noncolinogenic (Col^-); BH 161, a mutant resistant to 100 μ g/ml streptomycin, and noncolicinogenic (Col^-); BH 172, a mutant resistant to 100 μ g/ml rifampicin, and noncolicinogenic (Col^-).

Donor and receptor strains were grown in nutrient broth (Difco) at 37°C for 24 hr. In preparing mixed culture, aliquots from both strains were transferred to nutrient broth and incubated for 5 - 7 hours at 37°C. The selective media was prepared in EMB Agar (Merck).

Some samples chosen because their resistance markers, obtained from clinical cases, which showed a wide spectrum of non autotransferring resistance, underwent conjugation assays, using the plasmid RP4, carried by *E. coli* J. 53 (5). Mixed cultures in a ratio of 1:1 were incubated in Luria agar medium overnight at 37°C. Resulting transconjugants were then crossed with *E. coli* K12 Sm^r Rf^r receptor strain.

Colicin - Colicin production was determined as described by Costa (5). The indicator strain was *E. coli* K12 Sm^r .

Plasmid DNA isolation - The isolation of plasmid DNA and molecular weight estimation were determined in 0.8% agarose gels (17). Plasmids with known molecular weights were used as standards: p307: 54 Md; RP4: 34 Md; Sa: 23 Md and pBR 322: 2.6 Md.

Table 1 - Patterns of drug resistance among *S. typhimurium* isolated from waters contaminated with sewage (open sewers Arrudas and Onça) in 1973 and 1974.

Symbols: * = Resistance up to 8000 μ g/ml of Rifampicin.

Resistance pattern	Isolates
Rf	BH 014; BH 163*
Sm	BH 029; BH 051; BH 084; BH 101
Tc	BH 031; BH 076; BH 167; BH 223
Apx ₁ SmRfC	BH 055
RfC	BH 070
ColSmRfC	BH 077
NdxApSmRfC	BH 097
Ce	BH 142
ApSmRfC	BH 173
ApSm	BH 175

Results

Resistance pattern and transferability - Of 230 *S. typhimurium* isolates collected from the open sewers Arrudas and Onça, 7.39% were antibiotic-resistant. In contrast, 29 of 30 *S. typhimurium* from patients were resistant 96.6%. Table 1 presents the resistance spectra for the 17 resistant *S. typhimurium* from the two open sewers; those of the 29 resistant isolates from the clinical cases are presented in Table 2.

The results of conjugation and mobilization assays are presented in Table 3. The transference of resistance markers always was partial, any model was not

Table 2 - Patterns of drug resistance among 30 *S. typhimurium* isolated from human patients.

Symbols: * = Percent resistance, per antimicrobial agent, in 30 *S. typhimurium* isolates, obtained from human patients: nalidixic acid, ampicillin, mercury dichloride, chloramphenicol and streptomycin - 93.3; kanamicin - 86.6; gentamicin - 20; tetracycline - 16.6; cephalotin - 13.3 and rifampicin - 0.0.

Resistance pattern*	Number of resistant strains
Hg	1
NdxApSmRfCn	2
NdxApSmGmRfCn	16
NdxApSmGmRfCn	3
NdxApSmGmRfCn	3
NdxApSmGmRfCn	1
NdxApGcCnSmGmRfCn	1
NdxApGcCnSmGmRfCn	1
NdxApGcCnSmGmRfCn	1

Table 3 - *Salmonella* x *E. coli* and *Salmonella* x *Salmonella* resistance transfer by conjugation.

Symbols: -^a = Not transfer occurred; *^b = Not determined, because receptor was either inadequate or transfer had already occurred to one of the receptor strain; **^c = Mobilized by RP₄ plasmid.

Donor strains	Markers	Receptor Strains and Transferred Markers							
		<i>E. coli</i>				<i>S. typhimurium</i>			
		K ₁₂ Nx ^r	K ₁₂ Sm ^r	K ₁₂ SmRf ^r	K ₁₂ SmColIb ^r	BH 063 Nx ^r	BH 161 Sm ^r	BH 172 Rf ^r	
BH 029	Sm	- ^a	* ^b	*	*	-	*	*	
BH 031	Tc	Tc	Tc	*	Tc	-	Tc	*	
BH 055	ApSmTc	ApSm	*	*	*	-	*	*	
BH 070	KmTc	KmTc	Km	*	*	Km	KmTc	*	
BH 076	Tc	*	*	*	Tc	*	Tc	*	
BH 077	CmSmKm	-	*	*	*	-	*	*	
BH 097	NxApSmKm	*	*	Ap	*	*	*		ApSmKm
BH 143	Rf	*	-	*	*	-	-	*	
BH 173	ApCmKmTc	*	-	*	*	*	-	*	
BH 175	ApSm	ApSm	*	*	*	-	*	*	
BH 223	Tc	*	*	*	Tc	*	Tc	*	
ED 010	NxApHgCmSmCmKm	*	*	Ap	*	*	*	-	
ED 015	NxApHgCmSmCmKm	*	*	NxGm** ^c	*	*	*	-	
ED 017	NxApHgCeCmGmKmTc	*	-	-	*	*	-	-	
ED 019	NxApHgCmSmKmTc	*	*	-	*	*	*	-	
ED 020	NxApHgCeCmSmCmKm	*	*	-	*	*	*	-	
ED 026	NxApHgCmSmGmKm	*	*	ApKm; NxGm**	*	*	*	-	
ED 030	NxApCeCmSmGmKm	*	*	Ap	*	*	*		ApSmKm

transferred wholly, in both collections. Many conjugations were not deal because receptor was either inadequate or transfer had occurred to one of the receptor strain.

Colicin production - The percent of colicinogeny in 230 *S. typhimurium* isolates from sewers was 2.17 while in 30 *S. typhimurium* from patients was 6.7. Strains BH 031, BH 076, BH 167, BH 223, BH 227, ED 006 and ED 011 were colicinogenic in the beginning of research. But isolates BH 167 and ED 006 lost their colicinogenic ability during storage. All colicinogenic strains produced colicin Ib, only.

Plasmid DNA isolation - In nineteen strains from patients, seven carried three plasmidial bands, with molecular weights of approximately 60, 25 and 10 Md (average from three independent estimates), five carried plasmids of 60 and 25 Md; one carried plasmidial bands of 60 and 10 Md, and one had plasmids of 25 and 10 Md; two others strains possessed a plasmid of 25 Md and one strain had a single plasmid of 60 Md. Two samples did not carry plasmids, and one of them did not even show any resistance marks.

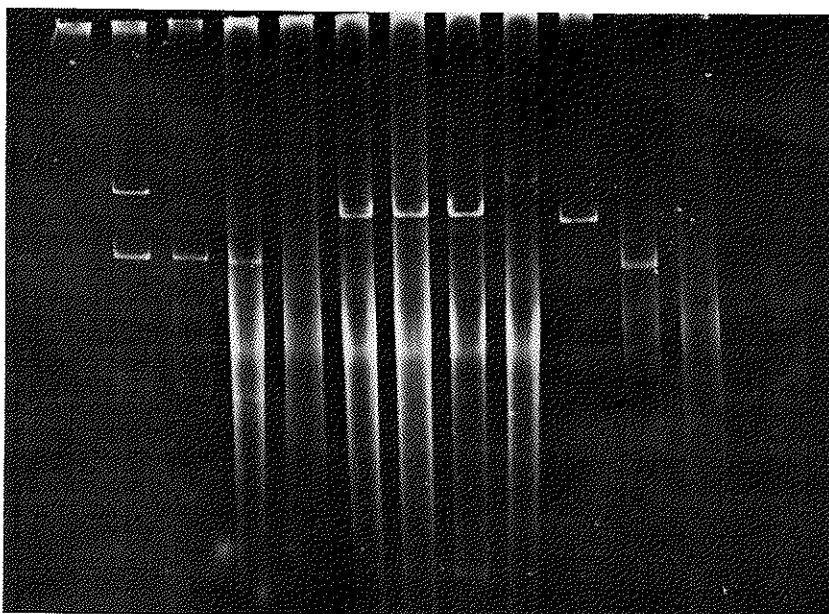
Figure 1 - shows an agarose gel of BH 175 and BH 070, both collected from open sewers, and their respective transconjugants.

Figure 2 - shows an agarose gel strains of *S. typhimurium*, from both collections, two strains from clinical cases (ED 026 and ED 030) with their respective transconjugants, and one from open sewers, BH 163.

Figure 1 - Eletrophoretic profile on agarose gel of plasmidial DNA bands from donor, receptor and transconjugant strains carrying plasmids of determined molecular weight.

Symbols: lane A = *E. coli* K₁₂ Nx^r receptor; lane B = BH 175 donor strain (ApSm), plasmids of 60, 25, 15 and 10 Md; lane C = BH 175 × K₁₂ Nx^r (SmNx) transconjugant, plasmids of 25, 15 and 10 Md; lane D = BH 175 × K₁₂ Nx^r (ApNx) transconjugant, plasmids of 25 and 10 Md; lane E = *E. coli* K₁₂ Sm^r receptor; lane F = BH 070 donor strain (KmTc), plasmid bands of 41 and 38 Md; lane G = BH 070 × K₁₂ Sm^r (KmSm) transconjugant, plasmid of 38 Md. Standard plasmids: lane I = p307 - 54 Md; lane J = RP₄ - 34 Md; lane K = Sa - 23 Md; lane L = pBR 322 - 2.6 (not shown).

A B C D E F G H I J K L



Discussion

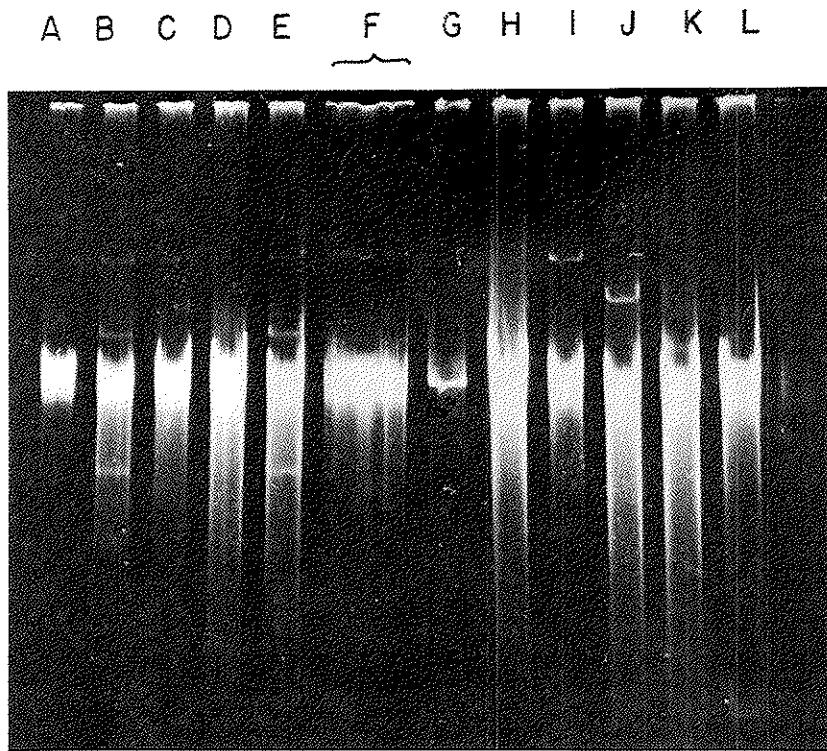
The low incidence of resistance (7.39%) in *S. typhimurium* strains isolated from the open sewers may have been due to the low selective pressure to which these strains are submitted in "natural" environments. Alcaide and Garay (1), in Spain, observed 17.7% resistance to one or more drugs, in *Salmonella* strains isolated from residual waters and from surface waters contaminated with sewage. In Brazil, Câmara & Cardoso (4) detected 13.2% multiresistance to antimicrobial agents in *S. typhimurium* and *S. agona* strains isolated from sewers in the city of Rio de Janeiro. Another cause for the low frequency of resistance may be spontaneous plasmid loss in bacterial cells stored in the laboratory for many years (31).

The high percentage of resistance (96.6%) of isolates obtained from clinical cases, in contrast to the strains originating from natural sources, was probably caused to extreme selective pressure (8).

When resistance marker spectra are considered, once again the two samplings are quite different: for the isolates obtained from "natural" sources the most

Figure 2 - Eletrophoretic on agarose gel of plasmidial DNA bands from donor, receptor and transconjugant strains carrying plasmids of determined molecular weight.

Symbols: lane A = *E. coli* K₁₂ Sm^r Rf^r receptor; lane B = ED 026 donor strains (NxApHgCmSmGmKm), plasmids of 60, 25 and 10 Md; lane C = ED 026 x K₁₂ SmRf (KmRf) transconjugant, plasmids of 60 Md; lane D = BH 172 Rf^r receptor; lane E = ED 030 donor strain (NxApCeCmSmGmKm), plasmids of 60, 25 and 10 Md; lane F = ED 030 x BH 172 Rf^r (KmRf) plasmid of 60 Md; lanes G and H; BH 163 strain (Rf). Standard plasmids; lane I = p307: 54 Md; lane J = RP₄: 34Md; lane K = Sa - 23 Md; lane L = pBR 322: 2.6Md.



resistance model contained five markers and the most frequent antibiotic resistance was to tetracyclines, (Table 1), whereas for the isolates from clinical cases all strains were resistant to at least five markers, with a single exception. The resistance pattern NxApHgCmSmKm was detected in 16 of the 30 isolates (Table 2).

Almost all drugs, whose values varied from 93.3% to 86.6% (Table 2), are frequently used for treatment, especially nalidixic acid and chloramphenicol for enteritis, and ampicillin and streptomycin for different types of infections.

The high resistance value shown by mercury dichloride (93.3%) is coincident with findings by Robinson & Tuovinen (26); indeed, resistance to mercury and to other heavy metals may be recent and concomitant with the increased frequency of resistance to antibiotics. In their review, these investigators report high values for gram-negative bacteria, which were very close to those detected in the present study. Such concomitant resistance may be caused by plasmidial location of these markers.

In conjugation experiments, transfer of resistance was partial, with a maximum of

three markers, even when the donor had a large number of markers (Table 3). Among the many probable causes of this result, we may mention location of the markers on chromosome (Table 1 and Figure 2) or even on non-conjugative plasmid; according to this hypothesis, data has been obtained with mobilization assays using RP4 promiscuous plasmid: in this situation, we had resistance marker transferred (Table 3). Other possibility should be considered: many plasmids will only transfer about 28°C (24).

To colicinogeny, there was a low frequency of secreting *S. typhimurium* isolated: 2.17% for those collected from the open sewers, 6.7% for those obtained from patients. In this study, all colicinogenic strains produced colicin Ib. This data are similar to those found by Vinhas & Almeida (30), in Rio de Janeiro, as well as cotransferance from Col+ character with drug resistance mark.

In the analysis of strains from patients, a pattern of three plasmid bands, with molecular weights around 60, 25 and 10 Md was observed. This profile similarity was not observed in strains collected in open sewers. Even though strain BH 175 had a similar profile to that of strains from clinical cases, the other sixteen strains collected from open sewers, which showed some sort of resistance did not indicate a repetition of this pattern.

The similar pattern of plasmidial bands repeated in samples obtained from human patients confirms data observed in other research works, such as Anderson (2).

These initial molecular data allows the possibility for epidemiological studies aimed at determining possible phylogenetic relationship among the different plasmids considered (14, 23).

In previous research (27), it is interesting to point out that four of the five isolates obtained from natural sources were simultaneously colicinogenic and resistant to tetracycline. Both markers were transferred simultaneously, by means of conjugation, by the same plasmid, of 82 Md.

It is known that in Brazil, *S. typhimurium* is predominant in outbreaks that occur inside and outside hospitals (10, 21, 22), thus becoming an important Public Health and hospital infection problem (15). It is important to point out that the bacteria causing these outbreaks present multiple-resistance, similar to those studied by Magalhães & Véras (16), Pessôa & Col. (20, 21) and Toledo & Col. (28). In these papers, the authors report having observed high frequency of a lactose-fermenting *Salmonella typhimurium* variant, formerly described by Pessôa (20), a characteristic which makes clinical laboratory classification rather difficult. In addition, Ferreira & Col. (9) observed a significant percentage of *S. typhimurium* (14.1) in healthy carriers which make and serve food in restaurants in Belo Horizonte.

Since a few genetic data about *Salmonella typhimurium* are available, even though it is predominant in major areas of the country, (10, 13, 20, 21 and 22) new information may be useful as a contribution to researchers in this field.

Acknowledgments

We thank Andrea Reis, our laboratory technician, for the excellent technical assistance.

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil (CNPq/PIG).

References

1. Alcaide, E. & Garay, E.R. - Plasmid transfer in *Salmonella* spp. isolated from waste water and sewage-contaminated surface water. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 48:435-438, 1984.
2. Anderson, D.M. - Plasmid studies of *Salmonella typhimurium* phage type 179 resistant to ampicillin, tetracycline, sulphonamides and trimethoprim. *J. Hyg., London*, 85:239-300, 1980.
3. Anderson, E.S. - The ecology of transferable drug resistance in the enterobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 22:131-180, 1968.

4. Câmara, F.P. & Cardoso, M.A. - Epidemiologia da resistência plasmidial a drogas em salmonellas isoladas em esgotos da cidade do Rio de Janeiro. Rev. Microbiol., São Paulo, 12:14-16, 1981.
5. Costa, S.O.P. - Produção de colicinas em *Escherichia coli* e ação da enzima proteolítica bacteriana sobre colicina. In: Azevedo, J.L. & Costa, S.O.P., org. Exercícios Práticos de Genética, São Paulo, Nacional, 288p., 1973.
6. Datta, N. & Nugent, M.E. - Characterization of plasmid in wild strains of bacteria, 38-50p. In: Puhler, A. & Timmis, K.N. (ed.), 1978. Advanced molecular genetics. Berlin, Springer-Verlag, 1984.
7. Edwards, P.R. & Ewing, W.H. - Identification of Enterobacteriaceae, 3rd. ed. Minnesota, Minneapolis, Burgess Publishing Company, 1972.
8. Falbo, V.; Caprioli, A.; Mondello, F.; Cacace, M.M.; Luiz, S. & Greco, D. - Antimicrobial resistance among *Salmonella* isolates from hospital in Rome. J. Hyg., London, 88:275-284, 1982.
9. Ferreira, M.D.; Pinto, V.L.L.T. & Hofer, E. - Manipuladores de alimentos em restaurantes de Belo Horizonte, portadores de *Salmonella*. Rev. Microbiol., São Paulo, 15:54-59, 1984.
10. Hofer, E. - Considerações sobre a frequência de sorotipos de *Salmonella* na cidade do Rio de Janeiro. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 72:63-72, 1974.
11. Jegathesan, M. - *Salmonella* serotypes isolated from man in Malaysia over the 10 - year period 1973-1982. J. Hyg., London, 92:395-399, 1984.
12. Konisky, J. - The bacteriocins, 71-136p. In: Ornston, L.N. & Sokatch, J.R. (ed.) The bacteria. A treatise on structure and function, vol. 6. New York, Academic Press Inc., 1978.
13. Leal, N.C.; de Sá, A.T.; Solari, C.A.; da Silva, S.J. & Hofer, E. - Sorotipos de *Salmonella* isolados de processos entéricos humanos em Recife - Pernambuco, durante o triênio 1978-1980. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 82:43-49, 1987.
14. Lee, S.D.; Gerdin, D.N. & Cleary, P.P. - Plasmid macroevolution in a nosocomial environment: Demonstration of a persistent polymorphism and construction of a cladistic phylogeny on the basis of restriction data. Mol. & Gen. Genet., 194:173-178, 1984.
15. Levi, G.C. - Infecção pela *Salmonella typhimurium*: importante problema de saúde pública e infecção hospitalar em nosso meio. Pediatr. Prat. LI (I, II, III):13-16, 1980.
16. Magalhães, M. & Véras, A. - Plasmídios R de cepas hospitalares de *Salmonella typhimurium*. Rev. Microbiol., São Paulo, 10:43-45, 1979.
17. Meyers, J.A.; Sanchez, D.; Elwell, L.P. & Falcon, S. - Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol., 127:1529-1537, 1976.
18. Montelli, A.C. & Trabulsi, L.R. - Diarréias causadas por *Shigella*, *Salmonella* e *E. coli* enteropatogênicas no município de Botucatu, São Paulo. Rev. Bras. Patol. Clin., 6:45-49, 1970.
19. Peluffo, C.A.; Irino, K. & Mello, S. - Virulencia y multi-resistência a drogas de cepas epidémicas de *S. typhimurium* aisladas en hospitales infantiles de Sudamerica. Mem. Inst. Butantan, São Paulo, 38:1-12, 1974.
20. Pessôa, G.V.A. - Sobre a ocorrência de uma variante de *Salmonella typhimurium* fermentadora de lactose. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 33:13-28, 1973.
21. Pessôa, G.V.A.; Irino, K.; Calzada, C.T.; Mieller, C.E. & Kano, E. - Ocorrência de bactérias enteropatogênicas em São Paulo no septênio 1970-76. I - sorotipos de *Salmonella* isolados e identificados. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 38:87-105, 1978.
22. Pessôa, G.V.A.; Irino, K.; Calzada, C.T.; Mieller, C.E. & Kano, E. - Ocorrência de bactérias enteropatogênicas em São Paulo no septênio 1970-76. II - O surto epidêmico de *Salmonella typhimurium* em São Paulo. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 38:107-127, 1978.
23. Platt, D.J.; Brown, D.J. & Munro, D.S. - The distribution of plasmids among a representative collection of Scottish strains of salmonellae. J. Hyg., London, 97:199-204, 1986.
24. Pohl, P.; Lintermans, P.; Corbion, B.; Gledel, J.; Le Minor, L.; Chasseur, M.L. & Ghysels, G. - Plasmides du groupe d'incompatibilité H chez des souches de

- Salmonella* multi-résistente. Ann. Microbiol., Paris, 132:399-404, 1981.
25. Riley, L.W.; Ceballos, B.S.O.; Trabulsi, L.R.; de Toledo, M.R. & Blake, P.A. - The significance of hospitals as reservoirs for endemic multi-resistant *Salmonella typhimurium* causing infection in urban brazilian children. J. Infect. Dis., 150:236-241, 1984.
26. Robinson, J. & Tuovinen, O. - Mechanism of microbial resistance and deactivation of mercury and organomercury compounds: physiological, biochemical and genetic analysis. Microbiol. Rev., 48:95-124, 1984.
27. Sant'Ana, Y.S. & Chartone-Souza, E. - Plasmids that simultaneously carry markers for colicinogeny and resistance to tetracycline in *Salmonella typhimurium*. Rev. Brasil. Genet. VIII, 2:231-239, 1985.
28. Toledo, M.R.F.; Reis, M.H.L.; Murahovschi, J.; Cury, R.; Ramos, S.R.T.S.; Fiore, E.S.; Schussel, E.Y. & Trabulsi, L.R. - Ocorrência de uma variante de *Salmonella typhimurium* que fermenta a lactose tardivamente. Rev. Microbiol., São Paulo, 10:103-105, 1979.
29. Vicente, A.C.P. & De Almeida, D.F. - Identification of multiple-resistance (R) and colicinogeny (Col) plasmids in an epidemic *Salmonella agona* serotype in Rio de Janeiro. J. Hyg., London, 93:79-84, 1984.
30. Vinhas, S.A. & De Almeida, D.F. - Plasmid-mediated resistance among *Salmonellae* in Rio de Janeiro, Brazil. An. Acad. Bras. Ciênc., 56:319-322, 1984.
31. Watanabe, T. - Infections drug resistance in bacteria. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 56:43-98, 1971.
32. Watanabe, T. & Fukasawa, T. - Episome-mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae. I. Transfer of resistance factors by conjugation. J. Bacteriol., 81:669-678, 1961.

PRODUÇÃO DE ENTEROTOXINA POR *MORAXELLA BOVIS*

Frutuoso Luis de Araujo

Faculdade de Medicina Veterinária
Universidade Federal de Pelotas
R.G.S.

Recebido para publicação em 24/08/88

Marly Paiva Nunes
& Ilvan Delgado Ricciardi

Laboratório de Zoonoses
Instituto de Microbiologia
Caixa Postal 68040
21944 Rio de Janeiro RJ

Resumo

Sete amostras de *Moraxella bovis* foram investigadas quanto à produção de exotoxina. Os resultados observados em quatro delas (57,14%) mostram que *M. bovis* é capaz de induzir no modelo do camundongo recém-nascido um efeito semelhante ao observado para a toxina termoestável secretada por *Escherichia coli*.

Summary

Production of enterotoxin by Moraxella bovis

Seven strains of *Moraxella bovis* were assayed for the production of enterotoxin. The results observed in four of them (57,14%) show that *M. bovis* is able to induce in the suckling mouse model an effect similar to that observed for the toxin secreted by *Escherichia coli*.

Introdução

Moraxella bovis, uma bactéria gram-negativa pertencente à família Neisseriaceae é responsável pela ceratoconjuntivite infecciosa bovina (CIB), enfermidade severa que se manifesta rapidamente, caracterizando-se pela inflamação da córnea e da conjuntiva. Dependendo da gravidade, a infecção pode levar o animal à cegueira uni ou bilateral (1). As perdas econômicas resultantes são substanciais em nosso país, sobretudo no Rio Grande do Sul, apesar de não haver informes oficiais de sua extensão. Nos Estados Unidos, contudo, esta moléstia está bem dimensionada e é responsável por um prejuízo anual superior a 150 milhões de dólares (9). *M. bovis* está bem caracterizada como o agente etiológico envolvido nos episódios de CIB e, muitos de seus efeitos patológicos na infecção a nível ocular já foram descritos (1,3). Entretanto, os mecanismos de patogenicidade do microrganismo que poderiam explicar tais consequências, não estão bem documentados. Na verdade, existem poucos trabalhos relatando a produção de enzimas e/ou toxinas por *M. bovis* (4, 6, 7). Igualmente, não existem evidências quanto a seu poder invasor. A presente comunicação detalha os resultados obtidos nos ensaios conduzidos para detectar a possível produção de toxina por amostras de *M. bovis*, usando como modelo experimental o trato digestivo de camundongos recém-nascidos e, em paralelo, o seu potencial invasor.

Material e Métodos

Sete amostras de *M. bovis* isoladas de casos de CIB foram ensaiadas, em conjunto com uma amostra de *Escherichia coli* produtora de toxina termo-estável (ST). Para o teste de produção de toxina foi adotado o procedimento padrão do camundongo recém-nascido, modificado por Nunes & Ricciardi (5), sendo a única variante, a temperatura de incubação, realizada a 37°C. Os valores observados na relação de peso-intestino/carcaça, quando iguais ou superiores a 0,080, foram considerados positivos. Para o teste de invasibilidade foi adotada a técnica de Sèreny (8). O crescimento de cada amostra foi obtido em placas contendo Agar Infuso de Cérebro e Coração adicionado de 7% de sangue desfibrinado de carneiro e incubadas a 37° por 24 horas. A massa celular resultante foi homogeneizada em 1ml de solução salina estéril e, desta suspensão instilou-se 50µl (10⁸UFC/ml) no olho esquerdo de cada coelho, reservando-se o direito para controle. Após a instilação, massageou-se o olho movimentando as pálpebras para distribuição do inóculo. Os animais foram observados por 12 dias para verificação de aparecimento de lesões características.

Resultados

A Tabela 1 lista as amostras de *M. bovis* testadas pelo método do camundongo recém-nascido. Os valores assinalados para a relação entre o peso do intestino/peso da carcaça correspondem à média de, pelo menos, cinco testes. As sete amostras examinadas apresentaram médias superiores quando o teste foi feito após quatro horas de incubação. Entre elas, quatro amostras (57,14%) apresentaram resultados considerados positivos, à semelhança do ocorrido com a amostra de *E. coli* (controle positivo). O controle negativo (meio de cultura não inoculado), funcionou como tal. A pesquisa do potencial invasor realizado em coelhos albinos mostrou que nenhuma das amostras foi capaz de colonizar a conjuntiva ou a córnea dos animais, sendo portanto consideradas desprovidas de capacidade invasiva.

Discussão

O estudo dos atributos de patogenicidade de *M. bovis* é uma linha de investigação que vem sendo realizada há algum tempo no laboratório dos autores. No curso desses trabalhos, foi verificado que a inoculação de células viáveis em peritônio de camundongo, invariavelmente provocava a morte dos animais num período de 6 a 24 horas. No entanto, quando as células eram lavadas e separado o sobrenadante, a mesma concentração celular matava apenas 50% dos animais. Por outro lado, o sobrenadante isoladamente, não matava os camundongos mas provocava notórios distúrbios intestinais com alteração na consistência das fezes. Este fato certamente sugeria a presença de exotoxina no sobrenadante de culturas jovens de *M. bovis*. Esta hipótese foi confirmada com os resultados da presente investigação que são bastante sugestivos quanto à capacidade deste microrganismo produzir uma exotoxina de ação intestinal semelhante à produzida por algumas enterobactérias,

Tabela 1 - Valores médios observados na relação peso do intestino/peso da carcaça no teste do camundongo recém-nascido, lido com duas e quatro horas de incubação, realizado com amostras de *Moraxella bovis*, *Escherichia coli* e meio de cultura não inoculado.

Símbolos: * = Cada valor representa a média de pelo menos cinco testes; valores iguais ou superiores a 0,080 são considerados positivos.

Amostra	Valores * da relação peso intestino/carcaça (Tempo de incubação)	
	2 horas	4 horas
U ₁₃ P ₂₂	0,065	0,073
U ₁₁ P ₈	0,068	0,074
2358 P ₂₂	0,071	0,081
JUR ₁ P ₅	0,072	0,078
JUR ₂ P ₅	0,082	0,085
U ₃ P ₃₄	0,082	0,085
U ₃ P ₅	0,084	0,088
<i>E. coli</i>	0,120	0,140
Meio	0,063	0,070

notadamente *E. coli* e *Yersinia enterocolitica*. Diferentemente desta última (5), a ação parece ser mais lenta e detectável com melhor nitidez quando o teste do camundongo recém-nascido é lido com quatro horas de incubação.

A capacidade de *M. bovis* produzir enterotoxina vem se somar a outras toxinas recentemente descritas por Franco (2) como collagenase, desoxiribonuclease e dermonecrotoxina.

Se a atuação desta enterotoxina ocorre em outras membranas mucosas além da intestinal, é assunto que merece investigações complementares. Este e outros aspectos como sua natureza química e mecanismo de ação estão presentemente sob consideração.

Agradecimentos

Trabalho realizado com auxílio financeiro do CNPq, FINEP e CPEG da UFRJ.

Referências Bibliográficas

1. Bantista, P.J.H.P. - Infectious bovine keratoconjunctivitis: a review. Brit. Vet. J., 135:225-242, 1979.
2. Franco, M.A. - Contribuição ao estudo de exotoxinas de *Moraxella bovis* - Tese, Fac. Vet., Univ. Fed. Pelotas, 1987.
3. Fraser, J. & Gilmour, N.J.L. - The identification of *Moraxella bovis* and *Neisseria ovis* from the eyes of cattle and sheep. Res. Vet. Sci., 27:127-128, 1979.
4. Henson, J.B. & Grumbles, L.C. - Infectious bovine keratoconjunctivitis. III - Demonstration of toxins in *Moraxella (Haemophilus) bovis* cultures. Cornell Vet., 51:267-284, 1961.
5. Nunes, M.P. & Ricciardi, I.D. - Detection of *Yersinia enterocolitica* heat-stable enterotoxin by suckling mouse bioassay. J. Clin. Microbiol., 13:783-786, 1981.
6. Pugh, G.W. Jr., Hughes, D.E. & Schulz, V.D. - The pathophysiological effects of *Moraxella bovis* toxins on cattle, mice and guinea pigs. Can. J. Comp. Med., 37:70-78, 1973.
7. Sandhu, T.S. & White, F.H. - Production and characterization of *Moraxella bovis* hemolysin. Amer. J. Vet. Res., 38:883-885, 1977.
8. Serény, B. - Experimental *Shigella* keratoconjunctivitis: a preliminary report. Acta Microbiol. Hung., 2:293-296, 1955.
9. Trout, H.F. & Schurig, G. - Pinkeye. Anim. Nutr. & Hlth, 2:38-41, 1985.

INFLUÊNCIA DO INÓCULO BACTERIANO NO TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AS QUINOLONAS PELO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM ÁGAR

Airton Guimarães Peres
 Marlei Gomes da Silva
 Maria Tereza S. da Silva David
 & Paulo Pinto Gontijo Filho

Recebido para publicação em 15/09/88

Universidade Federal do Rio de Janeiro
 Ilha do Fundão - CCS Bloco I
 21941 Rio de Janeiro RJ

Resumo

A influência do inóculo na atividade de suas quinolonas (Lomefloxacin e Pefloxacina) contra *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* e *S. faecalis* foi investigada pela técnica de diluição em ágar. A ação deste grupo de antimicrobianos foi reduzida quanto da utilização de um inóculo muito rico (10^5 e 10^6 ufc), principalmente em relação aos gram negativos.

Summary

Effect of the inoculum on the activity of quinolones using the agar dilution procedure

The influence of the inoculum in the activity of two quinolones against *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* and *S. faecalis* was determined by the agar dilution method. The action of quinolones was reduced by a large inocula (10^5 and 10^6 ufc) mainly to the gram-negative bacteria.

Introdução

As quinolonas são grupo de agentes antimicrobianos bioquimicamente relacionados com o ácido nalidíxico. Elas têm um espectro de ação antimicrobiano amplo, que inclui *Pseudomonas aeruginosa*, outras bactérias gram negativas multiresistentes e *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina (5).

O método de diluição do antibiótico em agar ou em caldo é o indicado para determinar a concentração mínima necessária para inibir um microrganismo (MIC) (6). O objetivo deste trabalho foi avaliar a importância do inóculo na determinação de MICs de quinolonas.

Material e Métodos

Como microrganismos testes, foram utilizados amostras de *S. aureus* ATCC-29.213, *E. coli* ATCC-25.922, *S. faecalis* ATCC-29.212 e *P. aeruginosa* ATCC-27.853. Foram testadas as seguintes quinolonas: Lomefloxacin (Searle) e Pefloxacina (Rodhia) na concentrações de 0,016, 0,06, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 8,0 e 16,0mcg/ml. Adicionalmente, foi também testada a amikacina (Laborterapica Bristol) nas concentrações de 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 8,0, 16,0, 32,0, 64,0, 128,0 e 256,0mcg/ml.

O teste de susceptibilidade foi efetuado em agar Mueller Hinton (BBL), utilizando-se o replicador de Steers. Os microrganismos foram inoculados em tubos contendo 3ml de caldo tripticase soja e cultivados "overnight" a 37°C (inóculo A). A suspensão resultante foi diluída a 1:10 (inóculo B) e 1:100 em água destilada.

estéril (inóculo C). Estas suspensões no volume carreado pelos pinos do replicador corresponderam, definido através de contagem viáveis de 10^6 , 10^5 e 10^4 /0,002ml, respectivamente.

As placas inoculadas foram mantidas em repouso até a absorção das gotas e então incubadas a 37°C por 24 horas.

O MIC foi interpretado como a concentração do agente antimicrobiano em que houve inibição completa (inóculo A e B) ou o número de colônias foi inferior a 5 (inóculo C). Placa de agar Mueller-Hinton sem os antimicrobianos foi inoculada como controle.

Tabela 1 - Influência do inóculo na atividade antibacteriana "in vitro" de Lomefloxacina e Perfloxacina através do método de diluição em ágar.

Símbolos: * = Concentração em mcg/ml.

Agente antimicrobiano	Inóculo	Concentração mínima inhibitória			
		<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. faecalis</i> ATCC 28212
Lomefloxacina	A(10^6)	4,0*	8,0	1,0	16,0
	B(10^5)	0,5	8,0	0,5	16,0
	C(10^4)	0,5	4,0	0,5	4,0
Perfloxacina	A(10^6)	4,0	16,0	1,0	8,0
	B(10^5)	1,0	16,0	1,0	2,0
	C(10^4)	0,5	4,0	0,5	2,0
Amikacina	A(10^6)	2,0	4,0	4,0	256,0
	B(10^5)	2,0	4,0	1,0	256,0
	C(10^4)	2,0	2,0	1,0	32,0

Resultados

Os resultados obtidos estão na Tabela 1, onde verifica-se que de uma maneira geral os MICs foram mais baixos com as concentrações mais baixas, particularmente em relação as quinolonas e os Gram negativos; tanto a Lomefloxacina, como a Perfloxacina mostraram valores mais baixos para *E. coli* e *P. aeruginosa* quando o inóculo foi de 10^4 ufc. A amikacina utilizada como controle também mostrou ser afetada pela riqueza do inóculo, para os dois microrganismos Gram positivos.

Discussão

No antibiograma clássico, pela técnica de difusão em gel, o inóculo é a variável mais importante, podendo levar a resultados falso negativos ou falsos positivos, quando respectivamente muito pobre ou muito rico (1). Na técnica de diluição em agar esta influência é considerada menor, assim como a interpretação é mais simples (2).

Entretanto, já foram apontadas evidências que o pH ácido, a concentração de íons divalentes como Mg^{++} , bem como um inóculo muito rico pode afetar a atividade das quinolonas (3, 4). Os resultados obtidos confirmam esta última observação em relação as duas quinolonas analisadas, particularmente para *E. coli* e *P. aeruginosa* para as quais de uma forma geral os MICs foram mais baixos. Concluiendo-se a concentração das suspensões também interfere na técnica de diluição em agar, sobretudo no tocante as quinolonas.

Referências Bibliográficas

1. Beny, A.L. & Thomsberry, C. - Susceptibility testing: diffusion test procedures. 463-494p. In: Manual of Clinical Microbiology. 3rd. ed. Lennette, EH (ed.). Washington, DC. American Society for Microbiology, 1987.
2. Bergan, T. - Quinolones. 164-178p. In: The antimicrobial Agents Annual 1. Peterson, PK e Verhoef, J (eds). Amsterdan Elsevier Science PUB, 1986.
3. Chin, N.X.; Brittain, D.C. & Neu, H.C. - In Vitro activity of Ro 23-6340, a new fluorinated 4-Quinolone. Antimicrob Agents Chemoth., 29:675-680, 1986.
4. Garrod, L.P.; Lambett, H.P. & O'Grady, F. - Antibiotic and chemotherapy. 5th ed. London. Churchill Livingstone, 1981.
5. Walker, C.R. & Wright, A.J. - The Quinolones. Mayo Chin. Proc. 62:1007-1012, 1987.
6. Washington II, J.A. - Susceptibility test: agar dilution. 967-971p. In: Manual of Clinical Microbiology. 3rd. ed. Lennette, E.M. (ed.) Washington, DC. American Society for Microbiology, 1987.

AUSÊNCIA DE RESPOSTA IMUNOLÓGICA HUMORAL EM SUÍNOS QUE RECEBERAM ÁGUA DE BEBER CONTAMINADA COM LEPTOSPIRA BIFLEXA ESTIRPE BUENOS AIRES

Silvio Arruda Vasconcellos

Ioshihiro Ohtsubo

Anibal Sant'Anna Moretti

Fumio Honma Ito

Estevão de Camargo Passos

José de Angelis Côrtes

Recebido para publicação em 26/09/88

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP

Av. Corifeu de Azevedo Marques, 2720

05340 São Paulo SP

& Paulo Hideki Yasuda

Instituto de Ciências Biomédicas II

Av. Prof. Lineu Prestes, 1374

05508 São Paulo SP

Resumo

Dez suínos mestiços, recém-desmamados, classificados como não reatores frente a 21 variantes sorológicas de *L. interrogans* e três de *L. biflexa*, receberam durante três dias, como única fonte de água de bebida, uma suspensão aquosa a 0,5% v/v de *L. biflexa* estirpe Buenos Aires. Na ocasião da utilização as culturas apresentavam sete dias de cultivo em meio de EMJH enriquecido com soro estéril de coelho. O pH da água foi mantido na faixa de 7,2 a 7,4 com o tampão fosfato de Sorenson. A água contaminada foi oferecida aos animais de forma não corrente em um coxo de alvenaria com formato interno côncavo, localizado na parte coberta da baía. Este coxo foi abastecido duas vezes ao dia durante os três primeiros dias da investigação. Durante todo o período experimental os animais foram arraçoados com rações comerciais contendo antimicrobianos empregados como promotores de crescimento em suinocultura intensiva. Os animais foram submetidos à 23 colheitas de sangue, realizadas a intervalos de tempo variáveis durante os 93 dias em que foi conduzida a observação. Os resultados obtidos, nas condições do presente estudo demonstraram que a contaminação ambiental com a *L. biflexa* estirpe Buenos Aires não foi capaz de modificar o perfil sorológico dos animais quando comparado ao grupo testemunho não infectado ($0,30 < p < 0,50$). Ao término da investigação todos os animais foram negativos frente às técnicas empregadas para determinar a presença de leptospires em amostras de tecido renal.

*Trabalho conduzido com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

Summary

Absence of humoral immunological response in swines whose drinking water was contaminated with Leptospira biflexa strain, Buenos Aires

Ten cross breed weaning swines serologically non reactives to 21 serovars of *L. interrogans* and three serovars of *L. biflexa* received during three days as the only source of drinking water, the product composed of a 0.5% v/v of a water suspension of *L. biflexa* strain Buenos Aires. The cultures of microorganisms were prepared in the EMJH medium, and were used with seven days of age. The water was buffered to the pH 7.2-7.4 with the Sorensen phosphate buffer. The watering place was protected against direct exposition to sun rays. Freshly contaminated water was offered two times a day during three days. During the whole experimental period the animals received commercial ration with the growth promoters normally used in the modern pig production. The blood collections were performed at different times during the 93rd experimental days. The serological results showed no differences with the control group ($0.30 < p < 0.50$). At the end of the investigation all of the animals presented negative results by the technique used for isolation of leptospires from samples of kidney tissue.

Introdução

A reação de soro-aglutinação microscópica (SAM) é o método laboratorial mais frequentemente empregado para diagnosticar a leptospirose humana e animal (8, 15). Esta técnica apresenta, no entanto, o inconveniente de utilizar um número elevado de抗ígenos para a triagem inicial de um mesmo soro (15, 16).

O conhecimento de que uma estirpe de *Leptospira biflexa* do sorogrupo Semaranga, denominada Patoc I apresentava grande porcentagem de reações cruzadas com soros humanos positivos para sorotipos de leptospires patogênicas, permitiu o emprego desta estirpe como antígeno único em diferentes reações sorológicas como a SAM, a fixação de complemento, a imunofluorescência indireta, a hemaglutinação indireta e a lise de eritrócitos sensibilizados (1). Embora tais métodos tenham se mostrado bastante eficazes para diagnóstico da leptospirose humana, particularmente na fase inicial da infecção, quando positivam mesmo antes da reação de aglutinação microscópica padrão, o mesmo não ocorreu para soros de animais, que apresentaram um grande número de resultados falso-negativos (12, 15).

Resultados promissores com soros de animais foram relatados por Cacchione (2) & Cols. (1971) e Santa Rosa (12) (1978), que empregaram, respectivamente, as amostras saprófitas Rufino e Buenos Aires para o diagnóstico da leptospirose pela aglutinação microscópica. Cacchione (3) & Cols. (1972) referiram inclusive o uso da estirpe Rufino como antígeno para uma reação de aglutinação macroscópica em placa para o diagnóstico da leptospirose em soros de animais e Yanaguata (17) (1987) descreveu o mesmo procedimento com a *L. biflexa* estirpe Buenos Aires.

Dentre as limitações aventadas para os testes sorológicos que utilizam amostras de *L. biflexa* como antígeno, tem sido considerada a possibilidade da ocorrência de resultados falso-positivos. De fato, estando tais amostras naturalmente distribuídas nas águas de superfície do ambiente (10) esta condição poderia determinar a sensibilização imunológica dos animais que vivessem em tais locais. Saliente-se também as citações disponíveis de isolamentos, em condições naturais de *L. biflexa* tanto de animais (6, 10, 18), quanto de seres humanos (7); no entanto, esta temática é discutível pois Schonberg (13) (1979), após extensa investigação entre suínos de diversas regiões da Alemanha, concluiu ser muito remota a

possibilidade de que os animais pudessem ser naturalmente sensibilizados por estírpes de leptospires aquáticas.

Tendo em vista as perspectivas levantadas quando ao emprego da *L. biflexa* estírpe Buenos Aires na reação de SAM aplicada ao diagnóstico da leptospirose suína (4, 12) e inclusive a sua provável utilização em prova de aglutinação macroscópica (17), foi delineado o presente trabalho que teve por objetivo verificar se suínos, criados nos moldes usuais de suinocultura intensiva, que ingerissem água de bebida contaminada com *L. biflexa* estírpe Buenos Aires, apresentariam resultados sorológicos positivos frente a este antígeno e também para *L. interrogans* sorotipo pomona.

Material e Métodos

Os meios de cultura, o diluente e os métodos adotados para a condução e interpretação da reação de SAM e da técnica das diluições seriadas para o isolamento, de leptospires, já foram relatados em trabalho anterior (16).

Os animais utilizados foram suínos mestiços Landrace/Large White ou Duroc Jersey/Large White, dos quais 9 fêmeas e 10 machos com peso vivo médio de 16,0 quilogramas e 64 a 74 dias de idade. Por ocasião do início do experimento, todos os animais foram não reagentes na prova de SAM frente a uma coleção de antígenos composta de 21 estírpes de *L. interrogans* e três de *L. biflexa*, cuja especificação, já foi referida em publicação anterior (16).

O inóculo de *L. biflexa* foi preparado como segue: 100 mililitros de uma cultura da estírpe Buenos Aires, com sete dias de crescimento em meio de EMJH revelando a presença de leptospires ativas e ausência de contaminantes, foram adicionados a 20 litros de água cujo pH foi acertado na faixa de 7,2 a 7,4 com o tampão fosfatado de Sorenson (8).

Esta água contaminada com a *L. biflexa* estírpe Buenos Aires foi oferecida aos animais do respectivo grupo experimental, de forma não corrente em um coxo de alvenaria com formato interno côncavo, localizado na parte coberta da baía. Este coxo foi abastecido duas vezes ao dia durante os três primeiros dias da investigação.

Os 19 suínos livres de aglutininas para as 24 estírpes de leptospires, já relatadas, foram aleatoriamente divididos em dois grupos, com 9 e 10 indivíduos designados, respectivamente, pelas letras "A" e "B".

Os animais do grupo "B" nos três primeiros dias da investigação tiveram como única fonte de água de bebida o produto experimentalmente contaminado com a *L. biflexa* estírpe Buenos Aires, conforme a descrição anterior. Os animais do grupo "A" permaneceram como grupo testemunho.

Cada grupo experimental teve sua baía específica porém ambas foram atendidas pelos mesmos tratadores. O controle de uma possível contaminação cruzada entre os grupos experimentais foi estabelecido através da instalação de um pedilúvio na entrada das baías que foi diariamente abastecido com uma solução de iodofórmio* 1:250 volume/volume e pelo estabelecimento de uma ordem de atividades obedecendo sempre a sequência "A" para "B". (Biocid Pfizer S.A.)

As rações utilizadas durante o experimento foram produtos comerciais contendo os promotores de crescimento usualmente utilizados para as fases de crescimento e engorda*. (Socil Pró-Pecuária S.A. e Cargill Agrícola S.A.)

As colheitas de sangue foram executadas por punção da veia cava cranial (5) segundo a seguinte programação: em dias alternados entre o 1º e o 15º dia experimental; a cada três dias entre o 15º e o 39º dia da investigação e semanalmente no período compreendido entre o 39º e o 93º dia do início do experimento. Cada amostra foi dessorada a sombra e o soro obtido foi armazenado a 20°C negativos até o momento do exame.

Aos 93 dias da experimentação todos os animais foram sacrificados, sendo então colhidos os rins que foram submetidos à técnica das diluições seriadas para o isolamento de leptospires (8).

O tratamento estatístico dos resultados obtidos foi realizado segundo o teste de Qui-quadrado (14). O nível de significância foi de 0,05.

Resultados

Na Tabela 1 são apresentados os resultados das provas de SAM para a leptospirose segundo o grupo experimental, o tipo de antígeno utilizado e o momento após a infecção experimental em que foi executada a colheita de sangue.

A observação desta Tabela demonstra que na diluição de triagem dos soros de 1:100 os animais dos grupos "A" e "B" não apresentaram nenhuma reação positiva frente ao antígeno de *L. interrogans* sorotipo pomona durante os 93 dias da investigação. Quando são observados os resultados obtidos frente ao antígeno de *L. biflexa* estirpe Buenos Aires, são constatados os valores globais 3,38 e 4,78% de resultados positivos respectivamente, para os grupos "A" e "B" os quais revelaram-se idênticos segundo o teste de Qui-Quadrado, com valor de probabilidade de que a diferença observada fosse decorrente do acaso, situando-se entre 30 e 50%.

A distribuição dos resultados positivos para o antígeno de *L. biflexa* nos dois grupos de animais trabalhados não apresentou tendência de concentração em nenhuma fase específica dentro dos 93 dias da experimentação.

Aos 93 dias do início do experimento todos os animais foram sacrificados e as tentativas de isolamento de leptospiras em meio de cultura a partir de amostras de tecido renal foram sempre negativas.

Tabela 1 - Resultados da prova de soro-aglutinação microscópica para leptospirose, empregando os antígenos *L. interrogans* sorotipo pomona e *L. biflexa* estirpe Buenos Aires segundo o grupo experimental e o dia pós-infecção (p.i.) em que foi realizada a colheita de sangue.

Símbolos: (a) = "A" grupo de suínos testemunho não infectado; "B" grupo de suínos cuja água de bebida foi experimentalmente contaminada com *L. biflexa* estirpe Buenos Aires; (b) = I antígeno de *L. interrogans* sorotipo pomona; II antígeno de *L. biflexa* estirpe Buenos Aires; (c) = Número resultados positivos/números de soros examinados.

Grupo Experimental (a)	Antígeno (b)	A		B	
		I	II	I	II
Dia p.i. Colheita sangue					
39		0/9 (c)	0/9	0/10	0/10
59		0/9	0/9	0/10	0/10
79		0/9	0/9	0/10	2/10
99		0/9	0/9	0/10	1/10
119		0/9	0/9	0/10	0/10
139		0/9	0/9	0/10	0/10
159		0/9	0/9	0/10	1/10
189		0/9	0/9	0/10	1/10
219		0/9	1/9	0/10	0/10
249		0/9	1/9	0/10	1/10
279		0/9	0/9	0/10	0/10
309		0/9	0/9	0/10	0/10
339		0/9	0/9	0/10	0/10
369		0/9	1/9	0/10	4/10
399		0/9	2/9	0/10	0/10
449		0/9	0/9	0/10	1/10
519		0/9	1/9	0/10	0/10
589		0/9	0/9	0/10	0/10
659		0/9	0/9	0/10	0/10
729		0/9	0/9	0/10	0/10
799		0/9	1/9	0/10	0/10
869		0/9	0/9	0/10	0/10
939		0/9	0/9	0/10	0/10
TOTALS		0/270 (0,00%)	1/207 (3,38%)	0/230 (0,00%)	11/230 (4,78%)

Discussão

A ausência de reações positivas para o antígeno de *L. interrogans* sorotipo pomona entre os animais do grupo "B" confirma que a presença de *L. biflexa* estirpe Buenos Aires na água de bebida dos suínos deste grupo não foi capaz de induzir reações sorológicas para aquele antígeno. Esta constatação concorda com a verificação do Rottini & Cols. (11) (1972) de que em seres humanos tratados com uma vacina formulada de *L. biflexa* sorotipo patoc, não houve reatores para antígenos de *L. interrogans*, bem como por Girio & Mathias (9) (1988) em cobaios experimentalmente infectados por quatro estirpes de *L. biflexa*.

A constatação de reações positivas para o antígeno de *L. biflexa* estirpe Buenos Aires em proporções estatisticamente iguais nos animais dos grupos "A" e "B", demonstra que este antígeno pode apresentar uma margem de resultados

falso-positivos como inclusive já foi encontrado outro autor (12). Esta verificação também indica que a contaminação da água de bebida com a *L. biflexa* estirpe Buenos Aires não foi capaz de modificar o perfil sorológico dos componentes do grupo "B". Talvez o poder invasor deste tipo de agente seja muito reduzido.

O emprego de rações comerciais contendo antimicrobianos utilizados como promotores de crescimento poderia também ser uma possível explicação para a ausência de reações sorológicas entre os animais que receberam a *L. biflexa* estirpe Buenos Aires através da via oral. Tal hipótese reforça a idéia de que em condições naturais seria muito pouco provável que amostras de *L. biflexa* pudesssem sensibilizar o sistema imunitário dos animais (13).

Embora não seja possível explicar-se as razões que determinaram a ocorrência, em condições naturais de isolamentos de amostras de *L. biflexa* tanto em humanos (7) como em animais (6, 10, 18), parece, como referido por Schönberg (13) (1979), que este tipo de situação é muito raro e não compromete a perspectiva do emprego de抗ígenos de *L. biflexa* para o diagnóstico da leptospirose humana e animal.

Conclusão

Suínos mantidos durante três dias em ambiente cuja água de bebida foi experimentalmente contaminada com *L. biflexa* estirpe Buenos Aires, não revelaram reações sorológicas para抗ígenos de *L. biflexa* estirpe Buenos Aires nem de *L. interrogans* sorotipo pomona.

Referências Bibliográficas

1. Addamiano, L. & Babudieri, B. - Water strains of Leptospira in the serodianosis of human and animal leptospirosis. Bull. Wld. Hlth. Org., 39:925-34, 1968.
2. Cacchione, R.A.; Cascelli, E.A.; Martinez, E.S. *Leptospira biflexa* Rufino. Su uso en el diagnóstico de leptospirosis animal. Rev. Invest. Agropec., 8:29-5, 1971.
3. Cacchione, R.A.; Cascelli, E.S.; Martinez, E.S. - Avances en el diagnóstico de leptospirosis animal por una prueba macroscópica empleando un antígeno de *L. biflexa* cepa Rufino. Rev. Asoc. Arg. Microbiol., 4(2):3-7, 1972.
4. Caldas, E.M. - Investigação comparativa de estirpes apatogênicas para o diagnóstico sorológico da leptospirose animal. Salvador, 1985. 37p. /Concurso para Professor Titular - Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia/.
5. Carle, B.N. & Dewhirst, W.M.H.Jr. - A method for bleeding swine. J. Amer. vet. Med. Ass., 101:495-6, 1942.
6. Carroll, R.E. & Le Clair, R.A. - Isolation of *Leptospiral* serotype patoc, from cattle in southern California. Amer. vet. Res., 30:2231-2, 1969.
7. Correa, M.O.A.; Hyakutake, S.; Natale, V.; Tiriba, S.C.; Martirani, I.; Galvão, P.A.A.; Albano, A.; Filippi, J.; Farhat, C.K.; Amato Neto, V. - Leptospirose humana por *Leptospira andamana*. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 13:137-43, 1971.
8. Faine, S. - Guidelines for the control of leptospirosis. Geneva, World Health Organization, 1982. 171p. (WHO off set publications, 67).
9. Girio, R.J.S. & Mathias, L.A. - Use of saprophytic leptospira strains in the serodiagnosis of experimental leptospirosis in guinea-pigs (*Cavia* sp.). Rev. Inst. Med. Trop., São Paulo, 30(2):91-4, 1988.
10. Myers, D.M. - Serological studies and isolation of serotype hardjo and *Leptospira biflexa* strains from horses of Argentina. J. Clin. Microbiol., 3:548-5, 1976.
11. Rottini, G.D.; Cinco, M.; Panizon, F.; Agosti, E. - Comportamento delle Ig seriche nell'uomo dopo vaccinazione con *Leptospira* saprofita (ceppo Patoc I). G. Mal. Infect., 24:879-85, 1972.
12. Santa Rosa, C.A. - Estudo comparativo de algumas estirpes de leptospira apatogênicas para o diagnóstico da leptospirose animal. São Paulo, 1978. 31p.

- /Tese de Livre-Docência - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo/.
13. Schonberg, A. - Antibodies against *Leptospira biflexa* serotype patoc and São Paulo in pigs. Possible occurrence and importance for the intracutaneous test for leptospirosis. Zbl. Bakt. I. Abt. Hig., 244A:45-9, 1979.
 14. Siegel, S. - Estatística não paramétrica para as ciências do comportamento. São Paulo. Mc Graw Hill, 1981. 350p.
 15. Vasconcellos, S.A. - Diagnóstico laboratorial da leptospirose. Comun. cient. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S.Paulo, 3:189-95, 1979.
 16. Vasconcellos, S.A.; Ohtsubo, I.; Yasuda, P.H.; Moretti, A.S.; Ito, F.H.; Passos, E.C.; Côrtes, J.A.; Moreno, A.G. - Emprego do antígeno de *L. biflexa* estirpe Buenos Aires para o diagnóstico sorológico da leptospirose em suínos experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorotipo pomona. Rev. Microbiol. Rev. 20(1):62-70, 1989.
 17. Yanaguita, R.M. - Diagnóstico rápido da leptospirose animal pela soro-aglutinação macroscópica com antígenos de *Leptospira biflexa*. São Paulo, 1987, 68p. /Tese de Livre Docência - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo/.
 18. Yasuda, P.H.; Sulzer, C.R.; Giorgi, W.; Genovez, M.E. - *Leptospira biflexa* sorotipo ranarum isolada de feto abortado de équino. Rev. Microbiol., São Paulo, 17:25-7, 1986.

EMPREGO DO ANTÍGENO DE *L. biflexa* ESTIRPE BUENOS AIRES NA REAÇÃO DE SORO-AGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA APLICADA AO DIAGNÓSTICO DA LEPTOSPIROSE EM SUÍNOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *L. interrogans* SOROTIPO POMONA

Silvio Arruda Vasconcellos

Ioshihiro Ohtsubo

Anibal Sant'Anna Moretti

Fumio Honma Ito

Estevão de Camargo Passos

José de Angelis Côrtes

Arlindo Garcia Moreno

Recebido para publicação em 26/09/88

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP

Av. Corifeu de Azevedo Marques, 2720

05340 São Paulo SP

& Paulo Hideki Yasuda

Instituto de Ciências Biomédicas II

Cidade Universitária - USP

05508 São Paulo SP

Resumo

Procurando simplificar a sistemática atualmente disponível para o diagnóstico sorológico da leptospirose suína, foi investigada a utilização do antígeno de *L. biflexa* estirpe Buenos Aires na reação de soro-aglutinação microscópica, (SAM), aplicada ao exame de 19 suínos, dos quais, nove permaneceram como testemunhos (Grupo "A") e dez foram inoculados pela via intraperitoneal com uma estirpe virulenta de *L. interrogans* sorotipo pomona (Grupo "B"). As colheitas de sangue foram realizadas em dias alternados nos primeiros 15 dias da investigação, a cada três dias entre o 18º e o 39º dia experimental e semanalmente até o 93º dia de observação. Na diluição de triagem dos soros de 1:100 os percentuais de resultados positivos para o antígeno de *L. interrogans* sorotipo pomona foram de 00,0% (0/270) e 72,60% (167/230), respectivamente para os grupos "A" e "B". Quanto ao antígeno de *L. biflexa* estirpe Buenos Aires os valores observados foram de 3,38% (7/207) e 14,34% (33/230), respectivamente para os mesmos grupos já referidos. O antígeno de *L. biflexa* estirpe Buenos Aires apresentou baixa sensibilidade para diagnosticar a leptospirose através da reação de SAM aplicada ao soro de suínos experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorotipo pomona diluídos na concentração de 1:100. Ao término da investigação todos os animais apresentaram resultado negativo nas provas para isolamento de leptospiras executadas a partir de tecido renal.

* Trabalho conduzido com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Summary

Use of the L. biflexa strain Buenos Aires for performing the microscopic-agglutination test for leptospirosis in swine experimentally infected with L. interrogans serovar pomona

The use of the *L. biflexa* strain Buenos Aires as the antigen in the microscopic agglutinating test (MAT) for the diagnosis of leptospirosis was investigated in two experimental groups of swines. The group "A" composed of nine animals was the control. The group "B" composed of ten animals, was inoculated with a virulent strain of *L. interrogans* serovar pomona by the intraperitoneal route. The blood collections were done each other day during the first 15 experimental days; each three days between the 18th to the 39th day of the investigations and weekly until the 93rd day of the research. At the screening serum dilution of 1:100 the percentage of positive reactions with the antigen of serovar pomona were: 0.00 (0/207) and 72.60 (167/230), respectively for the groups "A" and "B". For the same group order, with the Buenos Aires strain the results were 3.38 (7/207) and 14.34 (33/230). The antigen of *L. biflexa* strain Buenos Aires showed low sensitivity for performing the diagnosis of swine leptospires by the MAT at the serum dilution of 1:100. At the end of the investigations all of the animals presented negative results by the technique used for isolation of leptospires from samples of kidney tissue.

Introdução

A reação de soro-aglutinação microscópica (SAM) é aceita, internacionalmente, como o procedimento padrão para a confirmação do diagnóstico da leptospirose humana e animal (8), no entanto esta técnica tem se revelado pouco prática, pois para o exame de uma única amostra de soro são utilizados pelo menos 19 variantes sorológicas de *L. interrogans* (15, 22).

O emprego de *L. biflexa* estirpe Patoc I como antígeno único na reação de SAM (1) e em outras técnicas sorológicas (20), foi um grande avanço no sentido de facilitar o diagnóstico da leptospirose humana (8); contudo não foram obtidos bons resultados quando esta estirpe aquática foi avaliada frente a soros originários de animais domésticos (2, 3, 5, 14, 16).

Alguns pesquisadores (2, 3, 6, 10, 16, 23) têm relatado resultados conflitantes quando do exame de soros de suínos, naturalmente infectados, tendo como antígeno as estirpes de *L. biflexa* denominadas: Rufino, São Paulo e Buenos Aires. Tais estudos não só se limitaram a empregar a reação de SAM clássica como também analisaram o comportamento de tais抗ígenos em prova de aglutinação macroscópica (4, 23), que apresenta maiores perspectivas de aplicação em programas de saúde animal.

Dentre as possíveis explicações para as discrepâncias verificadas nos ensaios que utilizaram estirpes de *L. biflexa* para o diagnóstico da leptospirose animal, cumpre ser salientada a provável influência da variabilidade existente nos estágios pós-infecção, quando da colheita das amostras de sangue.

Deste modo, o presente trabalho, teve por objetivo empregar o antígeno de *L. biflexa* estirpe Buenos Aires na reação de SAM aplicada ao diagnóstico da leptospirose em suínos experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorotipo pomona, de modo a possibilitar a observação da eficiência da técnica diagnóstica em diferentes momentos da evolução do processo infeccioso.

Material e Métodos

A técnica de isolamento de leptospiras, em meio de cultura, executada foi a das diluições seriadas em meio de Fletcher (8) normal e acrescido de cinco-fluor-uracil na concentração de 100 microgramas por mililitro (21). Os tubos foram incubados à temperatura de 28°C com observações semanais em microscopia de campo escuro, durante um período de seis semanas.

A técnica de soro-aglutinação microscópica (8, 15) (SAM) foi realizada com o emprego de抗ígenos representados por culturas de leptospiras vivas, com cinco a sete dias de crescimento em meio de Ellinghausen, MacCullough, Johnson e Harris (EMJH) (8) enriquecido com soro estéril de coelho (21). A diluição dos soros foi a de 1:100. O critério adotado para considerar-se um soro como reagente foi o de 50% de aglutinação. A coleção de抗ígenos utilizada foi constituída por 21 estirpes de *L. interrogans* e três estirpes de *L. biflexa*, representadas pelas seguintes variantes sorológicas: australis, autumnalis, castellonis, bataviae, brasiliensis, butembo, canicola, whitcombi, cynopteris, grippotyphosa, hebdomadis, copenhageni, icterohaemorrhagiae, javanica, panama, pomona, pyorogenes, hardjo, wolffi, shermani, tarassovi, andamana, patoc, e Buenos Aires.

O diluente empregado tanto para o preparo das suspensões de órgãos como para a diluição dos soros foi representado por uma solução de cloreto de sódio a 0,85% com pH 7,6, tamponado com a solução de fosfatos de Sorense (15).

O inóculo utilizado para provocar a infecção dos suínos foi o macerado de tecido hepático a 1,0%, peso-volume, da sétima passagem em hamster, de uma amostra virulenta de *L. interrogans* sorotipo pomona. A observação deste material em microscopia de campo escuro com aumento de 200 vezes, revelou a presença de 30 a 40 leptospiras ativas por campo. Cada suíno, recebeu 4,0 mililitro desta suspensão pela via intraperitoneal.

Os animais utilizados foram 19 suínos, mestiços, dos quais 10 machos e 9 fêmeas, com 64 a 74 dias de idade e peso médio de 16,0 quilogramas. Estes animais estavam aparentemente em bom estado de saúde e foram vermifugados com Levamisol na dose de 1,0 mililitro para cada 20 quilogramas de peso vivo pela via subcutânea.

A ração empregada foi do tipo comercial, nas categorias de crescimento e engorda, conforme o estágio de desenvolvimento do animal. O fornecimento de água de bebida durante toda a investigação, foi realizado através de bebedouros, automáticos do tipo "chupeta". A água de bebida oferecida aos animais foi proveniente de nascente localizada no interior da propriedade.

Os 19 suínos livres de aglutininas para as 24 estirpes de leptospiras já relatadas foram aleatoriamente divididos em dois grupos com 9 a 10 indivíduos designados, respectivamente, pelas letras "A" e "B". Os animais do grupo "A" não foram submetidos a nenhum tipo de inoculação e permaneceram como grupo testemunho. Os animais do grupo "B" foram experimentalmente inoculados pela via intraperitoneal com a *L. interrogans* sorotipo pomona, já relatada.

Cada grupo experimental teve a sua baia específica. A baia do grupo "B" distava cerca de 500 metros da baia "A" e constituiu uma instalação isolada com a sua própria equipe de tratadores. Estas duas baias dispunham em suas entradas de pedilúvios abastecidos diariamente com solução de iodoformio 1:250, volume a volume. Todas as atividades realizadas com os animais cumpriram rigorosamente a seguinte sequência: primeiro a baia do grupo "A"; e por último a baia do grupo "B".

Durante os primeiros 15 dias experimentais os animais foram submetidos ao exame clínico individual com controle térmico, duas vezes ao dia.

As amostras de sangue foram obtidas por punção da veia cava cranial (7), conforme o seguinte cronograma: em dias alternados entre o terceiro e o 15º dia experimental; a cada três dias entre o 15º e o 39º dia experimental e semanalmente entre o 39º e o 93º dia do início da investigação. Cada amostra foi dessorada a sombra e o soro sanguíneo foi armazenado a 20°C negativos até o momento do exame.

Aos 93 dias da experimentação todos os animais foram sacrificados e ao término da etapa de evisceração foi realizada a colheita dos rins. Estes órgãos foram imediatamente transferidos para o laboratório onde foi executado o processamento para isolamento de leptospiras, anteriormente especificado.

A análise dos resultados obtidos considerou como especificidade absoluta o

percentual de resultados negativos no grupo "A", testemunho não infectado e como sensibilidade absoluta o percentual de resultados positivos obtidos no grupo "B", experimentalmente infectado com *L. interrogans* sorotipo pomona. Os resultados positivos obtidos no grupo "A" foram interpretados como falsas reações positivas.

O estudo do grau de associação entre os resultados obtidos entre grupos foi efetuado pelo Teste de Qui Quadrado (17). A análise do grau de associação entre os resultados obtidos dentro de um mesmo grupo foi efetivada pelo Teste de Mc Nemar (17). O nível de significância adotado foi de 0,05.

Tabela 1 - Resultados da prova de soro-aglutinação microscópica para leptospirose, empregando os抗ígenos de *L. interrogans* sorotipo pomona e *L. biflexa* estirpe Buenos Aires segundo o grupo experimental e o dia pós-infecção (p.i.) em que foi realizada a colheita de sangue.

Símbolos: (a) = "A" grupo de suínos testemunho não infectado; "B" grupo de suínos experimentalmente infectado via intraperitoneal com *L. interrogans* com *L. interrogans* sorotipo pomona; (b) = I antígeno de *L. interrogans* sorotipo pomona; II antígeno de *L. biflexa* estirpe Buenos Aires; (c) = Número resultados positivos / Número de soros examinados.

Grupo experimental (a)	A		B	
	Antígeno (b)		I	II
Dia p.i. Coleta de sangue	I	II	I	II
3♀	0/9 (c)	0/9	0/10	1/10
5♀	0/9	0/9	1/10	1/10
7♀	0/9	0/9	6/10	5/10
9♀	0/9	0/9	5/10	1/10
11♀	0/9	0/9	9/10	0/10
13♀	0/9	0/9	10/10	0/10
15♀	0/9	0/9	10/10	1/10
18♀	0/9	0/9	10/10	2/10
21♀	0/9	1/9	10/10	2/10
24♀	0/9	1/9	10/10	1/10
27♀	0/9	0/9	10/10	1/10
30♀	0/9	0/9	10/10	0/10
33♀	0/9	0/9	9/10	0/10
36♀	0/9	1/9	10/10	5/10
39♀	0/9	2/9	10/10	3/10
44♀	0/9	0/9	9/10	5/10
51♀	0/9	1/9	9/10	3/10
58♀	0/9	0/0	9/10	0/10
65♀	0/9	0/9	8/10	0/10
72♀	0/9	0/9	6/10	0/10
79♀	0/9	1/9	2/10	1/10
86♀	0/9	0/9	0/10	0/10
93♀	0/9	0/9	4/10	1/10
Totais	0/207	7/207	167/230	33/230
	(0,00%)	(3,38%)	(72,6%)	(14,348)

Tabela 2 - Relação entre as médias semanais dos resultados dos exames realizados nos suínos do Grupo "B"(a), segundo o tipo de antígeno empregado e a semana após a infecção experimental (p.i.) em que foi realizada a colheita de sangue. Símbolos: (a) Grupo "B" = Animais experimentalmente inoculados com *L. interrogans* sorotipo pomona; (b) I = Número médio de animais reatores pelo antígeno de *L. interrogans* sorotipo pomona; II = Número médio de animais reatores pelo antígeno de *L. biflexa* estirpe Buenos Aires.

Tipo de antígeno Semana p.i.	II/I (b)	
	18	2,3/ 2,3 (100,00%)
28	0,3/ 8,0	(3,75%)
38	1,6/10,0	(16,00%)
48	1,0/10,0	(10,00%)
58	0,0/ 9,5	(0,00%)
68	4,0/10,0	(40,00%)
78	5,0/ 9,0	(55,55%)
88	3,0/ 9,0	(33,33%)
98	0,0/ 9,0	(0,00%)
108	0,0/ 8,0	(0,00%)
118	0,0/ 6,0	(0,00%)
128	1,0/ 2,0	(50,00%)
138	0,0/ 0,0	(0,00%)
148	1,0/ 4,0	(25,00%)
Total	19,2/96,8	(19,83%)

Resultados

Durante todo o período experimental não houve nenhuma diferença de comportamento clínico entre os dois grupos de animais estudados.

Na Tabela 1, são apresentados os resultados das provas de SAM para a leptospirose segundo o grupo experimental, o tipo de antígeno utilizado e o momento após a infecção em que foi realizada a colheita do sangue. A sua observação demonstra que os animais do grupo "A" permaneceram como não reagentes para o antígeno de *L. interrogans* sorotipo pomona durante todo o período de estudo. Relativamente aos exames realizados nos animais inoculados com *L. interrogans* sorotipo pomona (Grupo "B"), pode-se observar a existência de resultados positivos frente ao antígeno homólogo ao utilizado para a infecção experimental já no quinto dia pós-infecção (p.i.).

Os resultados obtidos para o grupo "B" quando do emprego do antígeno de *L. biflexa* estirpe Buenos Aires revelam a existência de reações positivas já no terceiro e quinto dia p.i., portanto mais precoces do que aqueles observados com o antígeno homólogo ao utilizado na infecção experimental. No sétimo dia p.i., 50% dos animais foram reagentes. A partir de então as proporções de reações positivas foram baixas e irregulares, constatando-se, no entanto, que no período compreendido entre o 36º e o 51º dia p.i., houve uma frequência média de soro reatores da ordem de 40%. O estudo dos valores de sensibilidade obtidos para os grupos "A" e "B", respectivamente, de 3,38 e 14,34%, demonstra que os resultados do grupo "B" são estatisticamente diferentes daqueles encontrados para o grupo "A" ($p < 0,01$).

Considerando-se a frequência de resultados negativos obtidos no grupo "A" como o parâmetro da especificidade absoluta, são encontrados os valores de 100,00 e de 96,61%, respectivamente, para os antígenos de *L. interrogans* sorotipo pomona e de *L. biflexa* estirpe Buenos Aires. Por outro lado, tendo como sensibilidade absoluta a frequência de resultados positivos obtidos no grupo "B" são encontrados os valores de 72,60 e de 14,34%, respectivamente, para os antígenos de *L. interrogans* sorotipo pomona e de *L. biflexa* estirpe Buenos Aires.

Tendo como parâmetro de concordância absoluta a soma dos acertos nos resultados dos exames, conforme a condição real dos animais, previamente conhecida, (Grupos "A" e "B") são obtidos os valores de 85,58 e de 53,31%, respectivamente, para os antígenos de *L. interrogans* sorotipo pomona e de *L. biflexa* estirpe Buenos Aires.

O estudo dos resultados dos exames realizados nos animais do grupo "B", experimentalmente inoculados com *L. interrogans* sorotipo pomona, obtidos com os dois tipos de antígenos empregados na prova de SAM, revela para a estirpe Buenos Aires os valores de 92,06; 16,76 e 37,39%, respectivamente, para os parâmetros de especificidade, sensibilidade e concordância relativas. Nesta análise, o resultado da prova de SAM com o antígeno de *L. interrogans* sorotipo pomona foi considerado como padrão.

A análise estatística pelo Teste de Mc Nemar da associação entre os resultados obtidos no grupo "B" frente aos dois tipos de antígenos utilizados, revelou o valor de Qui Quadrado observado de 122,84 ($p < 0,001$) que conduz a aceitar-se como significante a diferença entre os valores registrados.

A Tabela 2 apresenta a relação entre as médias semanais dos resultados dos exames realizados nos animais do grupo "B", segundo o tipo de antígeno empregado e a semana pós-infecção em que foi realizada a colheita de sangue. A observação desta Tabela demonstra que na primeira semana p.i., a capacidade discriminadora de animais reatores pela estirpe Buenos Aires foi idêntica à do sorotipo pomona. Nas semanas subsequentes esta capacidade foi bastante reduzida e irregular, verificando-se, no entanto, que no período compreendido entre a sexta e a oitava semana p.i., o poder discriminador do antígeno de *L. biflexa* variou entre 33 e 55,5% daquele revelado pelo antígeno de *L. interrogans*, próximo ao término do experimento, quando a frequência de animais soro reatores começa a ser baixa, inclusive para o antígeno de *L. interrogans*, houve ocasiões esporádicas, como na 12ª semana p.i., em que a eficiência diagnóstica do antígeno de *L. biflexa* atingiu 50% daquela revelada pelo antígeno de *L. interrogans*.

A Tabela 3 relaciona os resultados dos exames dos animais do grupo "B", experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorotipo pomona, segundo o animal, o tipo de antígeno e a data p.i., em que foi constatada a primeira e a última reação positiva. A sua observação, demonstra que dos 10 animais experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorotipo pomona, nove apresentaram pelo menos uma

Tabela 3 - Dia pós-infecção (p.i.) em que foi constatada a primeira e a última reação positiva na prova de soro-aglutinação microscópica para leptospirose em suínos experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorotipo pomona, segundo o número do animal e o antígeno utilizado.

Símbolos: (a) I = Antígenos *L. interrogans* sorotipo pomona; (b) II = Antígeno *L. biflexa* estirpe Buenos Aires; (c) ... = Animal não reagiu frente ao antígeno indicado em nenhuma das colheitas realizadas.

Nº do Animal	Condição Antígeno	Dia pós-infecção				Nº do Animal	
		Iª Reação positiva		Última Reação positiva			
		I (a)	II (b)	I	II		
952	79	79	939	449		952	
964	79	39	649	449		964	
966	119	79	729	519		966	
994	119	369	939	939		994	
997	79	79	589	449		997	
984	79	399	729	799		984	
1010	119	399	399	399		1010	
1019	59	...	939	...		1019	
1025	99	79	649	449		1025	
1050	79	79	729	519		1050	
Média		8,2	16,8	72,0	54,3	Média	
Mediana		7	7	72	44	16,7/23	

Tabela 4 - Resultados das provas de soro-aglutinação microscópica para a leptospirose em suínos do grupo "B" (a) segundo o número do animal e o antígeno utilizado.

Símbolos: (a) = Grupo de animais experimentalmente com *L. interrogans* sorotipo pomona; (b) I = Antígeno de *L. interrogans* sorotipo pomona; (c) II = Antígeno de *L. biflexa* estirpe Buenos Aires; (d) = Número resultados positivos sobre o total de exames realizados.

Nº do Animal	Antígeno	(b)		(c)	
		I	II	I	II
952	20/23 (d)	(86,95%)	5/23	(21,73%)	
964	16/23	(69,56%)	4/23	(17,39%)	
966	16/23	(69,56%)	6/23	(26,08%)	
994	17/23	(73,91%)	2/23	(8,69%)	
997	16/23	(69,56%)	3/23	(13,04%)	
984	16/23	(69,56%)	4/23	(17,39%)	
1010	10/23	(43,47%)	1/23	(4,34%)	
1019	21/23	(91,30%)	4/23	(17,39%)	
1025	16/23	(69,56%)	4/23	(17,39%)	
1050	19/23	(82,60%)	4/23	(17,39%)	
Média	16,7/23	(72,60%)	3,3/23	(14,34%)	

reação positiva durante todo o período experimental frente ao antígeno de *L. biflexa* estirpe Buenos Aires. Apenas o animal de nº 1019 foi não reagente para o antígeno de *L. biflexa* nos exames realizados durante os 93 dias de experimentação.

Ainda na Tabela 3 pode-se depreender que o primeiro resultado positivo demonstrado pelo antígeno de *L. biflexa* estirpe Buenos Aires em 30% dos casos foi mais precoce, do que aquele observado pelo antígeno de *L. interrogans* (animais de números 964, 966 e 1025). A mediana dos dias após infecção em que se constatou a última reação positiva para o antígeno de *L. interrogans* foi de 72 dias e para o antígeno de *L. biflexa* de 44 dias.

A Tabela 4 registra os resultados das provas SAM para leptospirose nos animais experimentalmente infectados com o sorotipo pomona (Grupo "B") segundo o número do animal e o antígeno utilizado. Pode-se constatar que enquanto a média de positividade para o antígeno de *L. interrogans* foi de 72,6%, para o antígeno de *L. biflexa* foi de 14,34%. O animal de número 1010 foi quem apresentou menor proporção de resultados positivos frente a dois antígenos com valores de 43,47 e 4,34%, respectivamente para os antígenos pomona e Buenos Aires.

Embora o antígeno Buenos Aires tenha possibilitado o diagnóstico da leptospirose em 90% dos animais experimentalmente infectados com *L. interrogans*, os resultados obtidos em exames sucessivos de um mesmo animal, foram pouco precisos.

Aos 93 dias do início do experimento todos os animais foram sacrificados e as tentativas de isolamento de leptospiras em meio de cultura a partir de amostras de tecido renal foram todas negativas.

Discussão

A ausência de sinais clínicos nos dois grupos de suínos trabalhados demonstra que a infecção experimental, provocada no grupo "B" não determinou alterações de saúde demonstráveis com a metodologia adotada. Esta verificação concorda com a referência registrada por outros autores (12, 13, 18, 19) de que em suínos em crescimento a leptospirose muitas vezes assume um quadro silencioso ou inaparente. No entanto, não pode ser excluída a hipótese de que as doses de microrganismos utilizados para o estabelecimento da infecção experimental tivessem sido insuficientes para provocar um quadro com a presença de manifestações clínicas. Cabe também ser considerada a possibilidade de que as boas condições de higiene, alimentação e manejo, pudesse ter auxiliado os animais a suplantar as ações agressivas dos agentes infeciosos. Ressalte-se inclusive que os antimicrobianos incluídos nas rações comerciais como promotores de crescimento, pudesse ter interferido sobre as manifestações clínicas da infecção.

A permanência de resultados não reagentes para o antígeno de *L. interrogans* sorotipo pomona em todos os suínos do grupo "A", durante os 93 dias da experimentação comprova a eficiência da estratégia estabelecida para controlar a introdução e impedir a disseminação da leptospirose por *L. interrogans* sorotipo pomona no ambiente de execução da investigação.

Apesar dos suínos do grupo "B" não terem apresentando sinal clínico de leptospirose, a presença de anticorpos contra a *L. interrogans* sorotipo pomona começou a ser demonstrada já no quinto dia pós-infecção (p.i.). Deve, no entanto, ser salientado que só no 13º dia p.i., todos os componentes deste grupo foram realmente caracterizados como reatores. Este período de indução de imunidade situado entre a primeira e a segunda semana de infecção está de acordo com aqueles referidos por outros autores (12, 18) e justifica a razão do valor da sensibilidade absoluta obtida com o antígeno de *L. interrogans* para os exames dos animais do grupo "B", ter sido inferior ao de 100%. Ressalte-se também que no 44º dia p.i., já se inicia a fase de declínio nos níveis de aglutininas observados.

O comportamento sorológico dos animais experimentalmente inoculados com *L. interrogans* sorotipo pomona (Grupo "B") permitiu a confirmação de que a prova de SAM com抗ígenos vivos é ainda um bom instrumento para o diagnóstico da leptospirose em suínos, mesmo naquelas infecções ditas silenciosas ou inaparentes. Através do seu emprego tendo como antígeno a *L. interrogans* sorotipo pomona e a diluição de triagem dos soros no valor de 1:100, foi possível a confirmação de infecção em 90% dos casos no período compreendido entre o 13º e o 58º dia p.i.

Se na diluição inicial dos soros, no valor de 1:100, o antígeno de *L. interrogans* sorotipo pomona mostrou-se muito eficiente para identificar aglutininas anti-leptospira nos animais do grupo "B", em contrapartida, nas mesmas condições, o poder discriminador do antígeno de *L. biflexa* estirpe Buenos Aires foi extremamente baixo.

Embora durante a primeira semana após infecção o valor diagnóstico do antígeno de *L. biflexa* tenha sido idêntico àquele revelado pelo antígeno de *L. interrogans*, apresentando inclusive em algumas oportunidades, a primeira reação positiva mais cedo do que aquela verificada com o antígeno de leptospira patogênica, nos exames subsequentes os resultados obtidos com o antígeno de leptospira aquicola foram muito irregulares.

Deve no entanto ser salientado que em algumas ocasiões esporádicas, com especial destaque na primeira semana pós-infecção e no período compreendido entre o 36º e o 51º dia p.i., houve um melhor comportamento do antígeno de *L. biflexa* estirpe Buenos Aires. Resultados semelhantes foram verificados por Hagiwara (11) (1979) em cães experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorotipos canicola e icterohaemorrhagiae.

Com está bem estabelecido que a população dos anticorpos suscitados por um determinado antígeno é algo extremamente dinâmico e heterogêneo, pode-se aventar a hipótese de que alguma imunoglobulina com maior avidez pelos determinantes antigênicos existentes na *L. biflexa* sofresse a interferência das concentrações variáveis dos demais anticorpos associados. Estudos com investigação seletiva da atuação de diferentes classes de imunoglobulinas e absorção dos soros com antígenos

de *L. biflexa* ou de *L. interrogans* poderão suportar este tipo de indagação (9).

Talvez as discrepâncias verificadas entre os resultados observados pelos diferentes autores que têm estudado o uso de antígenos de *L. biflexa* no diagnóstico da leptospirose animal (3, 4, 10, 16, 23), possam ser atribuídas não só a fatores intrínsecos relativos às técnicas utilizadas, como também a possível variabilidade existente no estágio pós-infecção dos animais cujos soros foram examinados.

A ausência de leptospiras no tecido renal dos dois grupos de suínos estudados por ocasião do 93º dia pós-infecção, comprova que nesta oportunidade, com a metodologia utilizada, não foi possível a confirmação da infecção renal. Esta constatação pode ser atribuída ao possível término na fase de leptospirúria ou também pode ser levantada a hipótese de que a amostra de *L. interrogans* sorotipo pomona inoculada nos animais do grupo "B" não tivesse conseguido atingir o tecido renal.

Conclusões

Os resultados obtidos, nas condições em que o presente estudo foi executado, oferecem as seguintes conclusões:

1. O antígeno de *L. biflexa* estirpe Buenos Aires apresentou baixa sensibilidade para diagnosticar a leptospirose através de reação de SAM, aplicada ao soro de suínos experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorotipo pomona, tendo como diluição inicial o valor de 1:100;
2. Embora o antígeno de *L. biflexa* estirpe Buenos Aires tenha apresentado, na prova de SAM, reações positivas frente a soros de suínos experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorotipo pomona, já na primeira semana pós-infecção, nos exames subsequentes o comportamento de tais reações foi muito irregular;
3. Em soros de suínos experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorotipo pomona, diluídos a 1:100, o período médio de reatividade imunológica revelado pelo antígeno de *L. biflexa* estirpe Buenos Aires foi inferior àquele constatado com o de *L. interrogans* sorotipo pomona.

Referências Bibliográficas

1. Addamiano, L. & Babudieri, B. - Water strains of leptospira in the serodiagnosis of human and animal leptospirosis. Bull. Wld. Hlth. Org., 39:925-34, 1968.
2. Ávila, F.A.; Moreira, E.C.; Viana, F.C. - Leptospira patoc amostra Patoc I como antígeno de triagem no diagnóstico das leptospiroses suínas. Científica, Jaboticabal, 5(3):352-5, 1977.
3. Cacchione, R.A.; Cascelli, E.A.; Martinez, E.S. - *Leptospira biflexa* Rufino. Su uso en el diagnóstico de leptospirosis animal. Rev. Invest. agropec., 8:29-5, 1971.
4. Cacchione, R.A.; Cascelli, E.S.; Martinez, E.S. - Avances en el diagnóstico de leptospirosis animal por una prueba macroscópica empleando un antígeno de *L. biflexa* cepa Rufino. Rev. Asoc. Arg. Microbiol., 4(2):3-7, 1972.
5. Caldas, E.M.; Sampaio, M.B.; Costa, E.; Tischenko, L.M. - Patoc I and Rufino strains of *Leptospira biflexa* as screening antigens in the diagnosis of leptospirosis. Int. J. Zoonosis, 5:91-6, 1978.
6. Caldas, E.M. - Investigação comparativa de estirpes apatogênicas para o diagnóstico sorológico de leptospirose animal. Salvador, 1985. 37p. /Concurso para professor Titular - Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia/.
7. Carle, B.N. & Dewhirst, W.M.H.Jr. - A method for bleeding swine. J. Amer. Vet. Med. Ass., 101:495-6, 1942.
8. Paine, S. - Guidelines for the control of leptospirosis. Geneva, World Health Organization, 1982. 171p. (WHO off set publications, 67).
9. Fathalla, N.C. & Coghlan, J.D. - Detection of Leptospiral antibodies in animal sera by means of fractionated antigenic extracts. J. Med. Microbiol., 13:513-26, 1980.

10. Genovez, M.E. - Avaliação da eficiência de estirpes de *Leptospira biflexa* no diagnóstico sorológico de triagem da leptospirose animal. São Paulo, 1985. 59p. /Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade São Paulo/.
11. Hagiwara, M.K. - Estudo comparativo entre as reações de soro-aglutinação microscópica e de fixação de complemento na leptospirose canina experimental pelos sorotipos icterohaemorrhagiae e canicola. São Paulo, 1979. 56p. /Tese de Doutoramento - Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo/.
12. Inzana, T.J. & Dawe, D.L. - Experimentally induced *Leptospira interrogans* serovar autumnalis infections in young swine. Amer. J. Vet. Res., 40:1355-8, 1979.
13. Morse, E.V.; Bauer, D.C.; Langhan, R.F.; Lang, R.W.; Ullrey, D.E. - Experimental leptospirosis IV. Pathogenesis of porcine *Leptospira pomona* infections. Amer. J. Vet. Res., 19:388-94, 1958.
14. Ris, D.R. - The failure of genus - specific serological tests to detect leptospirosis in cattle and rabbits. N.Z. Vet. J., 23:164-6, 1975.
15. Santa Rosa, C.A. - Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. Rev. Microbiol., 1:97-109, 1970.
16. Santa Rosa, C.A. - Estudo comparativo de algumas estirpes de leptospiras apatogênicas para o diagnóstico da leptospirose animal. São Paulo, 1978. 31p. /Tese de Livre-Docência/.
17. Siegel, S. - Estatística não paramétrica para as ciências do comportamento São Paulo, Mc Graw Hill, 350p., 1981.
18. Sleight, S.D.; Langhan, R.F.; Morter, R.L. - Experimental leptospirosis: The early pathogenesis of *Leptospira pomona* infection in young swine. J. Infect. Dis., 106:262-9, 1960.
19. Stalheim, O.H.V. - Failure to reproduce acute porcine leptospirosis by physiologic stress or concurrent infections. Amer. J. Vet. Res., 34:1257-60, 1973.
20. Turner, L.H. - Leptospirosis II. Serology. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 62:880-99, 1968.
21. Turner, L.H. - Leptospirosis III. Maintenance isolation and demonstration of leptospires. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 64:623-46, 1970.
22. Vasconcellos, S.A.- Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. Com. Cient. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S.Paulo, 3:189-95, 1979.
23. Yanaguita, R.M. - Diagnóstico rápido da leptospirose animal pela soro-aglutinação macroscópica com抗ígenos da *Leptospira biflexa*. São Paulo, 68p., 1987. /Tese de Livre-Docência Instituto de Ciências Biomédicas-USP/.

CONSERVAÇÃO DA AMOSTRA CONN-F DE *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* PELO CONGELAMENTO E LIOFILIZAÇÃO

Lourenço Balen

Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves/EMBRAPA
Caixa Postal D-3 Km 110, Br 153
89800 Concórdia SC, Brasil

Recebido para publicação em 02/12/88

Edir Nepomuceno da Silva
Raphael Lúcio Andreatti Filho
Maria Christina Gaviolle

Deptº de Patologia
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo USP
05340 São Paulo SP, Brasil

& Clotilde E.M.P.D. Cappellaro

Seção de Microscopia Eletrônica
Instituto Biológico
04014 São Paulo SP, Brasil

Resumo

Avaliou-se o congelamento a -20°C e -70°C, e a liofilização com ou sem leite desnatado com crioprotetor, como processos de preservação do título da cultura da amostra Conn-F de *Mycoplasma gallisepticum*. O título inicial da cultura fresca foi de $1,3 \times 10^8$ UFC por ml. A liofilização e o congelamento a -20°C reduziram em média 1 log₁₀ após seu procedimento. Na conservação por liofilização, nos volumes de 10 e 2ml, sem crioprotetor, os títulos baixaram 2,4 e 3,0 log₁₀, respectivamente, no período de 360 dias. Com a adição de leite em pó, os títulos caíram 2,1 e 1,4 log₁₀ para os volumes de 10 e 2ml, no mesmo período de observação. O processo de liofilização, por sua vez, causou danos às células dos micoplasmas com extravazamento de conteúdo celular, observado pela microscopia eletrônica. O melhor método de conservação foi o congelamento a -70°C, que mostrou a queda de título de apenas 0,5 log₁₀ durante todo o período experimental de 360 dias.

Summary

Preservation of strain Conn-F of Mycoplasma gallisepticum by freezing and lyophilization

Culture of Conn-F strain *Mycoplasma gallisepticum* was stored by freezing at -20°C and -70°C, as well as, the lyophilization with skim milk as cryoprotective agent. The initial title of the fresh culture was 1.3×10^8 UFC per ml. The lyophilization and the freezing at -20°C reduced the title in overage one log₁₀. The freeze-drying in volumes of 10 and 2ml without cryoprotector reduced the title

in 2.4 and 3.0 \log_{10} , respectively, during the experimental period of 360 days. The addition of cryoprotector in the volumes of 10 and 2ml reduced the title in 2.1 and 1.4 \log_{10} , respectively. The lyophilization, as confirmed by the electronic microscopy, damaged the organism causing the cells to leak its contents. The best storage method was the freezing at -70°C which declined the title only in 0.5 \log_{10} during the same experimental period.

Introdução

A imunização é um dos processos empregados no controle da Doença Crônica Respiratória das Galinhas (DCR). Vacinas vivas produzidas com amostra de *Mycoplasma gallisepticum* (*M. gallisepticum*) de baixa virulência, como a Conn-F tem sido utilizada há anos no controle da DCR (7, 23). Em granjas de poedeiras comerciais com idades múltiplas, o emprego desta vacina tem reduzido perdas devido a infecção pelo *M. gallisepticum* e auxiliado na erradicação da DCR (12). Uma das dificuldades associadas à produção e distribuição da vacina Conn-F de *M. gallisepticum* é a manutenção de seu título infectante protetor. Desta maneira, esta vacina tem sido produzida como uma cultura em caldo e utilizada num prazo de 24 horas após sua produção (2, 10, 75). A conservação desta amostra, em pequenos volumes, produziu resultados variáveis quando feita a -20°C e -70°C (1, 9, 14, 16). Contudo, o congelamento em nitrogênio líquido tem sido o recurso utilizado na preservação de estoques de várias espécies do gênero (19).

A liofilização é outro processo de conservação estudado (4, 8, 16, 17, 20, 21, 24).

Neste procedimento, tem sido experimentado diferentes agentes crioprotetores para melhorar a viabilidade do processo (20, 22). A adição do glicerol e dimetyl sulfoxide (DMSO) como agentes crioprotetores não tiveram influência sobre o título da amostra Conn-F de *M. gallisepticum* mantida a -20°C ou -60°C. Também, não houve vantagem no uso de glicose e leite desnatado na liofilização da mesma amostra no volume de 2ml, observada por um período de 1 ano a 4°C (14).

O presente estudo objetivou comparar a liofilização da amostra Conn-F de *M. gallisepticum*, nos volumes de 2 a 10ml com o congelamento a -20°C e -70°C, adicionando-se ou não leite em pó desnatado como agente crioprotetor, observando-se as variações de títulos por um período de 360 dias e possíveis alterações ultraestruturais das células ocasionadas pelo processo de liofilização.

Material e Métodos

Amostra de *M. gallisepticum* - Foi utilizada a amostra Conn-F empregada como cultura vacinal (2, 3, 5, 7, 11, 13, 16), com número de pesagens desconhecida.

Meios de cultura - Foram utilizados os meios de cultura caldo e ágar Frey (6) conforme formulação descrita por Yoder (23).

Produção da cultura - A amostra Conn-F de *M. gallisepticum* mantida na forma liofilizada foi reativada pela semeadura em placas de petri contendo ágar Frey. Após cinco dias de incubação a 37°C em microerofilia, cinco colônias isoladas foram cionadas e transferidas para tubos tamanho 13 x 100mm com tampa de baquelite rosqueadas, contendo 3ml de caldo Frey.

O cultivo foi adaptado a esse meio de cultura através de passagens sucessivas. O experimento foi realizado com a cultura na fase logarítmica de crescimento (1).

Crioprotetor - Na liofilização foram usados 16% de leite em pó desnatado marca comercial Molico (M) adicionado em caldo de infusão de cérebro e coração (ICC) (14). Esta composição foi misturada em volumes iguais com as culturas de micoplasma a serem liofilizadas.

Distribuição das aliquotas - A cultura foi distribuída em série de 20 frascos de vidro tipo penicilina para cada tratamento.

Nos experimentos que foi utilizada a liofilização, os volumes foram de 2 e 10ml, enquanto que no congelamento o volume foi de 2ml. Dos quatro experimentos liofilizados, em dois foi adicionado o crioprotetor e dois sem. Nas duas formas de congelamento não foi utilizado o preservante.

Liofilização e congelamento - O material foi processado conforme as normas gerais de liofilização e congelamento de produtos biológicos (19, 20).

A liofilização foi realizada em liofilizador da marca New Brunswick Scientific Co Inc. "Freezer Dryer" modelo B-67 (EUA). O material permaneceu liofilizando por um período de 24 e 30 horas para os volumes de 2 e 10ml, respectivamente.

O congelamento a -70°C foi realizado no congelador marca Revco Inc. West Columbia, SC. 29169 (EUA) e a -20°C num freezer vertical da marca Prosdóximo.

Contagem das células viáveis - A manutenção da viabilidade da cultura de *M. gallisepticum* no decorrer do experimento foi verificada pela viabilidade das células. Utilizou-se a técnica de contagem de colônias (20). Foi feita uma contagem das células viáveis da cultura antes da distribuição das aliquotas e outra imediatamente após os processos de liofilização e congelamento. Posteriormente com 15 dias de conservação, e a cada 30 até completar 360 dias.

As amostras foram submetidas a diluições decimais e, inóculos de 0,04ml de cada diluição, foram plaqueados em triplicata, em placas de petri contendo meio de cultura ágar Frey. Quando o meio de cultura havia absorvido o inóculo, as placas eram invertidas e incubadas a 37°C , em microarofilia (jarra e vela) por 5 dias (1).

A contagem das colônias foi feita com auxílio de microscópio-esterooscópio marca Olympus em aumento de 100 vezes, e convertida em unidade formadora de colônia (UFC) por ml da cultura (20). O número de colônias contida em cada diluição foi convertido em logaritmo com base 10 (\log_{10}).

Microscópia eletrônica - Foi realizada no microscópio eletrônico de transmissão da marca Philips, EM-201, na voltagem de 80 KV. O método empregado foi a da observação direta da cultura. O material foi depositado em grades metálicas com 200 "mesh" recobertas com filme de parlódio, estabilizado por carbono. Na contrasteção negativa foram utilizados os corantes: Molibdato de Amônio à 2,5%, Acetato de Urânila à 2,0% e Fosfotungstato de Potássio a 2%.

Resultados

O título da cultura fresca antes dos processos de congelamento e liofilização foi de $1,3 \times 10^8$ UFC por ml. Imediatamente após a liofilização, que para efeito de resultado foi considerado o primeiro dia, como expressa a Tabela 1, houve a redução média de 1 log:10. No primeiro dia após o congelamento a -70°C não se verificou perda do título.

A verificação dos títulos de viabilidade foi realizado também nos períodos de 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300 e 360 dias conforme mostra a mesma Tabela e Figura 1.

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) serviu para mostrar possíveis alterações nas células dos micoplasmas submetidos ao processo de liofilização. Pode-se observar material extravazado do conteúdo celular, provavelmente devido a injúria que o processo de congelamento e/ou liofilização tenha provocado (Figura 3). A cultura fresca da amostra Conn-F mostrou-se sem alterações celulares (Figura 2).

A melhor visualização foi obtida quando utilizou-se na contrasteção negativa e Molibdato de Amônio.

Tabela 1 - Viabilidade da amostra Conn-F de *Mycoplasma gallisepticum*, conservada na forma liofilizada, com e sem crioprotetor (CR) e em diferentes volumes, na forma congelada.
 Símbolos: A = Título expresso log. 10.

Período de conservação (Dias)	Liofilizada				Congelada	
	Sem CR 10 ml	Com CR 10 ml	Sem CR 2 ml	Com CR 2 ml	-20°C 2 ml	-70°C 2 ml
0	8,1A	8,1	8,1	8,1	8,1	8,1
1	7,1	7,5	6,4	7,7	7,3	8,1
15	7,0	7,3	6,5	7,7	6,8	8,1
30	7,4	7,1	6,4	7,8	6,8	8,2
60	7,1	7,3	6,2	7,6	6,2	8,2
90	7,4	7,3	6,2	7,3	6,1	8,3
120	6,2	7,1	5,7	7,3	5,9	8,3
150	6,5	7,1	5,5	7,5	5,9	8,1
180	6,5	7,2	5,5	7,1	3,6	8,0
240	6,5	7,0	5,6	7,0	2,8	8,0
300	5,7	6,1	5,2	6,7	0,0	7,8
360	5,7	6,0	5,1	6,7	0,0	7,6

Figura 1 - Viabilidade da amostra Conn-F de *M. gallisepticum* conservada na forma liofilizada, com e sem crioprotetor e em diferentes volumes, e na forma congelada.

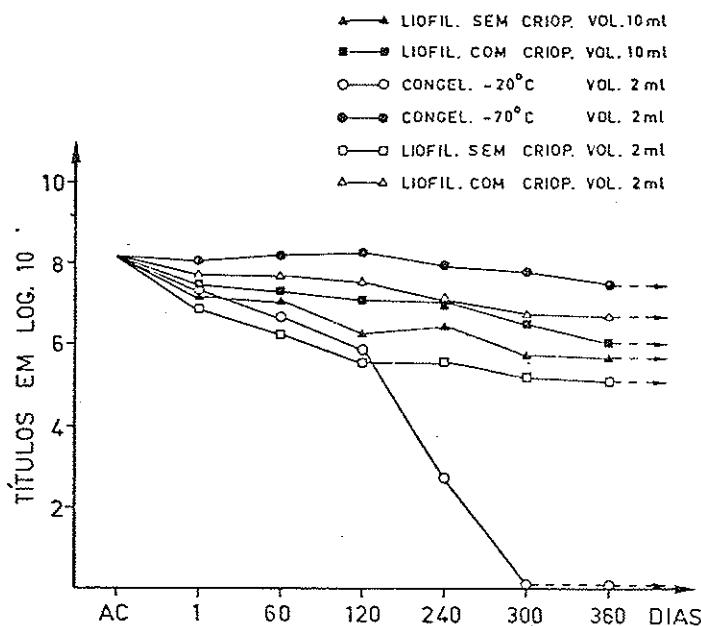
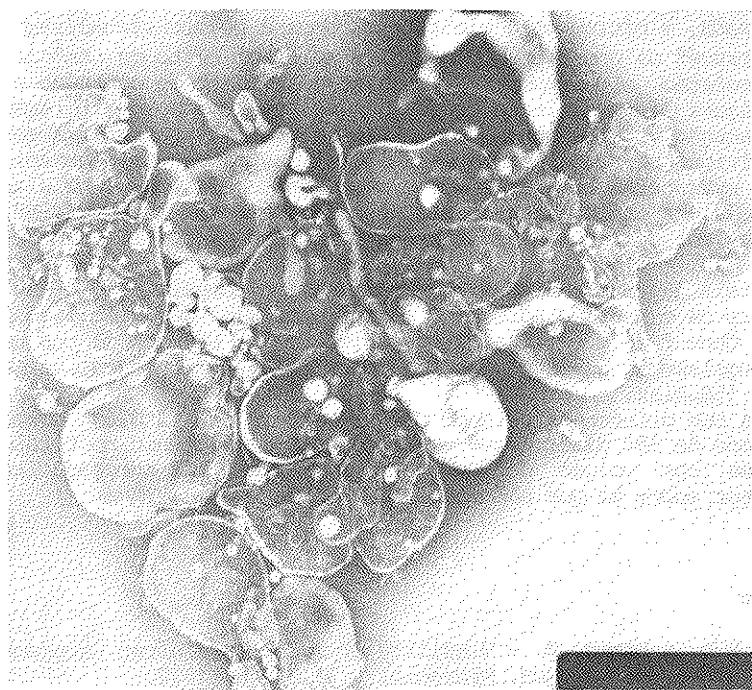


Figura 2 - Cultura fresca A = 64.224X



Figura 3 - Cultura liofilizada A = 33.858X.



Discussão

O título infectante protetor da amostra Conn-F de *M. gallisepticum* tem sido proposto como sendo de 10^5 UFC por ml (15). No presente estudo a cultura fresca antes dos processos de congelação e liofilização apresentou $1,3 \times 10^8$ UFC por ml.

O processo de liofilização provocou em média, uma queda dos títulos de $1 \log_{10}$, exceto o realizado em volume de 2ml sem o crioprotetor que decresceu $2 \log_{10}$. No período de 360 dias, duração do experimento, os títulos das culturas baixaram 1,4 e 2,4 logs. $_{10}$, quando foram liofilizados sem e com crioprotetor, respectivamente. Aparentemente, a adição do leite em pó desnatado como crioprotetor não proporcionou significativa estabilidade na manutenção dos títulos na forma liofilizada.

Esses resultados discordam com os de outros autores (20, 22) os quais, utilizando sacarose, glicose, DMSO e leite desnatado como crioprotetores na liofilização de diferentes microorganismos constataram boa vantagem na manutenção dos títulos. Entretanto, mais recentemente outros autores (14, 19) utilizando as mesmas substâncias crioprotetoras na liofilização de *Mycoplasma* não verificaram esta vantagem, apoiando os resultados do presente trabalho. Deste modo, parece ser necessário tratar o processo de liofilização para este grupo de microorganismos de maneira diferenciada, tendo em consideração principalmente suas características ultraestruturais como a ausência de parede celular.

Na conservação da amostra Conn-F de *M. gallisepticum* por congelação, os resultados mostraram que quando a cultura foi estocada a -20°C no volume de 2ml sem crioprotetor, perdeu $1 \log_{10}$ do seu título no processo de congelação e, mais $1 \log_{10}$ no período de 90 dias. A partir de 180 dias, o título caiu bruscamente, tornando-se inviável aos 200 dias de estocagem (Figura 1). Por sua vez, o congelação realizado a -70°C no mesmo volume e também sem o crioprotetor, o título permaneceu praticamente estável pelo período de 360 dias, perdendo apenas $0,5 \log_{10}$ em relação a cultura original (Tabela 1). Estes resultados são corroborados por outros autores (9, 14).

Embora o título da cultura da amostra Conn-F tivesse se mantido acima de 10^5 UFC por ml, na forma liofilizada, a microscopia eletrônica, onde a melhor visualização das células, foi obtida através da contrastação negativa pelo Molibdato de Amônia, mostrou que ocorreu rarefação citoplasmática com extravazamento do conteúdo em muitos microorganismos (Figura 3). Na cultura fresca não se observou esta alteração (Figura 2). Esta contrastação está de acordo com a literatura (18) que afirma ser os processos físicos envolvidos no congelamento e/ou liofilização os responsáveis pela injúria, lesando as estruturas celulares dos microorganismos. A morte celular durante estes processos pode ser atribuída a recristalização de gelo intracelular, prolongadas exposições a solutos concentrados extra e intracelulares e, soluções residuais não congeladas.

Os resultados experimentais deste trabalho demonstraram que o congelamento à -70°C foi o melhor método entre os experimentados para manter o título de viabilidade da cultura da amostra Conn-F de *M. gallisepticum* acima de 10^5 UFC por ml por um período de 360 dias. O congelamento à -20°C preservou o título da cultura acima desse nível no período de 150 dias.

A liofilização realizada com diferentes volumes também manteve os títulos acima de 10^5 UFC por ml no período de 360 dias. Houve uma tendência de declínio no título das amostras liofilizadas com volume de 10ml sobre as de 2ml, bem como aquelas processadas com crioprotetor sobre as que não continham o preservante.

Referências Bibliográficas

1. Addley, J.P.; Taylor, R.D. & Dimic, M. - Viability of *Mycoplasma* after storage in frozen or lyophilized states. *J. Med. Microbiol.*, 3:137-46, 1970.
2. Branton, S.L. & Deaton, J.W. - Egg production, egg weight eggshell strength, and mortality in three strains of commercial layers vaccinated with F strain *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.*, 29:832-7, 1985.

3. Carpenter, T.E.; Malliseon, E.T.; Miller, K.F.; Gentry, R.F. & Schwartz, L.D. - Vaccination with strain *Mycoplasma gallisepticum* to reduce production losses in layer chickens. *Avian Dis.*, 25:404-9, 1981.
4. Conrad, R.D. - Lyophilization of avian pleuropneumonia - like organism. *Avian Dis.*, 2:132-8, 1958.
5. Cummings, T.S. & Kleven, S.H. - Evaluation of protection against *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens vaccinated with the F strain of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.*, 30:169-71, 1986.
6. Frey, M.C.; Hanson, R.P. & Anderson, D.P. - A medium for the isolation of avian mycoplasma. *Am. J. Vet. Res.*, 29:2163-71, 1968.
7. Glisson, J.R. & Kleven, S.H. *Mycoplasma gallisepticum* vaccination: Effects on egg transmission and egg production. *Avian Dis.*, 28:406-15, 1984.
8. Gray, D.F. & Turner, A.W. - Viability and immunizing potency of freezedried bovine contagious pleuropneumonia culture vaccine. *J. Comp. Pathol. Therap.*, 64:116-26, 1954.
9. Hayflick, L. & Stineliring, W.R. - Intracellular growth of pleuropneumonia-like organisms in tissue culture and "in ovo". *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 79:433-49, 1960.
10. Karaca, K. & Lam, K.M. - Effect of temperature - sensitive *Mycoplasma gallisepticum* vaccine preparations and routes of inoculation on resistance of white leghorns to challenge. *Avian Dis.*, 130:772-5, 1986.
11. Kleven, S.H. - Summary of laboratory studies on the F strain of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.*, 27:337-8, 1983.
12. Kleven, S.H. - Stability of the F strain of *Mycoplasma gallisepticum* in various diluents at 4, 22 and 37°C. *Avian Dis.*, 29:1266-8, 1985.
13. Levishon, S. & Kleven, S.H. - Vaccination of chickens with non-pathogenic *Mycoplasma gallisepticum* as a means for displacement of pathogenic strains. *Isr. J. Med. Sci.*, 17:669-73, 1981.
14. Lin, M.R. & Kleven, S.H. - Viability of the strain of *Mycoplasma gallisepticum* after storage in the frozen or lyophilized state. *Avian Dis.*, 26:426-30, 1982.
15. Lin, M.J. & Kleven, S.H. - Evaluation the *Mycoplasma galliseptium* as vaccines in young chickens. *Avian Dis.*, 28:88-89, 1984a.
16. Lin, M.R. & Kleven, S.H. - Correlation of titter preservation method storage of *Mycoplasma gallisepticum* FJ strain and the immune response in chickens. *Avian Dis.*, 28:273-7, 1984b.
17. Lorenzo, L.L. - Contribuição ao estudo de *Mycoplasma* como componente da microbiota normal da cavidade oral humana. São Paulo, USP, 72p., 1985. Tese de Doutorado.
18. Mazur, P. - Cryobiology: The freezing of biological systems. *Science*, 168:939-49, 1970.
19. Norman, M.C.; Franch, E.B. & Choate, R.V. - Preservation of *Mycoplasma* strains by freezing in liquid nitrogen and by lyophilization with sucrose. *Appl. Microbiol.*, 20:69-72, 1970.
20. Raccach, M.; Rottem, S. & Razin, S. - Survival of frozen *Mycoplasmas*. *Appl. Microbiol.*, 30:167-71, 1975.
21. Rossini, A.J. - Contribuição ao estudo da micoplasmoses bovina: Isolamento de *Mycoplasma bovis* em bezerros acometidos de pneumonia. São Paulo, USP, 97p., 1978. Tese de Mestrado.
22. Silva, P. - Liofilização. Bahia, Universidade da Bahia, 203p., 1961. Tese para Catedra.
23. Yamamoto, R. - Methods for the control of Avian Mycoplasmosis. In: Simpósio Catarinense de sanidade avícola. 1. Concórdia-SC. 133-44p., 1985. Simpósio do Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves, Chapecó-SC, 1985. Anais... Concórdia-SC, 1985. 133-44p.
24. Yamamoto, R.; Bigland, C.H. & Ortmayer, H.B. - Characteristics of *Mycoplasma meleagridis* isolated from turkey. *J. Bacteriol.*, 90:47-9, 1965.
25. Yoder, Jr. H.W. - Avian Mycoplasmosis. In: HOFSTAD, M.S. ed. Diseases of Poultry. 8.ed. Ames. The Iowa States Univ. Press., 187-220p., 1984.

**SELEÇÃO DE LEVEDURAS A PARTIR DE CALDO DE SORGO SACARINO
(SORGHUM BICOLOR, L.) EM FERMENTAÇÃO NATURAL**

Marney Pascoli Cereda

Ana Teresa B. Faraco Antonangelo
Maria Isabel F. Vasconcelos Gomes
& José Santo Goldoni

Recebido para publicação em 16/09/87

Deptº de Tecnologia dos Produtos Agropecuários
Faculdade de Ciências Agronômicas UNESP
Caixa Postal 237
18600 Botucatu SP, Brasil

Resumo

Isolou-se leveduras de caldo de sorgo em fermentação natural, com o objetivo de se obter microrganismos mais adequados a essa matéria prima. Foram obtidas doze amostras de caldo da variedade Brandes. Cada amostra foi acondicionada assepticamente em frascos esterilizados, tamponados com algodão e incubados a 30°C. O caldo não sofreu correções. A fermentação das amostras foi acompanhada diariamente através de análises de Brix, pH e isolamento de leveduras em meio de ágar malte. Considerou-se como final da fermentação a estabilidade do Brix e do pH. Das doze amostras de sorgo fermentadas, foram isoladas 65 amostras de leveduras de tipos morfológicos diferentes, que foram avaliadas quanto à habilidade de fermentar caldo de sorgo (pH 3,0, Brix 14,0) e de hidrolizar amido. Das 65 leveduras, 25 apresentaram bom desempenho na fermentação, e dentre essas duas conseguiram também hidrolizar amido. Duas outras foram selecionadas apenas pela capacidade de hidrolizar amido, aventando-se a possibilidade de serem utilizadas em fermentação mistas com o objetivo de se aumentar o rendimento. As 27 amostras de leveduras selecionadas foram identificadas e distribuiram-se em sete gêneros: *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Torulaspora*.

Summary

Selected yeasts from sorghum juices (*Sorghum bicolor, L.*) in natural fermentations

Yeasts from natural fermentation of sweet sorghum juice were isolated in order to identify microorganisms well adapted to this raw material. Twelve samples were obtained from sweet sorghum CV Brandes and put into sterilized flasks under aseptical conditions. The flasks were closed with cotton and incubated at 30°C. The pH and Brix of the juice were not corrected. The fermentation was monitored daily, when Brix and pH were determined and yeasts were isolated in malt agar. The fermentation was considered over when Brix and pH values were stabilized. From the 12 samples, 65 yeasts were selected and evaluated for their ability to ferment sterile sweet sorghum juice (pH 3,0, Brix 14,0) and starch hydroly-

zation. Among the 65 yeasts, 25 showed a good performance in fermentation and two of them were also able to hydrolyse starch. Other two yeasts were selected for their amylolytic capacity because they can be used in mixed fermentation in order to reach higher yields. The 27 samples of yeasts selected were classified in 7 genera as follows: *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Torulaspora*.

Introdução

Segundo Hawke & Col. (4), o sorgo sacarino foi reconhecido na Austrália como cultura energética para produção em grande escala. Trata-se da espécie *Sorghum bicolor*, L. Pertecendo à família poacea, apresenta características comuns à cana-de-açúcar. Do colmo extrai-se caldo com elevado teor de açúcares redutores (cerca de 17%), de composição semelhante ao da cana, diferindo entretanto em alguns aspectos: é facilmente deteriorável, apresenta tempo de fermentação mais longo, presença de ácido aconítico e maior teor de amido (3, 9). Tanto o amido como o ácido aconítico podem ser removidos do caldo por processos relatados na literatura (2, 8), mas representam sempre aumento de custo na produção do álcool. A literatura cita diversos trabalhos que relatam a fermentação alcoólica do caldo de sorgo sacarino, algumas das quais procuram explicar as razões para os problemas apontados.

Teixeira & Col. (12) constataram teores elevados de açúcares redutores no caldo do sorgo, esclarecendo, entretanto, que não constituem problema para a fermentação alcoólica, embora resultem em baixo rendimento para a fabricação de açúcar.

Araujo & Col. (1) relatam ensaios de fermentação do caldo de sorgo, acompanhados por 72 horas. Passadas as primeiras 48 horas, quase não houve fermentação adicional, sendo que nas primeiras 24 horas o número de células do fermento empregado aumentou em cerca de dez vezes, estabilizando-se a seguir. Os autores lembram que a velocidade da fermentação depende diretamente do número de células viáveis de leveduras.

Germeck & Col. (3) citam que em fermentações realizadas em destilarias observa-se rendimentos mais baixos para caldo de sorgo em relação aos de caldo-de-cana, mas que em fermentações realizadas a nível de laboratório as diferenças são menores. Nessas condições entretanto o tempo de fermentação médio obtido para caldo de sorgo (19 horas, 35 minutos) foi bem maior que o obtido para caldo-de-cana.

A maioria dos trabalhos consultados não cita qual a levedura utilizada ou então emprega *Saccharomyces cerevisiae*, agente clássico de fermentação alcoólica. Polack & Day (7) afirmam entretanto, que cabe a cada pesquisador a escolha da levedura para a fermentação do caldo do sorgo e que testes preliminares indicam que as amostras usadas na fermentação do melaço não são muito eficazes quando usadas para caldo de sorgo.

Procurando selecionar um agente mais eficiente, Hawke & Col. (4) avaliaram 33 leveduras procedentes de coleções de culturas de diversos países. Os critérios empregados na seleção foram a eficiência e duração do processo fermentativo, tolerância a temperaturas elevadas, a altas concentrações de açúcar e álcool e habilidade de hidrolizar amido e de floacular. Os mesmos autores lembram que dois procedimentos podem ser empregados para se selecionar leveduras para a fermentação de caldo de sorgo. No primeiro pode se obter leveduras com características desejáveis, a partir da superfície de equipamentos, como as moendas. O segundo seria a seleção de leveduras de cervejaria ou de destilaria, a partir de coleções já existentes em instituições.

No presente trabalho propõem-se uma terceira forma de seleção a partir da fermentação natural, baseando-se no fato de que estas leveduras estariam mais adaptadas à matéria prima, do que as obtidas de coleções de culturas ou do que as que ocorrem na superfície de equipamentos. Por isso as leveduras isoladas foram identificadas e avaliadas quanto a sua capacidade de fermentar e em sua habilidade em hidrolizar amido.

Material e Métodos

Colheu-se manualmente doze amostras de colmos de sorgo sacarino (*S. bicolor*, L.), da variedade Brandes, cultivada na Fazenda Experimental Lageado de Botucatu, S.P. O caldo obtido em cada uma dessas amostras, consistiu em matéria prima das fermentações. Cada amostra foi acondicionada em frasco erlenmeyer de 1000ml de capacidade previamente esterilizado. À cada frasco foi acondicionado, assépticamente, 500ml de caldo de sorgo, sem correção. Os frascos foram incubados a 30°C, a fermentação acompanhada diariamente, através de análise de Brix, pH e amostragem para isolamento de leveduras. Adotou-se como ponto final da fermentação a estabilização do Brix e pH.

O isolamento de leveduras foi feito por semeadura em placas contendo ágar malte, incubação a 30°C por 72 horas. À partir das colonias isoladas foi feita análise diferencial macroscópica, selecionando-se as colonias quanto à forma, aspecto, cor e tamanho.

Os tipos morfológicamente representativos foram repicados em caldo de purificação (6), incubação a 30°C por 72 horas. Realizou-se nova semeadura em placas contendo ágar malte, com a finalidade de se confirmar a pureza das colonias. As mesmas foram repicadas e estocadas em tubos inclinados com o mesmo meio de cultivo.

Para avaliação da atividade fermentativa das leveduras isoladas, o caldo de sorgo foi diluído a Brix 14, ajustado a pH 3,0 com H₂SO₄ e distribuído em tubos de ensaio contendo tubos de Duhrum. Os tubos foram inoculados com cultura pura e incubados a 30°C por 72 horas. A velocidade de fermentação foi avaliada pela formação de gás no interior dos tubos de Duhrum, considerando-se muito rápidas (+r) as que o faziam em menos de 24 h; rápidas (r) entre 24 e 48h e lentas com mais de 48 horas.

A habilidade de hidrolizar amido foi avaliada semeando-se as amostras de leveduras em placas de ágar malte contendo 0,02% de amido (p/v). Amilólise foi constatada pela formação de halos e contraste com lugol.

As leveduras que demonstraram bom desempenho na fermentação ou habilidade de hidrolizar amido, foram identificadas segundo métodos preconizados por Kreger-van Rij (1984).

Figura 1 - Representação gráfica de fermentação natural das amostras 1, 2 e 3 de caldo de sorgo sacarino.

Símbolos: — = Brix; --- = pH; ● = Pontos de isolamento de leveduras.

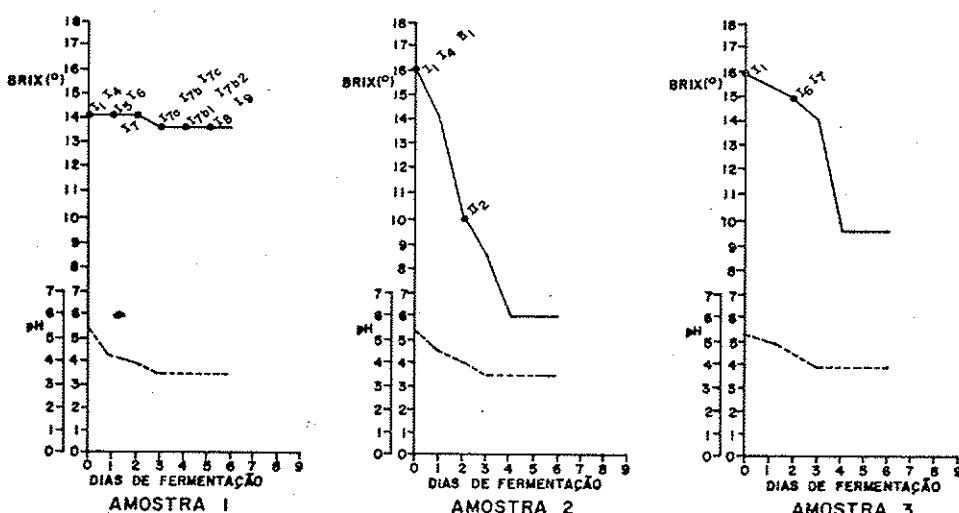


Figura 2 - Representação gráfica de fermentação natural das amostras 4, 5 e 6 de caldo de sorgo sacarino.

Símbolos: — = Brix; --- pH; ● = Pontos de isolamento de leveduras.

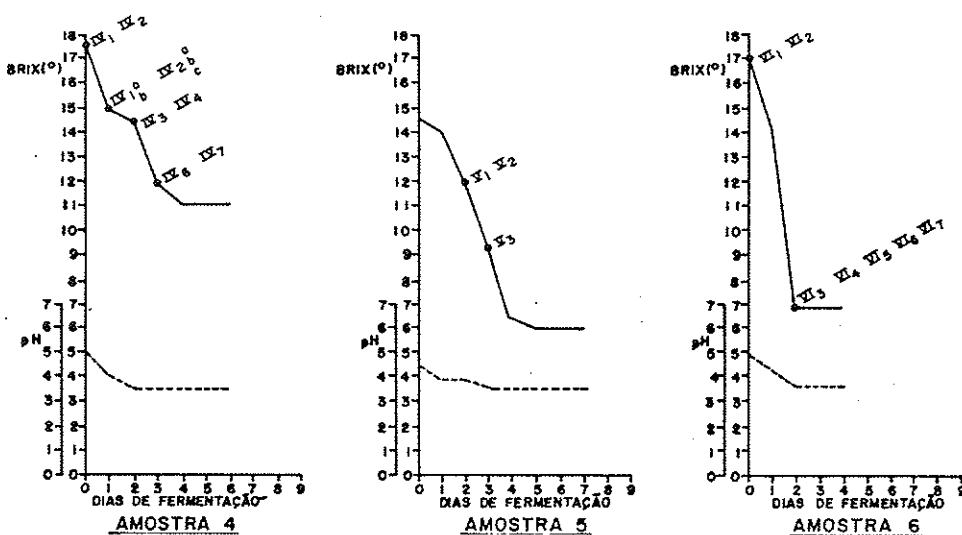
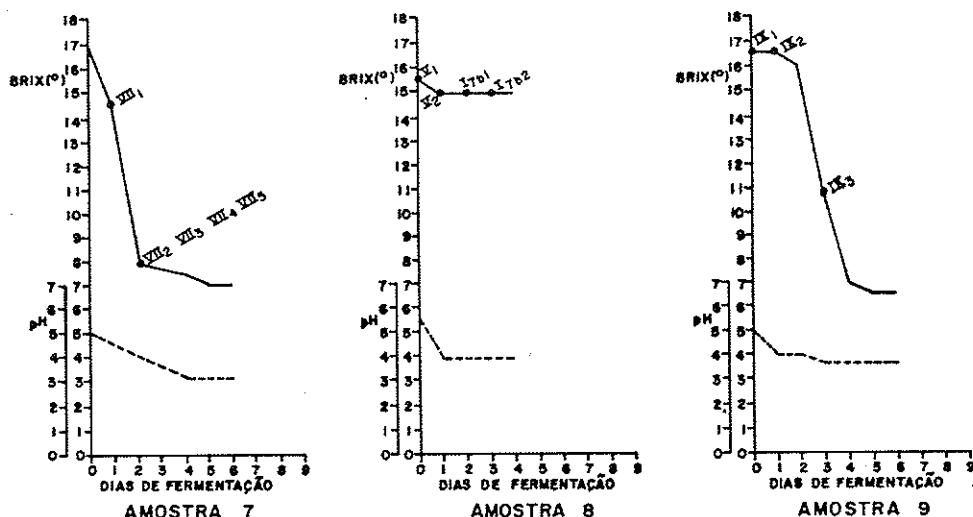


Figura 3 - Representação gráfica de fermentação natural das amostras 7, 8 e 9 de caldo de sorgo sacarino.

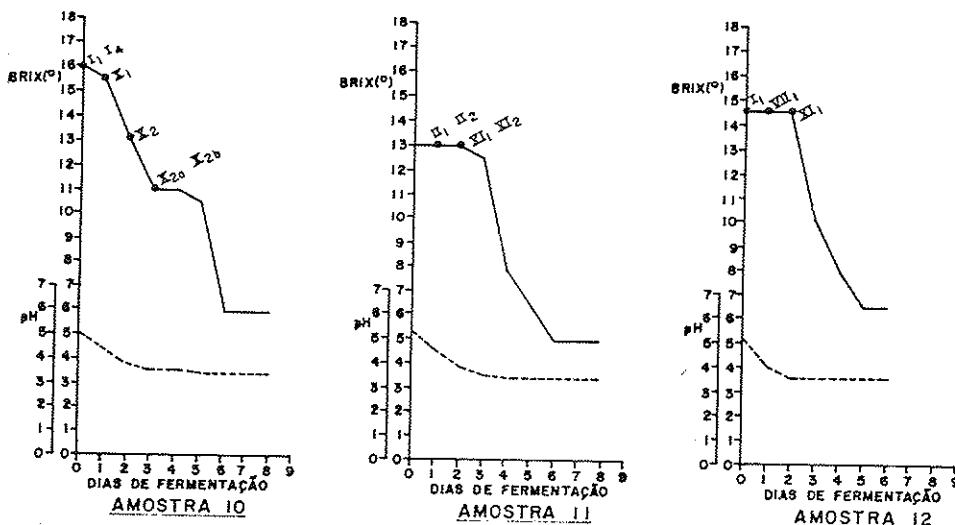
Símbolos: — = Brix; --- pH; ● = Pontos de isolamento de leveduras.



Resultados e Discussão

As doze amostras de caldo de sorgo submetidas a fermentação natural estão representadas nos gráficos de 1 a 12 nas Figuras 1, 2, 3 e 4. As leveduras isoladas e selecionadas estão representadas por siglas que assinalam o momento em que foram detectadas. Constam ainda dos gráficos os valores obtidos para Brix e pH.

Figura 4 - Representação gráfica de fermentação natural das amostras 10, 11 e 12 de caldo de sorgo sacarino.
 Símbolos: — = Brix; --- pH; ● = Pontos de isolamento de leveduras.



As fermentações apresentaram o perfil usual, caracterizado pela queda do Brix e aumento de acidez. Expresso em valores médios, o Brix inicial foi de 15,5°, caindo para 8,5° ao final da fermentação. Observa-se entretanto nos gráficos que compõem as Figuras de 1 a 4, que a velocidade de consumo dos açúcares, representada pela queda do Brix, não foi a mesma para todas as amostras em fermentação, mesmo em casos em que ocorreu seleção de grande número de leveduras. Assim, a amostra 1 (Figura 1) e a 8 (Figura 3) representaram no final da fermentação, declínio de apenas 0,5°B. A fermentação da amostra 1 entretanto permitiu o isolamento de 12 amostras de leveduras de tipo morfológico diferente, enquanto que a amostra 8, de apenas 4. Por outro lado ocorreram fermentações como o da amostra 2 (Figura 1), 6 (Figura 2), 7 e 9 (Figura 3) e 10 (Figura 4), onde a queda do Brix chegou a 10 unidades. Em algumas dessas o tempo de fermentação, medido pela estabilidade do Brix e pH, foi curto, em se tratando de caldo de sorgo. Por outro lado, nessas fermentações mais rápidas, muitas vezes as leveduras não foram as que exibiram as melhores características em avaliação isolada, apontando para fatores outros como sinergismo, número de células viáveis, e adaptação ao meio. Em geral a queda do Brix foi mais rápida a partir de pH 4,0, normalmente apontado na literatura (10) como limite do crescimento de leveduras.

O Brix residual manteve-se alto nas 12 amostras fermentadas (valor médio de 8,5°B), fato esse concordante com o relatado por Silva & Col. (11), como sendo comum em fermentação de caldo de sorgo, onde, segundo os mesmos autores, não se obteve Brix final abaixo de 5,0°.

As amostras apresentaram tempo de fermentação variável, algumas curtas como a 6 (Figura 2) com pouco mais de 24 horas, outras mais longas, com 6 a 8 dias de duração. Considerando-se o critério adotado, o tempo médio de fermentação obtido (158 horas) foi mais longo do que o relatado por Germeck & Col. (13), que obtiveram 19 horas e 35 minutos para processos fermentativos conduzidos em laboratório, porém com inoculação de fermento.

Araujo & Col. (1) relatam que não foi observada fermentação subsequente às primeiras 24 horas, em que a intensa multiplicação celular acarretou fermentação vigorosa. Os ensaios foram realizados com inoculação de fermento. No presente trabalho, ao contrário do relatado por estes autores, nas primeiras 24 horas a

fermentação foi sempre pouco intensa, e em algumas amostras a fermentação vigorosa ocorreu somente após 72 horas da incubação; outras amostras não chegaram a apresentar essa fase, mesmo sendo passadas 192 horas, sendo justamente aquelas, como as 1 e 8 (Figuras 1 e 3), que apresentaram Brix residual elevado.

Relacionado-se Brix residual com o tempo de fermentação, observa-se que, algumas vezes, fermentações mais longas resultaram em maior eficiência no consumo dos açúcares do que fermentações mais curtas, provavelmente por significarem uma "lag fase".

Nos processos fermentativos isolou-se 65 amostras de leveduras, que foram posteriormente submetidas a avaliação quanto a rapidez com que fermentavam o caldo de sorgo padronizado. Apenas aquelas que se apresentavam como muito rápidas e rápidas quanto a fermentação, foram selecionadas. Ressalta-se que as leveduras com melhor desempenho fermentativo foram isoladas principalmente da amostra 4 (Figura 2).

Outro critério adotado foi a capacidade amilolítica, tendo sido isoladas quatro amostras de leveduras, duas das quais apresentando também metabolismo fermentativo. Desses, três foram isoladas da amostra 1 de caldo.

As leveduras restantes, com fermentação lenta ou nula foram isoladas perto do ponto final das fermentações.

Na Tabela 1 encontram-se relacionadas as 27 amostras de leveduras selecionadas e identificadas, com as siglas que permitem sua localização nos gráficos das Figuras de 1 a 4. Observa-se que, pelos critérios adotados, a fermentação natural de caldo de sorgo permitiu selecionar 40% dos microrganismos isolados.

As 27 amostras de leveduras foram distribuídas em sete gêneros, com predominância de *Candida*, *Saccharomyces* e *Hansenula*.

Dos gêneros e espécies encontradas nas dez fermentações naturais de caldo de sorgo sacarino, *Saccharomyces* spp e *Zygosaccharomyces* spp podem ser considerados como alcoógenicas. Os demais gêneros podem produzir álcool, mas geralmente caracterizam-se por produzir produtos metabólicos tais como ácidos orgânicos e ésteres. Assim é, que a porcentagem de leveduras potencialmente aproveitáveis cai para cerca de 20%, considerando-se as amilolíticas. Salienta-se todavia que o resultado não deve ser considerado desanimador antes da avaliação destes microrganismos em fermentações alcóolicas controladas. Entre esses 20% considerados, estão três amostras de *Saccharomyces cerevisiae*, espécie citada por Hawke & Col. (4) como *S. chevalieri*, de bom desempenho fermentativo, resistente a temperaturas elevadas (até 39°C), osmofílica, floculante e com bom rendimento alcóolico.

Outra levedura que merece atenção, por sua ação amilolítica, é *Pichia farinosa*, excluindo-se sua atuação como fermentativa e que poderá vir a ser avaliada em

Tabela 1 - Leveduras isoladas de caldo de sorgo em fermentação natural e selecionadas por seu desempenho quanto a fermentação e hidrólise de amido.

Símbolos: * = Conforme os gráficos das Figuras 1 a 4; ** = Conforme Kreger-vanrij (1984); r = Rápida; +r = Muito rápida; + = Positiva; - = Negativa.

Sigla*	Levedura**	Fermentação	Hidrólise de amido
I 1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	r	-
I 4	<i>Pichia farinosa</i>	r	-
I 5	<i>Candida apis</i>	-	+
I 6	<i>Pichia farinosa</i>	r	+
I 7a	<i>Candida sp</i> ¹	r	-
I 7b2	<i>Zygosaccharomyces fermentati</i>	+r	-
I 7c	<i>Candida sp</i> ²	r	-
I 9	<i>Candida famata</i>	r	+
II 2	<i>Hansenula polymorpha</i>	r	-
IV 1a	<i>Hansenula anomala</i>	r	-
IV 1b	<i>Candida sp</i> ³	+r	-
IV 2b	<i>Candida haemulonii</i>	r	-
IV 2c	<i>Hansenula bimundalis</i>	r	-
IV 3	<i>Candida silvicolta</i>	+r	-
IV 6	<i>Candida kefyr</i>	r	-
IV 7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+r	-
V 3	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	+r	+
VI 1	<i>Candida stellata</i>	+r	-
VI 2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+r	-
VI 3	<i>Saccharomyces exigua</i>	+r	-
VI 4	<i>Debaromyces hansenii</i>	r	-
VI 7	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	r	-
VII 1	<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	+r	-
IX 1	<i>Hansenula polymorpha</i>	r	-
X 1	<i>Saccharomyces exigua</i>	+r	-
X 2b	<i>Pichia etchellsii</i>	r	-
XI 2	<i>Candida stellata</i>	+r	-

fermentações mistas.

Todas essas leveduras isoladas comprovaram sua adaptação ao caldo de sorgo, através da fermentação em tubos.

Pelos resultados obtidos conclui-se que a fermentação natural revelou-se boa fonte para a obtenção de leveduras, embora para caldo de mesma variedade os resultados sejam bastante distintos. Das 65 amostras de leveduras isoladas, 42% apresentaram bom desempenho nas características avaliadas e 20% com potencial para uso em fermentações alcoólicas.

Agradecimentos

Ao Engº Agrº Ciro Antonio Rosolém, pela colaboração prestada na obtenção dos colmos de sorgo da variedade Brandes.

Referências Bibliográficas

1. Araujo, N.Q.; Castro, H.F. & Visconti, A.L.S. Sorgo - Matéria prima renovável para produção de etanol na escala energética nacional. Brasil Açucareiro, 90(2):23-41, 1977.
2. Chen, J.C.P. - Can sugar be made out of sweet sorghum? The Sugar Journal, 44(6):18, 1981.
3. Germeck, H.A.; Sturion, A.C. & Sanguinio, A. - Ensaios com sorgo visando a produção de etanol. Piracicaba - SP - Conger S.A. Equipamentos e Processos - Departamento Técnico, 1981. 34p. (mimeo).
4. Hawke, S.J.; Panter, C.; Hayes, M. & Nguyen, M.H. - Selection of yeasts for fermentation of sweet sorghum juice to alcohol. Food Technology in Australia, 35(3):123-125, 1983.
5. Kreger-van Rij, N.J.W. - The Yeasts a taxonomic study. Elsevier, Amsterdam, 3^a ed., 1082p. 1984.
6. Neder, R.N. - Introdução à Microbiologia, Piracicaba - SP, 1968. Edit. Instituto Zimotécnico "Prof. Jayme Rocha de Almeida". ESALQ-USP. 118p. (mimeo) s/d.
7. Polak, J.A. & Day, D.F. - Ethanol from sweet sorghum. The Sugar Journal, 43(3):25-7, 1980.
8. Rolz, C. - Conceptos sobre la biotransformación de azúcares a etanol combustible. Interciencia, 7(3):153-62, 1982.
9. Serra, G.E. - Algumas considerações sobre as possibilidades de matérias-primas para a produção de álcool etílico. Brasil Açucareiro, 87(3):4-51, 1976.
10. Sharf, J.M. - Exame microbiológico de alimentos. São Paulo, Polígono, 257p. 1972.
11. Silva, J.G.; Serra, G.E.; Moreira, J.R. & Gonçalves, J.C. - Balanço energético cultural da produção de álcool etílico de cana-de-açúcar, mandioca e sorgo sacarino - fase agrícola e industrial. Brasil Açucareiro, 88(6):8-21, 1976.
12. Teixeira, C.G.; Purchio, M.J.; Menezes, T.J.B.; Sales, A.M.; Lamo, P. & Arakaki, T. - Produção de álcool etílico de sorgo sacarino. In: Anais do I Simpósio Brasileiro do Sorgo, p.99-104, Brasília, março de 1977.

CITOLOGIA DAS ESTRUTURAS LEVEDURIFORMES DE BEAUVÉRIA BASSIANA EM MEIOS DE CULTURA LÍQUIDOS E NA HEMOLINFA DE SPODOPTERA FRUGIPERDA

Elza Áurea de Luna-Alves Lima

EMBRAPA/CENARGEN e BIOTEC e

Deptº de Micologia/UFPE

Recebido para publicação em 17/06/88

& Myrian Silvana Tigano

EMBRAPA/CENARGEN e BIOTEC

Laboratório de Controle Biológico

Caixa Postal 102372

70770 BRASÍLIA DF, BRASIL

Resumo

A linhagem selvagem CG₁ de *Beauveria bassiana* foi estudada em quatro meios de cultura líquidos diferentes, sob agitação contínua. Em meios de cultura submersa, este fungo produz estruturas vegetativas que funcionam como unidade de reprodução e que são denominadas de blastosporos, corpos hifais ou estruturas leveduriformes. Estudos citológicos indicam que estas estruturas se originam a partir da germinação de conídios nas primeiras 16 horas após a inoculação, ou da diferenciação hifal, em cultura de mais de 72 horas. As mesmas variam de forma, tamanho e condição nuclear durante as observações. A frequência varia em todos os meios. Foi verificada a presença das estruturas leveduriformes em larvas de *Spodoptera frugiperda* quando infectada por conídios desta linhagem.

Summary

Cytology of the yeast-like structures of Beauveria bassiana in liquid media and in the hemolymph of Spodoptera frugiperda

The wild strain of *Beauveria bassiana* CG₁, was studied in four different liquid culture media under continuous agitation. In submerge culture media this fungus produce vegetative structures which functions as reproductive units that are named blastospores, hyphal bodies or yeast-like structures. Cytological studies indicated that they originate from conidia germination at the first sixteen hours after inoculation, or from hyphal differentiation in more than 72 hours. These structures varied in form, size and nuclear condition during the observation. The frequency of the structures varied in all media. It was verified the presence of yeast-like structures in the hemolymph of *Spodoptera frugiperda* larvae, while infected by conidia of this strain.

Introdução

Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. é um Deuteromycotina entomopatogênico que causa epizootia em populações de diversas espécies de insetos responsáveis por danos às plantações de soja, banana, caupi, cacau e outros (2). A patogenicidade desse fungo é comprovada contra *Diatraea saccharalis*, *Nezara viridula* (2, 34), *Castnia licus* (23), *Cosmopolites sordidus* (24), *Deois flavopicta* (5) e *Atta sexdens rubropilosa* (3).

Esse fungo, assim como outros entomopatogênicos, produzem estruturas leveduriformes em cultura submersa e na hemolinfa do inseto hospedeiro. Nas espécies dos gêneros *Beauveria*, *Metarrhizium*, *Sorosporella*, *Tolyphocladium* e *Verticillium*, essas estruturas são frequentemente chamadas de blastosporos (11, 12, 13, 26), enquanto nas espécies dos gêneros *Conidiobolus*, *Culicinomyces*, *Entomophthora* e *Nomuraea* são denominadas de corpos hifais (10, 16, 17, 19). Embora essas estruturas tenham sido relatadas, a sua função não está totalmente esclarecida, como também a sua atuação na hemolinfa, antes da morte do inseto. Elas têm relação com o modo de infestação e com a sua produção, em virtude de facilitar a disseminação dentro do inseto (12). São produzidas com facilidade em cultura submersa, contêm mais nutrientes do que os conídios por isso têm sido sugeridas para aplicação em massa do fungo como agente de controle biológico (9).

Para algumas espécies de fungos entomopatogênicos as estruturas leveduriformes são citadas como propágulos infecciosos em insetos, assim como os conídios (1, 9, 30).

Estudos sobre a produção dessas estruturas têm sido realizados em diversas espécies de fungos entomopatogênicos, principalmente no que se refere à relação com os componentes do meio de cultura (6, 7). No entanto, estudos relativos à citologia desse fungo têm sido negligenciados.

O presente trabalho tem por objetivo investigar, a origem e a condição nuclear de estruturas leveduriformes, em *B. bassiana* em diferentes meios de cultura líquidos e na hemolinfa de lagartas de *Spodoptera frugiperda*.

Material e Métodos

Linhagem - A linhagem CG, de *B. bassiana* isolada de *Deois flavopicta*, obtida da coleção de cultura do CENARGEN E BIOTECNOLOGIA, está sendo conservada em três processos de preservação: nitrogênio líquido, água destilada e óleo mineral.

Meios de cultura - Meio mínimo líquido (MML): NaNO_3 6g, NaH_2PO_4 1,5g, ZnSO_4 0,01g, KCl 0,5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5g, FeSO_4 0,01g, glicose 10g. pH 6,5. Meio complexo líquido (MCL). As substâncias acima mencionadas foram acrescidas de caseína hidrolizada (Merck) 1,5g, solução de ácido nucleico hidrolizado 1ml e solução de vitaminas 1ml. pH 6,5. Meio Sabouraud (SAB): peptona 10g, dextrose 40g, ágar 15g. pH 6,5. Sabouraud líquido (SABL): SAB sem o ágar. Meio milhocina Adámek (1), (ML): Melhaço de milho (Refinações de Milho Brasil Ltda) 30ml, glicose 40g, extrato de levedura 40g, pH 8 corrigido com KOH. Todos os meios foram autoclavados a 121°C durante 20 minutos.

Solução de ácido nucleico de levedura hidrolizado - Solução a) ácido nucleico de levedura (Merck) 2g, dissolvidas em 15ml de NaOH 1N; solução b) ácido nucleico de levedura 2g, dissolvidas em 15ml de HCl 1N. Procedimento: As soluções a e b foram aquecidas em banho-maria durante 20 minutos e, em seguida misturadas. pH corrigido para 6,0. A mistura foi filtrada e o volume foi complementado para 40ml e estocada em frasco escuro, em refrigerador, sob clorofórmio.

Solução de vitaminas - Ácido nicotínico e riboflavina 100mg, ácido p-aminobenzólico 10mg, piridoxina e tiamina 50mg, biotina 0,2mg. As substâncias foram adicionados 100ml de água destilada autoclavada. A solução foi aquecida a 90°C, por 20 minutos, conservada em frasco escuro e guardada no refrigerador, sob clorofórmio.

Preparação de inóculos - Conídios de 7 dias, em SAB, foram suspensos em "Tween" 80 (0,1% v/v). 10ml dessa suspensão foram colocados em Erlenmeyer de 250ml, com 40ml de ML. Incubação a 25°C, em agitação contínua. As observações foram feitas em intervalos de tempo de 0, 12, 16, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas.

Inoculação no inseto - Lagartas do 3º estágio de desenvolvimento, este caracterizado segundo Parra (27), de *Spodoptera frugiperda* foram inoculadas, na parte ventral mediana, com 0,01ml, de uma suspensão de $1,8 \times 10^8$ conídios/ml. As lagartas foram colocadas em copinhos de plásticos, contendo dieta artificial, à base de feijão (27). Em períodos determinados que variaram de 0 a 72 horas, a sua hemolinfa foi coletada para observação da condição nuclear das estruturas leveduriformes, conforme técnica processada por Luna & Azevedo (21).

Coleta de hemolinfa - Foi feita in vivo, através da remoção de uma das falsas patas, de uma lagarta. Pelo orifício a hemolinfa foi colocada sobre uma lâmina albuminada, após secagem em fluxo laminar, foi procedida a coloração de HCl-Giemsa (22).

Observações citológicas - As preparações citológicas foram feitas a partir de culturas monospóricas (20), após crescimento em ML, MML, MCL e SABL. 0,1ml de uma suspensão de conídios, de cada cultura foi colocado sobre membrana de diálise, previamente embebida em albumina e procedida a coloração de HCl-Giemsa (21).

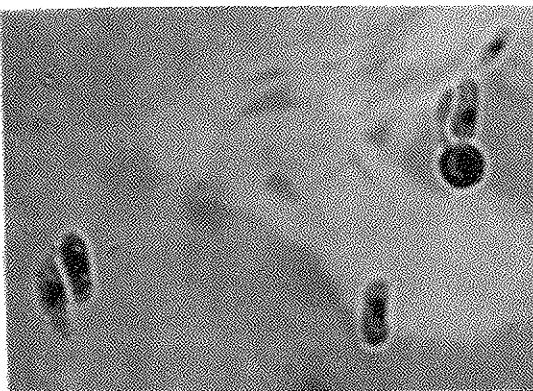
Microfotografias - Foram feitas em filme Kodak Panatomic X. 32 ASA, como o uso de fotomicroscópio Carl Zeiss e ampliadas em papel Kodabromide F₃.

Tabela 1 - Frequência de estruturas leveduriformes da linhagem CG₁ de *Beauveria bassiana* em quatro meios de cultura.

Símbolos: (-) = Significa raras estruturas e fase micelial exuberante.

Intervalo de tempo (horas)				
12	0	0	0	0
16	$1,0 \times 10^3$	0	0	0
24	$1,2 \times 10^4$	0	0	$3,0 \times 10^4$
36	$1,0 \times 10^5$	$1,3 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^3$
48	$1,4 \times 10^5$	$2,1 \times 10^4$	$1,5 \times 10^5$	$5,0 \times 10^3$
60	$3,7 \times 10^5$	$3,1 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$2,0 \times 10^6$
72	$5,0 \times 10^5$	-	$2,0 \times 10^5$	$2,0 \times 10^6$
84	$2,0 \times 10^6$	-	-	-
96	-	-	-	-

Figura 1 - Germinação de conídio originando estruturas leveduriformes. 16 horas, crescimento em ML. Coloração de HCl-Giemsa, sobre membrana de diálise. 1.200X.



Resultados

As primeiras evidências de formação de estruturas leveduriformes foram detectadas as 16 horas em ML, as 24 horas em SABL e as 36 em MCL e MML. A frequência das estruturas variou nos quatro meios empregados, conforme pode ser constatado na Tabela 1.

ML proporcionou a maior frequência destas estruturas e o MML a menor. O maior pico ocorreu as 72 horas, em ML.

As observações citológicas demonstraram que as estruturas se formaram em todos os meios empregados, a partir da germinação de conídios. A Figura 1 mostra um tubo germinativo que se fragmentou no ponto de inserção do conídio e deu origem a estrutura leveduriforme, uninucleada. Foi constatada a formação de estrutura, a

Figura 2 - Germinação de conídio, dando origem a estrutura leveduriforme. Ponto de fragmentação do conídio (setas). 24 horas, crescimento em ML. Sem coloração. 1.200X.

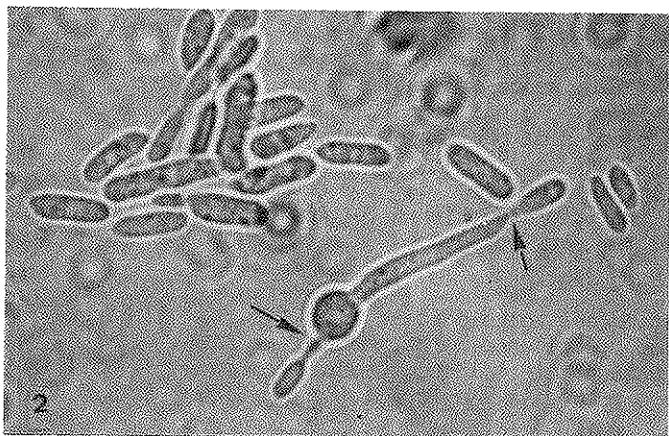
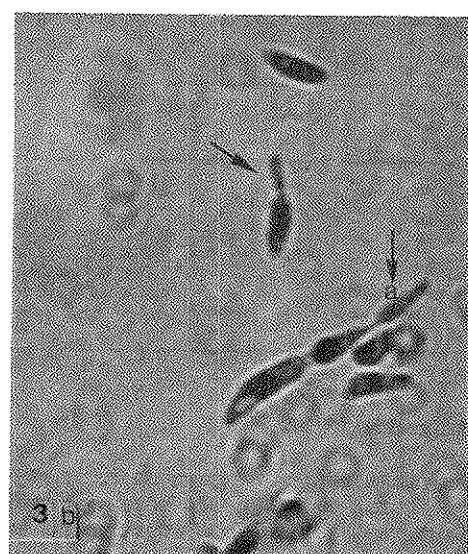
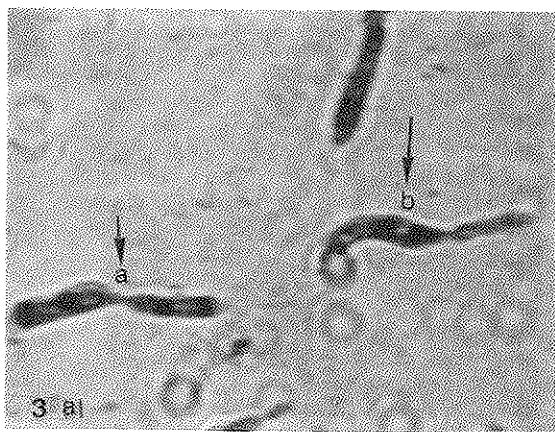
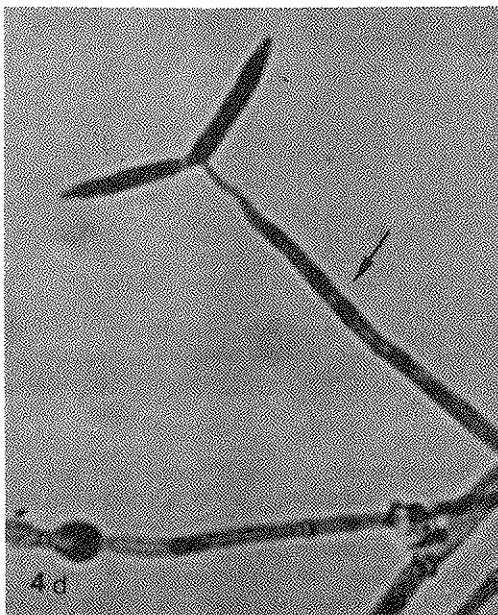
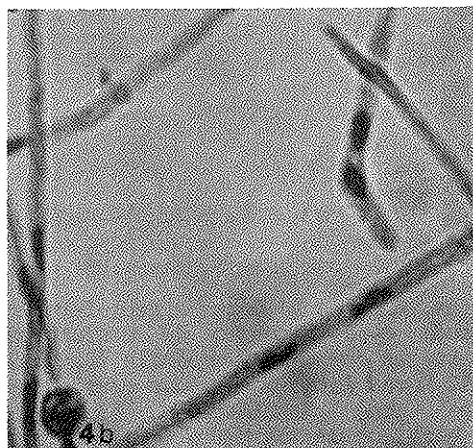
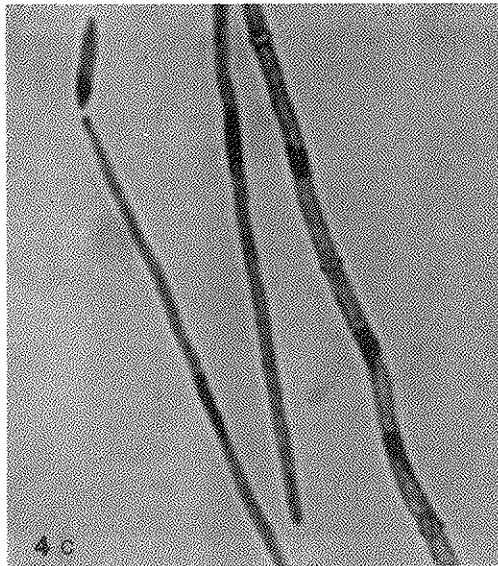


Figura 3 - a) Germinação de estruturas leveduriformes. Ponto de fragmentação da estrutura (seta a). Telofase mitótica, núcleo sugestivo de migração para a estrutura, em fase anucleada (seta b). b) Estruturas leveduriformes germinando (seta). Estrutura formada por fragmentação do segmento (seta a) 24 horas. Crescimento em MML. Coloração de HCl-Giemsa. 1.200X.



partir das 24 horas, pela emissão de tubos germinativos polares. Essas estruturas variaram muito de tamanho (Figura 2). Elas se apresentaram de formato alongado, de parede delgada. Mitoses sucessivas conferiram às estruturas a condição multinucleada. Foi verificada maior frequência de estruturas binucleadas que germinaram e deram origem a novas estruturas (Figuras 3a, b).

Figura 4 - a) Micélio multinucleado, originado de conídios uninucleados. 48 horas. b) Estrutura germinando, núcleo em telofase mitótica. c) Estrutura, uninucleada. d) Estruturas uni e binucleada em ponta de hifa tetranucleada (seta). 72 horas. Crescimento em MCL. Coloração de HCl-Siemensa, sobre membrana de diálise. 1.200X.



Observações feitas as 48 horas, em MCL mostraram conídios uninucleados que deram origem ao micélio multinucleado que apresentou formação de estrutura em ponta de hifas. As estruturas eram alongadas, de terminações afiladas mais delgadas do que as formadas em ML (Figuras 4a, b, c, d). A formação das estruturas foi observada entre

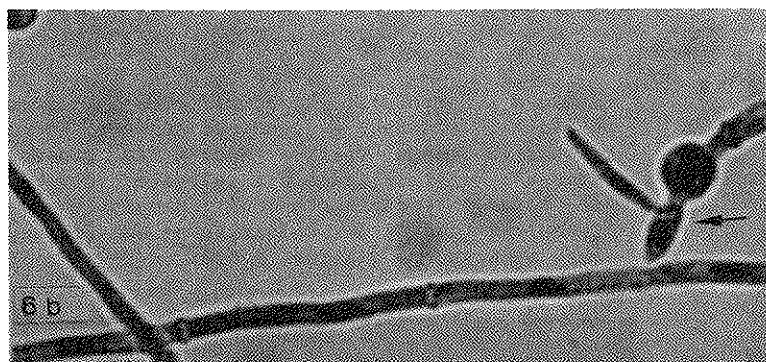
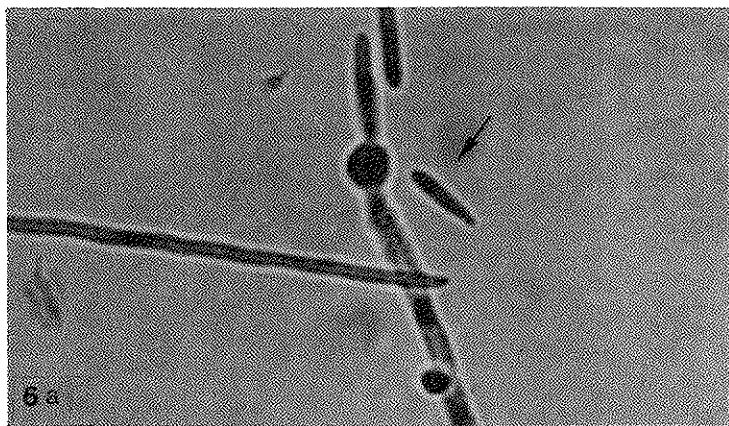
Figura 5 - a) Estrutura binucleada. Hifa uni é binucleada (seta a, b). 72 horas. **b)** Proliferação micelial. Migração nuclear (seta). 84 horas. Crescimento em MCL. Coloração de HCl-Giemsa sobre membrana de diálise. 1.200X.



72 e 84 horas e não foram notadas nos outros meios. Após as 84 horas a proliferação micelial foi intensa, a condição multinucleada e a formação de estruturas diminuiram. Hifas uni e binucleadas foram observadas com mais frequência (Figuras 5a, b). Nesse mesmo meio (MCI), em culturas de 72 horas foram observadas estruturas uninucleadas que se originaram a partir de tubos germinativos bipolares retardatários, isto é após a diferenciação hifal de um dos tubos germinativos, outro mais tardio surgiu e logo se fragmentou (Figuras 6a, b).

A formação de estruturas leveduriformes na hemolinfa do inseto foi verificada a partir das 36 horas. Elas foram produzidas em grandes quantidades e variaram de forma e tamanho. Foram observadas estruturas cilíndricas, uni e binucleadas. Elas também se apresentaram, alongadas, semelhantes aos segmentos hifais. Foram detectadas estruturas multinucleadas, com até sete núcleos. Nestas estruturas

Figura 6 - a) Formação de estrutura alongada, de terminação afilada, parede delgada, uninucleada (seta). b) Formação de estruturas a partir de tubo germinativo retardatário (seta). 72 horas. Crescimento em MCL. Coloração de HCl-Giemsa, sobre membrana de diálise. 1.200X.



alguns aspectos citológicos foram verificados (Figura 7 e 8). O núcleo interfásico apresentou material cromatinico compacto (Figura 8a). A profase mostrou núcleos alongados (Figura 8b). As Figuras 7b e 8b evidenciam núcleos em metafase, sugerindo que *Beauveria bassiana* tenha poucos cromossomos haplóides, em torno de quatro. Núcleos em anafase foram facilmente visíveis, conforme mostram as Figuras 7c e 8b. Núcleos em telofase (Figuras 7d e 8d) complementaram as fases de mitose.

Discussão

A técnica de HCl-Giemsa empregada para estudos citológicos em *Metarrhizium anisopliae* (20, 21) foi adaptada satisfatoriamente para *B. bassiana* facilitando às interpretações. Os resultados demonstraram claramente que as estruturas leveduriformes apresentaram parede menos espessa do que a dos conídios. Essa observação está de acordo com os trabalhos de Reisinger & Col. (29), que demonstraram, a nível de microscopia eletrônica, que os conídios têm dupla unidade de membrana, enquanto as estruturas, as quais eles denominaram de blastosporos, têm

unidade de membrana, semelhante ao que ocorre na parede dos segmentos hifais. Em consequência, dessa configuração, as estruturas são mais frágeis do que os conídios (28).

As observações citológicas indicaram que as estruturas se originaram a partir da germinação dos conídios por fragmentação do tubo germinativo (Figura 1) e por germinação das próprias estruturas (Figura 3), nas primeiras 24 horas. Na fase micelial, elas se formaram em ponta de hifas (Figura 4) ou a partir de tubo germinativo retardatário (Figura 6).

As estruturas apresentaram com mais frequência a condição uni e binucleada, em todos os meios empregados, durante as observações. Esse dado facilita a obtenção de heterocário (35, 36), uma vez que a condição multinucleada poderia mascarar os núcleos que sofreriam mutação.

A análise das estruturas leveduriformes na hemolinfa do inseto demonstrou que a atividade mitótica foi mais intensa, do que nas estruturas leveduriformes em meios de cultura sintéticos. A condição multinucleada também foi ativa nas estruturas semelhantes aos segmentos hifais (Figuras 7 e 8). Os dados obtidos através do estudo das fases de divisão nuclear, principalmente os núcleos sugestivos de metafase, indicaram que o número de cromossomo haplóide na espécie *B. bassiana* esteja próximo de quatro. As investigações também demonstraram que a mitose seguiu o curso normal e estão de acordo com os resultados obtidos por Saksena (32), Olive (25), Robinow (31) e Hammil (14, 15).

Os resultados apresentados nesse trabalho, também, proporcionaram um conhecimento mais detalhado, de um dos aspectos do ciclo biológico de *B. bassiana* relacionado à fase infectiva do fungo no hospedeiro. As análises sobre a formação e a condição nuclear das estruturas leveduriformes de linhagens, em diferentes fases de crescimento, podem auxiliar na avaliação da variabilidade genética da espécie. A constatação da rápida formação dessas estruturas em meios normalmente utilizados em laboratório (MCL, MMF e SABL),

Figura 7 - Estruturas leveduriformes bi e multinucleadas. Divisão mitótica: núcleo interfásico de material cromatínico compacto (seta a); metafase (seta b); anafase (seta c); telofase (seta d). 36 horas. Crescimento na hemolinfa de *Spodoptera frugiperda*. Coloração de HCl-Giemsa, sobre membrana de diálise. 1.000X.

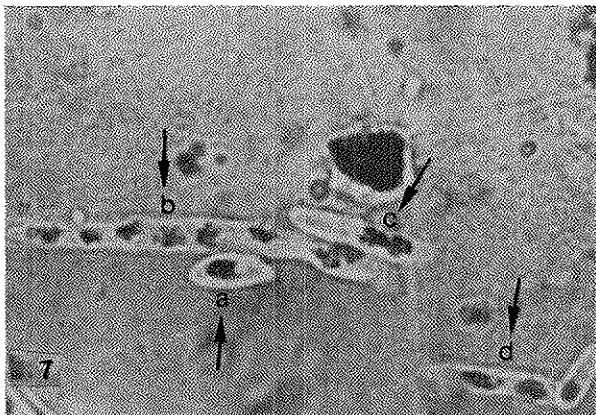
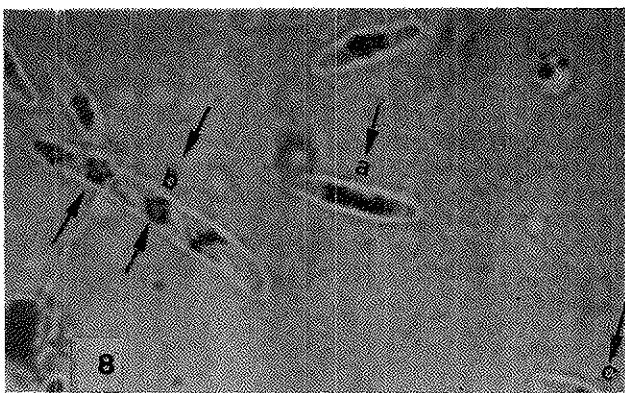


Figura 8 - Estruturas leveduriformes variando de forma, tamanho e condição nuclear. Forma cilíndrica longa (seta). Núcleo em profase (seta a); metafase (seta b); telofase (seta c). 36 horas. Crescimento na hemolinfa de *Spodoptera frugiperda*. Coloração de HCl-Giemsa, sobre membrana de diálise. 1.000X.



assim como a natureza da parede hifal facilitam a obtenção de protoplastos (18, 33), necessários em estudos genéticos relativos a parassexualidade e à transformação fúngica (4, 8).

Referências Bibliográficas

1. Adámek, L. - Submerse cultivation of fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. *Folia Microbiol.*, 10:255-257, 1965.
2. Alves, S.B. - Fungos entomopatogênicos. In: S.B. Alves, Controle microbiano de insetos. São Paulo. Editora Manole Ltda. 73-126p., 1986.
3. Alves, S.B. & Sosa Gómez, D.R. - Virulência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. para duas castas de *atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908). *Poliagro*, 5:1-9, 1983.
4. Azevedo, J.L. - Recombinação em fungos filamentosos. In: J.L. Azevedo, Genética molecular e de microrganismos. São Paulo, Editora Manole Ltda. 393-407p., 1987.
5. Barbosa, F.R.; Moreira, W.A. & Czepack, C. - *Beauveria bassiana* (bals.) Vuill. promissor agente de controle biológico para a cigarrinha-das-pastagens, *Deois flavopicta* (Stal., 1954). *Boletim de Pesquisa*, 2:3-17, 1984.
6. Blachère, H.; Ferron, P.; Corriev, G. & Peringer, P. - Étude de la formulation & de la conservation d'une préparation entomopathogène à base de blastospores de *Beauveria tenella* (Delacr.) Siemarzko. *Ann. Zool. Ecol. Anim.*, 5:69-79, 1973.
7. Catroux, C.; Calvez, J.; Ferron, P. & Blachère, H. - Mise en point d'une préparation entomopathogène à base de blastospores de *Beauveria tenella* (Delacr.) Siemarzko pour la lutte microbiologique contre le verblanc (*Melontha melontha* L.). *Ann. Zool. Ecol. Anim.*, 2:281-294, 1979.
8. Clarkson, J.M.; Simpson, F. & Durrands, P.K. - The development of DNA cloning technique for *Metarhizium anisopliae*. *Soc. Invertebr. Pathol.*, 91-92p., 1987.
9. Fargues, J.; Reisinger, O.; Robert, P.H. & Aubart, C. - Biodegradation of entomopathogenic Hyphomycetes: influence of clay coating on *Beauveria bassiana* bladospore survival in soil. *J. Invertebr. Pathol.*, 41:131-142, 1983.
10. Federici, B.A. - Mosquito control by the fungi *Culicinomyces*, *Lagenidium* and *Coelomomyces*. In: H.D. Burges. Microbial control of pest and plant diseases. 1970-1980. London, Academic Press, 555-570p., 1981.
11. Ferron, P. - Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Ann. Rev. Entomol.*, 23:409-442, 1978.
12. Ferron, P. - Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. In: H.D. Burges. Microbial control of pests and plant diseases. 1970-1980. London, Academic Press, 465-481p., 1981.
13. Hall, R.A. - The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids e scales. In: H.D. Burges. London, Academic Press, 482-497p., 1981.
14. Hammil, T.H. - Karyology during conidiogenesis in *Gliomastix murorum* light microscopy. *Amer. J. Bot.*, 6:1140-1151, 1977.
15. Hammil, T.H. - Light microscopy of karyology during conidiogenesis in *Gliomastix felina*. *Mycologia*, 47:123-129, 1982.
16. Holdom, D.G. & Klashorst, G. van de. - Sporulation by hifal bodies of *Nomuraea rileyi* and subsequent infection of *Heliothis* spp. *J. Invertebr. Pathol.*, 48:242-245, 1986.
17. Ignoffo, C.M. - The fungus *Nomuraea rileyi* as a microbial insecticide. In: H.D. Burges. Microbial control of pests and plant diseases. 1970-1980. London, Academic Press. 513-536p., 1981.
18. Kawula, T.H. & Lingg, A.J. - Production of protoplasts from *Beauveria bassiana* blastospores. *J. Invertebr. Pathol.*, 43:282-284, 1984.
19. King, D.S. & Humber, R.A. - Identification of the entomophthorales, In: H.D. Burges. Microbial control of pests and plant diseases. 1970-1980. London, Academic Press, 107-125p., 1981.
20. Luna, E.A. - Características citológicas e genéticas de linhagens selvagens, mutantes e diplóides de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.). Sorokin. Departamento de Genética da UFRJ, 1985. (Tese de Doutorado).

21. Luna, E.A. & Azevedo, J.L. - Técnicas para coloração nuclear em estruturas vegetativas de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Boletim do Grupo de Pesquisadores de Controle Biológico, 4:20-21, 1983.
22. Luna, E.A. & Furtado, J.S. - *Pleospora ractica* (Loculoascomycetes) in culture. Rev. Microbiol., 9:202-209, 1978.
23. Marques, E.J.; Villas Boas, A.M.; Lima, R. & Ribeiro, S.M.A. - Efeito do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e alguns inseticidas no controle de *Castnia licus* D., broca gigante da cana-de-açúcar. Brasil Açucareiro, 102:5-6, 1984.
24. Mesquita, A.L.; Cordeiro, Z.J.M.; Alves, E.J. & Caldas, R.C. - Utilização de fungos entomopatogênicos para o controle biológico da broca do rizoma da bananeira. Relatório Técnico Anual CNPMF, Cruz das Almas, Ba., 45-46p., 1984.
25. Olive, L.S. - Nuclear behavior during meiosis. In: C.C. Ainsworth & A.S. Sussman. - The fungi, an advanced treatise. New York, Academic Press, 143-161p., 1965.
26. Paris, S. & Ferron, P. - Study of the virulence of some mutants of *Beauveria brongniartii* (*Beauveria tenella*). J. Invertebr. Pathol., 34:71-77, 1979.
27. Parra, J.R.P. - Criação de ins& para estudos com patógenos. In: S.B. Alves. Controle microbiano de insetos. São Paulo, Editora Manole Ltda., 349-373p., 1986.
28. Reisinger, O. & Olah, G.M. - Étude ultrastucturale et cytochimique de la conidiogenèse chez *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Can. J. Microbiol., 20:1387-1398, 1974.
29. Reisinger, O.; Fargues, J.; Robert, P. & Arnoud, M.F. - Effet de l'argile sur la conservation des microrganismes I. Étude ultrastucturale de la diodégradation dans le sol de l'hyphomycète entomopathogène *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Ann. Microbiol., 128:271-287, 1977.
30. Riba, G. - Application en essais parcellaires de plein champ d'un mutant artificiel du champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* (Hyphomycète) contre la pyrale du maïs *Ostrinia nubilalis* (Lep. pyralidae). Entomophaga., 29:41-48, 1985.
31. Robinow, C.F. - Nuclear behavoir in conidial fungi. In: T. Cole & B. Kendrick. Biology of conidial fungi. New York Academic Press, 357-392, 1981.
32. Saksena, H.K. - Nuclear structure and division in the micelium and basidiospores of *Ceratobasidium praticolum*. Can. J. Bot., 39:749-759, 1961.
33. Silveira, W.D. & Azevedo, J.L. - Protoplast fusion and genetic recombination in *Metarhizium anisopliae*. Enzyme Microbiol. Tecnol., 9:149-152, 1987.
34. Tonet, G.L. & Reis, E.M. - Patogenicidade de *Beauveria bassiana* em insetos praga de soja. Pesq. Agropec. Bras., 14:85-95, 1979.
35. Tolmsoff, W.J. - Heteroploidy as a mecanism of variability among fungi. Ann. Rev. Phytopathol., 21:313-340, 1983.
36. Tinline, R.D. & Noviello, C. - Heterokaryosis in the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*, Mycologia, 63:710-711, 1971.

SUCESSÃO FÚNGICA EM FOLHAS DE *FICUS MICROCARPA* L.F. SUBMERGIDAS NO LAGO FRONTAL SITUADO NO PARQUE ESTADUAL DAS FONTES DO IPIRANGA, SÃO PAULO/SP

Iracema Helena Schoenlein-Crusius
Adauto Ivo Milanez

Recebido para publicação em 28/06/88

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

Resumo

Para avaliar os efeitos da mudança de ambiente terrestre para aquático sobre a micota autóctone e verificar a validade no ambiente aquático, dos métodos comumente utilizados para o isolamento de fungos no ambiente terrestre, 700 folhas recém caídas de *Ficus Microcarpa* L.f. foram colocadas em sacos de tela de náilon com malha de 1mm de diâmetro e submersas às margens do lago frontal do Instituto de Botânica, São Paulo SP. Mensalmente, de março a setembro de 1987, retiraram-se 50 folhas para o isolamento de fungos por meio de técnicas de lavagem de discos de folhas, incubação em meio ágar-batata-dextrose, maltose pentosada, meio com sais inorgânicos, maite-ágar, câmara úmida e iscagem com palha de milho, celofane, ecdise de cobra, exoesqueleto de camarão, fios de cabelos, sementes de cânhamo e sorgo. O restante das folhas foi colocado em aquários contendo água esterilizada do lago para o estudo dos fungos tetrarradiados. Os fungos isolados antes da submersão como *Trichoderma viride* Pers., *Mucor hiemalis* Wehmer, *Aspergillus niger* van Tieghem, *Cylindrocladium scoparium* Morgan, *Cylindrocladium parvum* Anderson e *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler, permaneceram nas folhas de *Ficus microcarpa* durante os sete meses do experimento. Verificou-se a ocorrência de sucessão fúngica durante a decomposição das folhas, com participação ativa dos fungos zoospóricos como *Achlya dubia* Coker, *Achlya flagellata* Coker, *Saprolegnia* sp., *Nowakowskella elegans* (Nowak.) Schroeter, entre outros, e a presença de fungos tetrarradiados nunca citados no Brasil. Os resultados encontrados indicam que as técnicas de isolamento e de cultivo associadas aos métodos de iscagem podem ser utilizados com êxito no isolamento de fungos em folhas submersas.

Summary

Fungal succession on Ficus microcarpa L.f. leaves submerged in frontal lake in the Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo State, Brazil

Seven hundred newly fallen leaves of *Ficus microcarpa* L.f. were placed in nylon litter-bags with mesh of 1mm diameter and submerged in a lake of the Botanical Institute of São Paulo, Brazil, to study the effects of the environmental

changes from soil to water on the indigenous leaf micota and to verify the validity of the most common isolation methods used for terrestrial systems to aquatic environments. Fifty leaves were collected monthly for isolation of fungi by culture techniques such as leaf disks washing and plating on potato-dextrose-agar, maltose-pentose-agar, inorganic-salt-agar, malt-extract-agar; culture in moist chamber, and baiting with corn leaves, cellophane, snake skin, hemp and *Sorghum* seeds. For the observation of the tetraradiate fungi, a part of the leaf samples were incubated in an aquarium with aired sterilized pond water. Terrestrial fungi as *Trichoderma viride* Pers., *Mucor hiemalis* Wehmer, *Aspergillus niger* van Tieghem, *Cylindrocladium scorpiarium* Morgan, *Cylindrocladium parvum* Anderson and *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler isolated before the submergence were present in the leaves during the whole experiment. Zoosporic fungi such as *Achlya dubia* Coker, *Achlya flagellata* Coker, *Saprolegnia* sp. and *Nowakowskella elegans* (Nowak) Schroeter took part actively on fungal succession that occurred on *Ficus microcarpa* leaves as well as the tetraradiate fungi, never cited in Brazil before. Isolation procedures, culture methods and baiting techniques, when used together, provided good results in studies of fungal succession in submerged leaves.

Introdução

Na decomposição das folhas, que constituem a maior fração do folhado (7), os fungos têm sido considerados os microrganismos de maior atividade sapróbita, tanto no solo (13) como na água (2, 33). Nos sistemas aquáticos, os fungos podem ser responsáveis pelo aumento da palatabilidade dos substratos orgânicos para os detritívoros, dinamizando a ciclagem de nutrientes (18) ou servindo de alimento por meio da produção de biomassa (24).

As alterações sucessivamente surgidas nas folhas pelos processos de decomposição resultam geralmente no estabelecimento de diversas comunidades de fungos no substrato ao longo do tempo, constituindo assim, a sucessão fúngica (11, 25, 30).

A existência de sucessão de fungos em folhas caídas na água tem sido um processo amplamente aceito (23, 27). As folhas senescentes apresentam uma população atuante (31), que uma vez submersa, pode ser em parte, incorporada à água. Deste modo, as folhas que caem na água podem desempenhar o papel de fonte de nutrientes e de inóculo para o sistema (2). Verificou-se que os fungos incorporados à água por meio das folhas, podem ser resistentes às mudanças de ambiente, porém ainda não se sabe se permanecem ativos na decomposição do substrato durante longos períodos de tempo (1). Há dúvidas também sobre a função dos fungos terrestres adaptados à água e o seu desempenho na sucessão de fungos nas folhas (8).

No Brasil foram realizados estudos sobre sucessão fúngica apenas em folhas de *Licania* sp. e *Hortia* sp. colocadas no solo de mata tropical úmida (19).

Não há, até o presente momento, qualquer estudo sobre a sucessão de fungos em sistema aquáticos brasileiros.

O objetivo deste estudo foi o de verificar o comportamento dos fungos existentes nas folhas senescentes de *Ficus microcarpa* L.f. diante da submersão das folhas na água e consequentemente a verificação da ocorrência de sucessão fúngica no ambiente aquático. Além disto, o presente estudo apresentou a finalidade de verificar a validade no ambiente aquático, dos métodos comumente utilizados para o isolamento de fungos no ambiente terrestre.

Material e Métodos

O local escolhido para a imersão das folhas foi o lago frontal situado no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, em São Paulo/SP. O lago é artificial e apresenta de 5 a 6m de profundidade, superfície de 87.067m², volume de 402.895m³, pH de 8 a 9 e temperatura média anual entre 17 e 27°C (Célia L. Sant'Ana, comunicação pessoal).

Foram coletadas aproximadamente 700 folhas recém-caídas de *Ficus microcarpa* L.f. situadas nas margens do mesmo corpo d'água. As folhas foram secadas ao ar livre no laboratório, divididas em 12 amostras contendo 55 unidades e colocadas em sacos de tela de náilon, 10 x 20cm, com malha de 1mm de diâmetro e submersas às margens do lago, para facilitar o acesso, a uma profundidade aproximada de 10cm, para garantir a completa imersão das amostras.

Mensalmente, de março a setembro de 1987, foram retiradas 10 folhas de cinco sacos de náilon, num total de 50 folhas de *Ficus microcarpa* para o isolamento de fungos por meio de técnicas como: lavagem de discos de folhas (25, 26), que elimina todos os propágulos aderidos à lâmina foliar, incubação em meios de cultura comumente utilizados para o isolamento de fungos terrestres, tal como ágar-batata-dextrose com rosa bengala (10, 12), maltose pentosada (5), utilizada para alguns fungos zoospóricos, meio com sais inorgânicos (30), testado para o crescimento de fungos imperfeitos aquáticos, e ágar-malte. Foi feita a iscagem dos fungos zoospóricos nos discos de folhas, com palha de milho, celofane, ecdise de cobra, exoesqueleto de camarão, fios de cabelos, sementes de cânhamo e sorgo (21), substratos comumente utilizados para o isolamento desses fungos. Uma parte das folhas foi colocada em aquário contendo água esterilizada do lago, para o cultivo de fungos tetrarradiados (17). As colônias foram isoladas em meio de ágar-batata-dextrose com rosa bengala (10, 12) e identificadas, sempre que possível, à nível de espécie, com auxílio de literatura pertinente (3, 4, 16, 29).

Resultados

O experimento programado para ser executado durante 12 meses, foi encerrado após o sétimo mês, quando as folhas em estudo encontravam-se em avançado grau de desintegração, de modo a impossibilitar o isolamento dos fungos por meio das técnicas propostas.

Foram identificados 30 táxons nas folhas de *Ficus microcarpa*. Deste total, 16 eram fungos imperfeitos terrestres, quatro imperfeitos aquáticos, oito zoospóricos e dois zigomicetos, conforme mostra a Figura 1. Os fungos foram isolados da seguinte maneira: os imperfeitos terrestres e zigomicetos, pela lavagem de discos de folhas e plaqueamento em meio de ágar-batata-dextrose; os zoospóricos com auxílio de palha de milho, celofane e exoesqueleto de camarão e os tetrarradiados por incubação de folhas em aquários contendo água esterilizada do lago. Há fungos que não esporularam até o momento e que continuam sendo estudados.

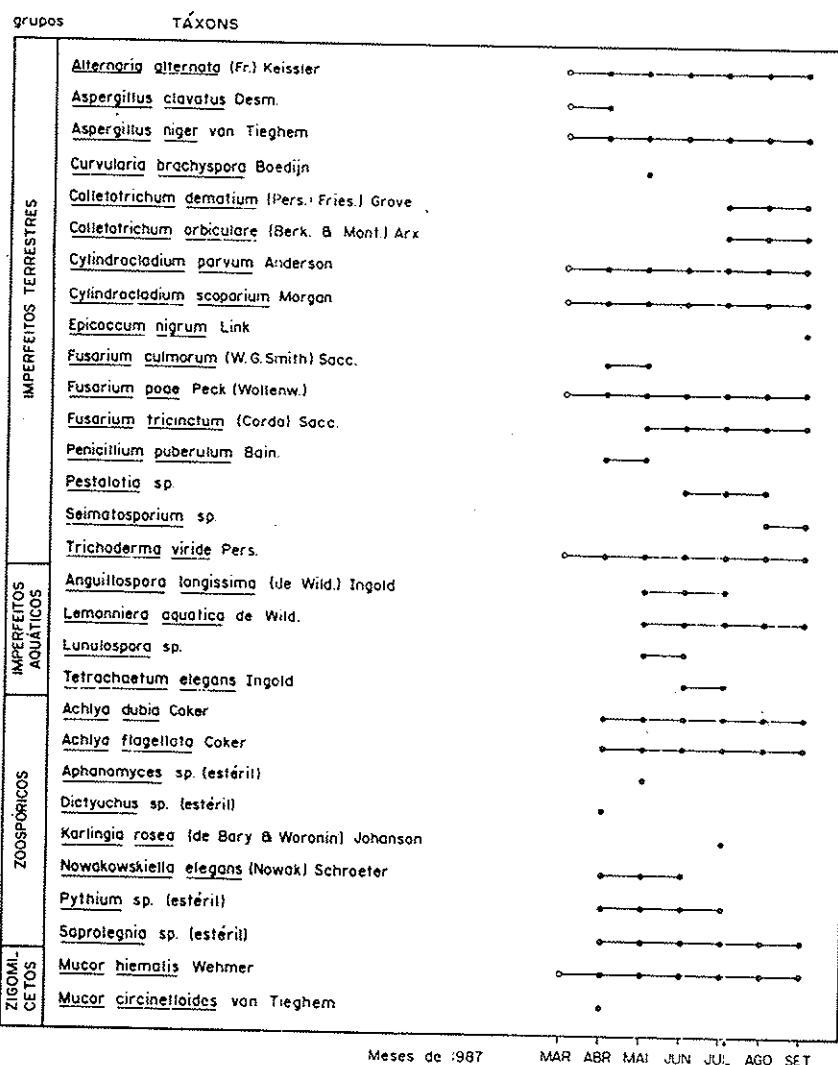
Nas folhas secas, antes da submersão, foram isolados: *Alternaria* sp., *Aspergillus clavatus* Desm., *Aspergillus niger* van Tieghem, *Cylindrocladium scoparium* Morgan, *Cylindrocladium parvum* Anderson, *Fusarium poae* (Peck) Wollenw., *Trichoderma viride* Hughes e *Mucor hiemalis* Wehmer. Com exceção de *Aspergillus niger*, todos os demais foram continuamente isolados ao longo de todo o trabalho.

Fungos zoospóricos foram isolados um mês após a submersão dos sacos de tela de náilon e os mais prevalentes foram *Achlya dubia* Coker, *Achlya flagellata* Coker e *Saprolegnia* sp., vindo a seguir *Pythium* sp. (estéril) e *Nowakowskella elegans* (Nowak.) Schroeter. Após o estabelecimento dos fungos zoospóricos surgiram os fungos tetrarradiados, tendo sido *Lemonnieria aquatica* de Wild. o mais frequente, seguido por *Anguillospora longuissima* (de Wild.) Ingold, *Lunulospora* sp. e *Tetrachaetium elegans* Ingold.

Alguns fungos considerados terrestres como *Colletotrichum dematium* (Pers: Fries) Grove, *Epicoccum nigrum* Link, *Fusarium tricinctum* (Corda) Sacc., *Pestalotia* sp. e *Seimatosporium* sp. apareceram nas folhas após alguns meses de submersão.

Figura 1 - Ocorrência dos fungos nas folhas de *Ficus microcarpa* L.f. submersas no lago situado no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo/SP, durante o período de março a setembro de 1987.

Símbolos: O = Folhas secas, antes da submersão; ● = Folhas submersas.



Discussão

Os fungos presentes nas folhas secas resistiram à mudança drástica de ambiente. Este fato foi observado anteriormente em folhas submersas em lagos italianos (27) e havia sido objeto de discussão a respeito da função dos fungos autóctones em folhas submersas (23). Esperava-se que os fungos imperfeitos terrestres ocorresssem apenas durante os estágios iniciais de decomposição das folhas de *Ficus microcarpa*, porém houve a colonização das folhas por alguns fungos imperfeitos terrestres, alguns

meses após a submersão. Segundo estudos realizados anteriormente (9), estes fungos podem ter sido invasores provenientes do ambiente aquático ou podem ter estado na folhas sob forma inativa. No presente estudo, esta última alternativa parece ter sido eliminada pelo fato de ter-se utilizado uma técnica seletiva, a de lavagem de discos de folhas (25) que elimina todos os propágulos, organismos oportunistas e inativos do substrato foliar. Além disto, verificou-se que 50% dos fungos imperfeitos terrestres surgiram após a submersão das folhas. Por outro lado, aventou-se a possibilidade (2) destes fungos possuírem esporos inativos que permanecem na água até colonizarem um substrato adequado. Conclui-se que o comportamento destes fungos ainda não está devidamente esclarecido (23) e merece estudos mais aprofundados.

Os fungos zoospóricos surgiram em grande quantidade, logo após a ocorrência dos principais fungos imperfeitos terrestres. Esses fungos ocorreram com pouca variabilidade de espécies, mas em grandes quantidades de indivíduos, o que pode estar associado à melhor adaptação às condições da folha estudada (9, 29). Os fungos zoospóricos, de modo geral, desapareceram muito rapidamente após a sua observação, com exceção de vários isolados de *Achlya dubia*, *Achlya flagellata* e *Saprolegnia* sp. (estéril).

Os fungos tetrarradiados têm sido citados como os mais comuns nos estudos sobre a micota em folhas submersas (27, 30). No entanto, nas folhas de *Ficus microcarpa*, este grupo não foi o mais representativo. Este fato pode ser justificado pelas exigências nutricionais destes fungos e aos fatores climáticos condicionantes (22). As diversas metodologias utilizadas pelos diferentes autores podem justificar os fatos observados.

Alternaria sp., *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus niger*, *Curvularia* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Pestalotia* sp. foram isolados anteriormente em folhas submersas de *Fraxinus pennsylvanica*, *Acer saccharum* e *Quercus velutina* (2). Grande parte destes fungos, incluindo *Cylindrocladum scoparium*, foi isolada em folhas e no solo brasileiro em floresta tropical úmida (19) e cerrado (12).

A ocorrência das espécies de *Colletotrichum dematium* e *Colletotrichum orbiculariae* Arx., após a submersão das folhas em estudo pode estar ligada à dispersão destes fungos que se realiza através das chuvas (32). Os fungos zoospóricos isolados nas folhas de *Ficus microcarpa* foram citados em outros sistemas aquáticos brasileiros (20). *Nowakowskella elegans* foi isolado anteriormente em folhas de *Prunus laurocerasus* e *Arbutus menziesii*, sendo considerado um importante organismo celulolítico (29), o que justifica a sua grande ocorrência nas iscas de palha de milho colocadas em placas-de-petri contendo discos de folhas incubadas em água destilada esterilizada.

Os fungos tetrarradiados isolados durante este estudo foram citados como os mais comuns em folhas de *Alder* (14) e *Typha latifolia* (15) na Inglaterra, tendo sido encontrados também nas épocas frias do outono nos Estados Unidos (1, 8).

As técnicas culturais, como isolamento e plaqueamento de fungos em meios de cultura, associadas aos métodos de iscagem foram consideradas adequadas para o estudo dos fungos terrestres (25) e também para os fungos aquáticos (28), o que foi confirmado neste estudo, em que a utilização de meio de ágar-batata-dextrose e meio de maltose pentosada (MP-5) favoreceu o isolamento da maioria dos fungos. Os resultados obtidos com a utilização da submersão de folhas de *Ficus microcarpa* no aquário foram semelhantes aos citados por outros autores (17), em que os esporos dos fungos tetrarradiados foram coletados na superfície da água.

Os dados aqui obtidos foram semelhantes aos observados em folhas de *Alnus glutinosa* submersas em lagos italianos (27) e aos de folhas de *Fraxinus pennsylvanica*, *Acer saccharum* e *Quercus velutina* (2). A resistência dos fungos terrestres autóctones verificada neste estudo está de acordo com os outros resultados (24) que aventaram a possibilidade dos fungos terrestres participarem ativamente na decomposição de folhas na água.

A comparação dos resultados deste estudo com os disponíveis na literatura pertinente é difícil porque, além de metodologias e substratos diferentes terem sido utilizados, também fatores climáticos devem ser levados em consideração.

Agradecimentos

À Pesquisadora Científica Carmen Lídia A. Pires do Instituto de Botânica de São Paulo, Seção de Micologia e Líquenologia, pelo auxílio na identificação dos fungos zoospóricos citados neste estudo.

À Dra. Sânia Maria Tauk da UNESP, Rio Claro/SP, Departamento de Ecologia, pelo empréstimo das bolsas de tela de náilon utilizadas neste experimento.

Referências Bibliográficas

1. Akridge, R.E. & Koehn, L. - Amphibious Hyphomycetes from the San Marcos River in Texas. *Mycologia*, 79(2):228-233, 1987.
2. Barlocher, F. & Kendrick, B. - Dynamics of the fungal population on leaves in the stream. *J. Ecol.*, 62:761-791, 1974.
3. Barnett, H.L. & Hunter, B.B. - Illustrated genera of Imperfect Fungi. 3th. ed. Minnesota, Burgess Publishing Company, 1972.
4. Barron, G.L. - The genera of Hyphomycetes from soil. Baltimore, Ed. Robert Krieger, 1972.
5. Beneke, E.S. & Rogers, A.L. - Aquatic Phycomycetes isolated in the states of Minas Gerais, São Paulo and Paraná, Brazil. *Rickia*, 1:181-193, 1962.
6. Beneke, E.S. & Rogers, A.L. - Aquatic fungi of Parque Nacional de Itatiaia in the state of Rio de Janeiro. *Rickia*, 5:51-64, 1970.
7. Bray, J.R. & Gorham, E. - Litter production in forest of the world. *Adv. Ecol. Res.*, 2:101-157, 1974.
8. Butler, S.K. & Suberkropp, K. - Aquatic Hyphomycetes on oak leaves: comparison on growth, degradation and palatability. *Mycologia*, 78(6):922-928, 1986.
9. Dickinson, C.H. & Pugh, G.J.F. - Biology of plant litter decomposition. London, Academic Press Inc., vol.1, 1974.
10. Difco Laboratories. - Difco Manual, 9th. ed. Michigan, Detroit-Michigan Difco Laboratories Inc., 1972.
11. Frankland, J. - Mechanisms in fungal successions. In: Carroll, G.C. & Wicklow, D. ed. The fungal community. New York, Marcell Dekker, 1981.
12. Grandi, R.A.P. - Hifomicetos de solo no cerrado da Reserva Biológica de Moji-Guaçú (São Paulo-Brasil) e triagem da ação amilolítica, celulolítica e proteolítica. São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1985. (Tese de mestrado).
13. Hogg, B.M. & Hudson, H.J. - Microfungi on leaves of *Fagus sylvatica* L. The micro-fungal succession. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 49(2):185-192, 1966.
14. Ingold, C.T. - Aquatic Hyphomycetes of decaying alder leaves. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 25:339-417, 1942.
15. Ingold, C.T. - Further observations on aquatic Hyphomycetes. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 26:104-115, 1943.
16. Ingold, C.T. - Guide to aquatic Hyphomycetes (Fungi Imperfici) with notes on their biology. Ambleside, Frasnwater Biological Association, Scientific Publications nr. 30, 1975.
17. Iqbal, S.H. & Webster, J. - Aquatic Hyphomycetes spora of the River Exe and its tributaries. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 61:331-346, 1973.
18. Kaushik, N.K. & Hynes, H.B.N - Experimental study on the role of autumn shed leaves in aquatic environments. *J. Ecol.*, 56:229-243, 1968.
19. Maia, L.C. - Sucessão de fungos em folheto de floresta tropical úmida. Recife, Departamento de Biologia da Universidade Federal de Pernambuco, 1983. (Dissertação de mestrado).
20. Milanez, A.I. - Saprolegniaceae no Brasil. *Rickia*, 13:127-131, 1986.
21. Milanez, A.I. & Beneke, E.S. - New records of aquatic phycomycetes from Michigan. *Pap. Mich. Acad. Sci. Arts and Letters*, vol.3, 1968.
22. Nilsson, S. - Freshwater Hyphomycetes. *Upsala. Symbolae Botanicae Upsaliensus*, 18., 2, 1964.
23. Park, D. - Methods of detecting fungi in organic detritus in water. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 58(2):281-290, 1972.

24. Park, D. - On the ecology of heterotrophic micro-organisms in freshwater. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 58(2):291-299, 1972.
25. Pugh, G.T.F. - Leaf litter fungi found on *Carex paniculata* L. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 41(2):185-195, 1958.
26. Pugh, G.T.F.; Buckey, N.G. & Mulder, J. - The role of phylloplane fungi in the early colonization of leaves. *Symp. Biol. Hung.*, 11:329-333, 1972.
27. Puppi, G. - Occurrence of filamentous fungi on decaying leaves in lake waters (Albano and Nemi, central Italy). *Annali. Bot.*, 12:27-36, 1983.
28. Shearer, C.A. & Webster, J. - Aquatic Hyphomycetes communities in the River Teign. I. Longitudinal distribution patterns. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 84(3):489-501, 1985.
29. Sparrow, F.K. - *Aquatic Phycomycetes*, 2th. ed. Ann Arbor. University of Michigan Press, 1960.
30. Suberkropp, K. & Klug, M.J. - Fungi and bacteria associated with leaves during processing a woodland stream. *Ecology*, 57:707-719, 1976.
31. Subramanian, C.V. & Vittal, B.P.R. - Studies on litter fungi. IV. Fungal colonization of *Gymnosporia emarginata* leaves and litter. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 21:339-344, 1980.
32. Sutton, B.C. - *The Coelomycetes*. Kew, Commonwealth Mycological Institute, Surrey, England, 1980.
33. Triska, F.J. & Sedell, J.R. - Decomposition of four species of leaf litter in response to nitrate manipulation. *Ecology*, 57:783-792, 1976.

LEVEDURAS ISOLADAS DE PACIENTES COM CÂNCER: INCIDÊNCIA E SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS POLIÉNICOS

Arlete Emily Cury
 Marisa Porta Miche
 & Paulo Suyoshi Minami

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

Recebido para publicação em 19/07/88

Resumo

Foram estudadas a incidência de leveduras isoladas de pacientes com câncer e submetidos à radioterapia ou à quimioterapia e a sensibilidade destes fungos a antibióticos poliênicos. De 227 desses pacientes, também com suspeita clínica de micose, foram isoladas 200 cepas que incluiam apenas espécies de *Candida*. *C. albicans* foi a espécie de maior incidência (87.5%), seguindo-se *C. tropicalis* (9.0%), *C. parapsilosis* (6.0%), *C. krusei* (4.0%), *C. guilliermondii*, *C. pseudotropicalis* (3.0%) e *C. famata* (1,0%). Em concentrações dos antibióticos consideradas eficazes para amostras sensíveis, todas as leveduras foram inibidas pela nistatina (8 μ g/ml) e 97,4% o foram pela amfotericina B (2 μ g/ml) e pela pimaricina (10 μ g/ml). Nessas concentrações, 10,6% das leveduras mostraram-se resistentes à ação letal da nistatina, 32,6% à da amfotericina B e 38,7% à da pimaricina.

Summary

Incidence and polyene susceptibility of yeasts recovered from cancer patients undergoing antineoplastic therapy

The incidence of yeast species isolated from cancer patients receiving radiotherapy or chemotherapy and their susceptibility to poliene antibiotics have been studied. In this study 200 strains of *Candida* species were recovered from 227 patients. *C. albicans* was the most incident specie (87.5%), followed by *C. tropicalis* (9.0%), *C. parapsilosis* (6.0%), *C. krusei* (4.0%), *C. guilliermondii*, *C. pseudotropicalis* (3.0%), and *C. famata* (1.0%). For efficacious concentrations of the antibiotic for susceptible strains, 100% of the yeasts have been inhibited by nistatin (8 μ g/ml), and 97.4% by amphotericin B (2 μ g/ml) and pimaricin (10 μ g/ml). For these concentrations, 10.6% of the yeasts were resistent to letal action of the nistatin, 32.7% to amphotericin B and 38.7% to pimaricin.

Introdução

As leveduroses representam problema clínico significativo, em particular quando envolvem portadores de neoplasias malignas. Embora estes pacientes apresentem grande propensão à aquisição de enfermidades por diferentes fungos, entre outros

microrganismos, tem-se observado predomínio de infecções por *Candida*, notadamente *C. albicans* (1, 4, 8, 12).

Para tratamento dessas infecções, encontram-se comercialmente disponíveis vários agentes antifúngicos, incluindo antibióticos poliênicos.

Estudos realizados com leveduras isoladas de materiais biológicos demonstraram que esses antibióticos eram potentes contra a maior parte das cepas. Tais resultados contribuiram para a carência de uma prática rotineira de antibiogramas com agentes poliênicos e para o conceito de que existe uma incidência desprezível de leveduras resistentes. Entretanto, segundo alguns autores, essas leveduras podem predominar em determinada classe de pacientes, em especial naqueles com câncer e submetidos a tratamento antineoplásico imunossupressor (5).

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de se verificar a incidência de fungos em pacientes com câncer e sob radioterapia ou quimioterapia antineoplásica e a ação fungistática e fungicida de alguns agentes poliênicos sobre esses microrganismos "in vitro".

Material e Métodos

Pacientes e amostras - As amostras submetidas a exame micológico foram provenientes de 103 mulheres e 97 homens, com idade média de 44 anos, portadores de neoplasias malignas, que se encontravam sob radioterapia ou quimioterapia, e com suspeita clínica de infecção por fungo. Conforme indicação médica, foram examinadas amostras de escarro, fezes, líquor, raspados de lesão de mucosa oral e vaginal, sangue, secreção vaginal e uretral, e urina.

Microrganismos - O isolamento e a identificação dos fungos avaliados neste estudo, foram realizados mediante a aplicação de técnicas convencionais (13). Esses organismos foram mantidos em ágar Sabouraud dextrose (ASD) a 30°C, com repiques sucessivos de 24 horas.

Antibióticos poliênicos - Anfotericina B e nistatina (5481UI/ml) e pimaricina, foram gentilmente fornecidas sob forma de pó, respectivamente, por Squibb Indústria Química S/A e BYK/Prociex Indústria Farmacêutica Ltda. Soluções de reserva desses antibióticos foram preparadas em dimetilsulfóxido (10000µg/ml) e conservadas a 4°C até o uso, dentro de um prazo máximo de 7 dias.

Inóculo - A partir das leveduras mantidas em ASD, foram preparadas suspensões contendo, aproximadamente, 1×10^6 unidades formadoras de colônias/ml (18) de tampão de fosfato pH 7,0.

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) - Foi utilizada técnica em meio de ágar semi-sólido (3), onde a anfotericina B e a nistatina foram diluídas numa série geométrica de 0,125 a 32µg/ml e a pimaricina numa série de 0,156 a 40µg/ml. Após fusão e esfriamento a 45°C, cada meio contendo a concentração adequada do antibiótico e os controles, foram vertidos em placas de Petri. Cada placa foi inoculada com 0,01ml da suspensão de 14 leveduras e observada após incubação a 30°C durante 24 horas. Nestas condições, o crescimento foi nitidamente visível nos meios isentos de quimioterápico. Foi considerada CIM, a menor concentração do antibiótico que inibiu completamente o crescimento da levedura.

Determinação da concentração fungicida mínima (CFM) - Esta prova foi realizada em ASD, onde foram repicadas as células que no teste anterior apresentaram inibição de crescimento e os cultivos controle. A leitura foi efetuada após incubação a 30°C e observação de crescimento abundante dos controles (48 horas, em média). Foi considerada CFM, a menor concentração da droga que não permitiu desenvolvimento do subcultivo.

Tabela 1 - Espécies de *Candida* isoladas de pacientes com câncer e sob terapia antineoplásica.

Nº de pacientes	Espécies	Incidência (%)
154	<i>C. albicans</i>	75,5
1	<i>C. albicans</i> , <i>C. famata</i> , <i>C. guilliermondii</i>	0,5
1	<i>C. albicans</i> , <i>C. famata</i> , <i>C. tropicalis</i>	0,5
4	<i>C. albicans</i> , <i>C. guilliermondii</i>	2,0
5	<i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i>	2,5
4	<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i>	2,0
6	<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i>	3,0
1	<i>C. guilliermondii</i> , <i>C. pseudotropicalis</i>	0,5
3	<i>C. krusei</i>	1,5
7	<i>C. parapsilosis</i>	3,5
1	<i>C. parapsilosis</i> , <i>C. pseudotropicalis</i> , <i>C. tropicalis</i>	0,5
3	<i>C. pseudotropicalis</i>	1,5
1	<i>C. pseudotropicalis</i> , <i>C. tropicalis</i>	0,5
9	<i>C. tropicalis</i>	4,5

Resultados

Embora tenham sido empregadas técnicas classicamente utilizadas em laboratório para o isolamento de bolores e de leveduras, durante o período de 24 meses de duração deste estudo foram isoladas 227 cepas, que incluiam apenas espécies de *Candida*, a partir de 200 pacientes com câncer e submetidos à radioterapia ou à quimioterapia. *C. albicans* foi isolada mais frequentemente, representando 77,1% do total de leveduras e incidiu em 87,5% dos pacientes. *C. tropicalis* foi a segunda em incidência (9%), seguida de *C. parapsilosis* (6%) e, em menor proporção, de *C. krusei* (4%). *C. guilliermondii* e *C. pseudotropicalis* apresentaram uma mesma incidência (3%), porém, *C. guilliermondii*, assim como *C. famata* (1%), foi isolada apenas de pacientes que albergavam mais de uma espécie de levedura (Tabela 1).

Os resultados das provas de sensibilidade, executadas com os isolamentos clínicos frente aos agentes poliênicos, encontram-se nas Tabelas 2 a 4. A anfotericina B, na concentração de 2 μ g/ml., exerceu ação fungistática e fungicida, respectivamente, sobre 97,3% e 67,4% das leveduras. A inibição do crescimento de 6 amostras de *C. albicans* somente ocorreu em concentrações $\geq 8\mu$ g/ml. Todas as cepas de *C. famata* e de *C. parapsilosis*, 50% das de *C. krusei* e 78% das de *C. tropicalis* foram resistentes a 2 μ g/ml, letal para a maioria das outras leveduras.

Na concentração de 8 μ g/ml, a nistatina inibiu o crescimento de todas as leveduras e foi letal para 89,4%. Para as amostras restantes, esta última ação foi exercida em concentrações $\geq 16\mu$ g/ml.

A pimaricina, na concentração de 10 μ g/ml, foi fungistática para 97,3% das leveduras e letal para 61,2%.

Considerando-se os valores de CIM ou de CFM de agentes poliênicos para avaliação da sensibilidade dos fungos, verificou-se que, em relação ao primeiro teste, 2 das 6 amostras resistentes à anfotericina B ($> 2,0\mu$ g/ml) também o foram à pimaricina ($> 10,0\mu$ g/ml). Em relação à CFM, entre as 74 leveduras resistentes à anfotericina B, 8 também o foram à nistatina ($> 8\mu$ g/ml), 32 à pimaricina e 12 à nistatina e pimaricina.

Discussão

Estudos realizados em pacientes com câncer podem mostrar resultados algo divergentes quanto ao isolamento e a incidência de determinadas leveduras.

No presente trabalho foram obtidos dados coincidentes com o de outros autores quanto a ser *C. albicans* isolada mais frequentemente, seguida de *C. tropicalis* (5, 9, 12, 17). Embora *C. albicans* seja descrita como a espécie de maior virulência, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (terceira em incidência neste trabalho) podem ser tão ou mais virulentas, principalmente em pacientes com câncer (1, 4, 11, 19, 20).

Tabela 2 - Sensibilidade de *Candida* à anfotericina B.

Levedura (nº de isolamentos)	Teste de sensibilidade	Nº de cepas sensíveis à concentração ($\mu\text{g/ml}$) de:								
		$\leq 0,125$	0,25	0,5	1	2	4	8	≥ 32	
<i>C. albicans</i> (175)	CIM	139	26	2	2	0	0	4	2	0
	CFM	85	22	18	8	4	0	14	8	16
<i>C. famata</i> (2)	CIM	0	0	1	1	0	0	0	0	0
	CFM	0	0	0	0	0	0	0	2	0
<i>C. guilliermondii</i> (6)	CIM	6	0	0	0	0	0	0	0	0
	CFM	0	2	0	0	2	0	0	2	0
<i>C. krusei</i> (8)	CIM	4	0	4	0	0	0	0	0	0
	CFM	4	0	0	0	0	2	2	0	0
<i>C. parapsilosis</i> (12)	CIM	2	8	0	2	0	0	0	0	0
	CFM	0	0	0	0	0	0	8	0	4
<i>C. pseudotropicalis</i> (6)	CIM	2	4	0	0	0	0	0	0	0
	CFM	2	2	0	0	0	0	2	0	0
<i>C. tropicalis</i> (18)	CIM	6	8	0	4	0	0	0	0	0
	CFM	2	0	0	2	0	6	4	4	4

Tabela 3 - Sensibilidade de *Candida* à nistatina.

Levedura (nº de isolamentos)	Teste de sensibilidade	Nº de cepas sensíveis à concentração ($\mu\text{g/ml}$) de:								
		$\leq 0,125$	0,25	0,5	1	2	4	8	≥ 32	
<i>C. albicans</i> (175)	CIM	0	75	30	62	6	0	2	0	0
	CFM	0	75	0	4	30	46	8	4	8
<i>C. famata</i> (2)	CIM	0	1	1	0	0	0	0	0	0
	CFM	0	0	0	0	1	1	0	0	0
<i>C. guilliermondii</i> (6)	CIM	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	CFM	0	0	0	2	0	2	2	0	0
<i>C. krusei</i> (8)	CIM	0	0	2	2	4	0	0	0	0
	CFM	0	0	0	0	2	6	0	0	0
<i>C. parapsilosis</i> (12)	CIM	0	0	2	8	2	0	0	0	0
	CFM	0	0	0	0	0	4	2	4	2
<i>C. pseudotropicalis</i> (6)	CIM	0	2	4	0	0	0	0	0	0
	CFM	0	0	2	2	0	0	0	2	0
<i>C. tropicalis</i> (18)	CIM	0	0	4	10	4	0	0	0	0
	CFM	0	0	0	0	0	8	6	0	4

Tabela 4 - Sensibilidade de *Candida* à pimaricina.

Levedura (nº de isolamentos)	Teste de sensibilidade	Nº de cepas sensíveis à concentração ($\mu\text{g/ml}$) de:							
		$\leq 0,156$	0,312	0,625	1,25	2,5	5	10	≥ 20
<i>C. albicans</i> (175)	CIM	12	32	24	24	47	18	12	6
	CFM	0	0	2	2	12	10	79	70
<i>C. famata</i> (2)	CIM	0	0	0	0	1	1	0	0
	CFM	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>C. guilliermondii</i> (6)	CIM	4	2	0	0	0	0	0	0
	CFM	4	0	0	0	0	0	0	2
<i>C. krusei</i> (8)	CIM	4	0	2	2	0	0	0	0
	CFM	0	0	0	0	2	0	6	0
<i>C. parapsilosis</i> (12)	CIM	2	0	0	4	0	4	2	0
	CFM	2	0	0	0	0	0	4	6
<i>C. pseudotropicalis</i> (6)	CIM	4	2	0	0	0	0	0	0
	CFM	2	4	0	0	0	0	0	0
<i>C. tropicalis</i> (18)	CIM	0	4	2	2	4	6	0	0
	CFM	0	0	4	0	2	0	4	8

As outras espécies, isoladas em frequências menores que as das acima referidas, são também consideradas de importância médica, e o encontro de uma ou mais delas já foi descrito por outros autores (5, 9, 12, 17). Entretanto, ao contrário do

presente estudo, foram descritos isolamentos de leveduras diferentes de *Candida* (4, 5, 17), incluindo o de algumas consideradas como parte da microbiota transitória de humanos, mas cuja presença em pacientes debilitados pode representar importante problema clínico (7, 13, 16, 17).

É notória a preocupação de diferentes pesquisadores em avaliar apenas a ação inibitória, e não a letal, dos antifúngicos sobre as leveduras isoladas. Tal procedimento pode estar fundamentado no conceito de que o sistema imunológico do hospedeiro atue destruindo o microrganismo patogênico inibido pelo antibiótico, administrado com base em resultados de antibiogramas, ou mesmo, potencializando a ação deste quimioterápido (1, 15), o que tornaria desnecessária a avaliação da concentração "in vitro".

Testes de sensibilidade realizados com leveduras isoladas de pacientes com câncer sob tratamento antineoplásico demonstraram a presença de amostras resistentes à anfotericina B e à nistatina em percentagens consideradas importantes, como 7,4% para ambos antibióticos (5) e 14,5% para o primeiro e 13,0% para o segundo (9). Estes valores são bastante superiores aos obtidos no presente trabalho, onde 2,6% das leveduras, neste caso apenas *C. albicans*, não foram inibidas pela anfotericina B e pela pimaricina e todas o foram pela nistatina, em concentrações consideradas eficazes para cepas sensíveis (5, 9, 18). Entretanto, a incidência de leveduras resistentes à ação letal desses antibióticos foi elevada, alcançando valores iguais a 32,6% frente à anfotericina B, 10,6% frente à nistatina e 38,7% frente à pimaricina. Estes dados podem ser significativos, considerando-se que o sistema imunológico de determinada classe de pacientes pode estar suficientemente comprometido para não exercer suas funções de destruição dos microrganismos inibidos ou de potencialização da droga. Nestas condições, o ideal seria a administração de um quimioterápico que, em concentrações passíveis de serem alcançadas no organismo do paciente, tenha demonstrado ação letal sobre o fungo isolado. Entretanto, a baixa frequência do uso rotineiro de testes de sensibilidade a antifúngicos e as recomendações para o tratamento de infecções por *Candida* com agentes poliênicos (1, 2, 8, 14), sem execução prévia dos referidos testes, têm sido responsáveis por infecções sérias e fatais (1, 6, 10, 16, 21).

Referências Bibliográficas

1. Bodey, G.P. (ed.) - Proceedings of a symposium: Candidiasis: a growing concern. Amer. J. Med., 77(Suppl. 4D), 1-48, 1984.
2. Boggs, D.R.; Williams, A.F. & Howell Jr., A. - Thrush in malignant neoplastic disease. Arch. Intern. Med., 107:354-359, 1961.
3. Casals, J.B. - Tablet sensitivity testing of pathogenic fungi. J. Clin. Path., 32:719-722, 1979.
4. Cho, S.Y. & Choi, H.Y. - Opportunistic fungal infection among cancer patients. A ten-year autopsy. Am. J. Clin. Path., 72:617-621, 1979.
5. Dick, J.D.; Merz, W.G. & Saral, R. - Incidence of polyene-resistant yeast recovered from clinical specimens. Antimicrob. Agents Chemother., 18:158-163, 1980.
6. Dick, J.D.; Rosengard, B.R.; Merz, W.G.; Stuart, R.K.; Hitchins, G.M. & Saral, R. - Fatal disseminated candidiasis due to amphotericin B resistant *Candida guilliermondii*. Ann. Intern. Med., 102:67-68, 1985.
7. Eng, R.H.K.; Duhmel, R.; Smith, S.M. & Goldstein, E.J. - *Saccharomyces cerevisiae* infection in man. Sabouraudia, 22:403-407, 1984.
8. Eras, P.; Goldstein, M.J. & Sherlock, P. - Candida infection of the gastrointestinal tract. Medicine. 51:367-379, 1972.
9. Ghannoum, M.A.; Montawy, M.S.; Mubarak, A.L. & Al-Awadhi, H.A. - Indicende and susceptibility of yeasts isolated from cancer patients in Kuwait. Mykosen, 28:619-624, 1985.
10. Guinet, R.; Chanas, J.; Goullier, A.; Bonnefoy, G. & Ambroise-Thomas, P. - Fatal septicemia due to amphotericin B resistant *Candida lusitaniae*. J. Clin. Microbiol., 18:443-444, 1983.
11. Hurley, R. & Winner, H. - The pathogenicity of *Candida tropicalis*. J. Path. Bact., 84:33-38, 1962.

12. Kiehn, T.E.; Edwards, F.F. & Armstrong, D. - The prevalence of yeasts in clinical specimens from cancer patients. Am. J. Clin. Pathol., 73:518-521, 1980.
13. Kreger-van Rij, N.J.W. - The yeast: a taxonomic study. Amsterdam, Elsevier, 1984.
14. Lavelle, C.L. - Prevention of oral infections in patients receiving cancer therapy. J. Can. Dent. Assoc., 42:551-553, 1976.
15. Lorian, V. (ed.) - Antibiotics in laboratory medicine. Baltimore, Williams & Wilkins, 1980.
16. Rippon, J.W. - Medical mycology. 2 nd. ed. Philadelphia, Saunders, 1982.
17. Sampaio, M.C.C. - Aspectos clínicos da mucosa bucal de pacientes com carcinoma epidermóide de boca. Sua correlação com a microbiota fúngica e sorotipos de *Candida albicans* antes e durante a radioterapia. São Paulo, 1986. (Tese-Doutoramento-Faculdade de Odontologia da USP).
- 18.. Shadomy, S. & Espinel-Ingroff, A. - Susceptibility testing with antifungal drugs. In: E. H. Lennette; A. Balows; W.J. Hausler Jr.; J.P. Truant (eds.). Manual of clinical microbiology. 3rd ed. Washington, D.C., Am. Soc. Microbiol., 647-653p., 1980.
19. Skinner, F.A.; Passmore, S.M. & Davenport, R.R. (eds.) - Biology and activities of yeasts. London, Academic Press, 1980.
20. Wingard, J.R.; Merz, W.G. & Seral, R. - *Candida tropicalis*: a major pathogen in immunocompromised patients. Ann. Intern. Med., 91:539-543, 1979.
21. Woods, R.A.; Bard, M.; Jackson, I.E. & Drutz, D.J. - Resistance to polyene antibiotics and correlated sterol changes in two isolates of *Candida tropicalis* from a patient with an amphotericin B resistant funguria. J. Infect. Dis., 129:53-58, 1974.

PROCESSO DESCONTÍNUO DE SÍNTSE DE AMILOGLICOSIDASE POR *ASPERGILLUS AWAMORI*: INFLUÊNCIA DO pH E DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE POLISSACARÍDEO

Maria Cândida Reginato Facciotti
 Beatriz Vahan Kilikian
 Willibalbo Schmidell
 & Estevão Rosim Fachini (Bolsista FAPESP)

Recebido para publicação em 16/09/88

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

Resumo

Estudou-se a influência da concentração inicial de polissacarídeo (S_0) e do pH na produção de amiloglicosidase por *Aspergillus awamori* NRRL 3112. Foram efetuados ensaios descontínuos, a pH 4,0 e 5,0, em fermentador de 10 litros, empregando-se meio de cultura à base de farinha de mandioca. Através do estudo cinético do processo, verificou-se a partir de $S_0 = 20\text{g/l}$, para ambos os valores de pH, um comportamento acentuadamente crescente da atividade enzimática final no caldo, até se atingir um valor máximo para um determinado S_0 . Verificou-se que esta atividade máxima é significativamente maior a pH 5,0, chegando-se a aproximadamente 7000U/l para $S_0 = 93\text{g/l}$, enquanto que a pH 4,0, obteve-se 2500U/l para $S_0 = 80\text{g/l}$.

Summary

Glucoamylase synthesis in batch process by Aspergillus awamori: influence of pH and initial polysaccharide concentration

The present work presents a study of the influence of pH and initial polysaccharide concentration (S_0) on the amiloglicosidase production by submerged cultivation of *Aspergillus awamori* NRRL 3112. A series of batch runs in 10 liters fermenter were performed, at pH 4.0 and 5.0, employing a culture medium containing cassava flour as the main carbon source. The kinetic study of the process showed significant increase in the final enzymatic activity until attaining a maximum for a given S_0 . It was also observed that this maximum activity was markedly higher at pH 5.0, reaching about 7,000U/l for $S_0 = 93\text{g/l}$, while at pH 4.0 the maximum value was about 2,500U/l for $S_0 = 80\text{g/l}$.

Introdução

A amiloglicosidase ou glicoamilase (α -D-(1,4) glicanglicohidrolase, E.C.3.2.1.3) é, ao lado da protease bacteriana e da α -amilase, uma das enzimas mais produzidas em todo o mundo (1), tendo como principal aplicação a produção de xarope de glicose a partir de matérias-primas amiláceas, com ampla utilização na indústria

alimentícia. É também empregada na produção de etanol a partir de amido.

Embora a amiloglicosidase possa ser produzida por uma grande variedade de microrganismos, apenas aqueles pertencentes aos gêneros *Aspergillus* (*A. niger*, *A. oryzae* e *A. awamori*), *Rhizopus* e *Endomyces* têm sido empregados industrialmente, sendo ainda preferida a glicoamilase de *Aspergillus* por sua maior termoestabilidade (1).

É fato conhecido que a síntese da amiloglicosidase é induzida pelo amido ou por outros polímeros da glicose, tais como, dextrinas, maltose, isomaltose e outros oligossacarídeos (2, 7). Por outro lado, glicose, sacarose, lactose, frutose e galactose, quando empregados como fonte de carbono, causam efeito repressivo quanto à síntese da enzima em questão (3, 8).

Os efeitos indutivo e repressivo são bastante complexos, sendo a intensidade de cada um deles dependente do microrganismo empregado, do meio de cultura e das condições de cultivo, sendo bastante difícil uma separação nítida entre os mesmos.

No presente trabalho buscou-se verificar a influência do pH e da concentração inicial de polissacarídeo nos efeitos de indução e repressão, buscando-se definir as condições que possam levar a uma maior produção da glicoamilase por *A. awamori* NRRL 3112.

Material e Métodos

Microrganismo - Em todos os ensaios empregou-se cultura pura de *Aspergillus awamori* NRRL 3112, conservada em tubos contendo uma mistura de terra e areia (5). Para inocular o fermentador, contendo 9 litros e meio, cultivava-se previamente o bolor em meio sólido de Czapek, e a seguir em meio líquido, em incubador rotativo a 200 r.p.m., a 35°C, durante 24 horas, obtendo-se desta forma, 1 litro de inóculo.

Meio de cultura - O meio de cultura era preparado a partir da farinha de mandioca (4) de maneira a se obter concentrações iniciais de polissacarídeo (S_0) na faixa de 20 a 130g ART/l (ART = açúcares redutores totais, expressos como glicose). Para a complementação do meio adicionavam-se ainda os nutrientes indicados a seguir, em g/l: extrato de levedura - 0,1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,5; $(NH_4)_2SO_4$ - 5,0; $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ - 3,78; KH_2PO_4 - 3,5. Estas concentrações eram utilizadas quando se empregava S_0 = 20g ART/l, aumentando-se as mesmas proporcionalmente em relação ao aumento de S_0 nos vários ensaios.

Ensaios realizados - Foram realizados treze ensaios descontínuos em fermentador, na faixa de valores de S_0 citada anteriormente, mantendo-se a temperatura constante em 35°C, e o pH fixo no valor 4,0 ou 5,0. A vazão de aeração empregada foi de 10l/min, a frequência de agitação, 700 r.p.m., mantendo-se 0,2 atm de sobrepressão no fermentador.

Metodologia analítica - Os ensaios foram acompanhados através de retiradas periódicas de amostras, nas quais se faziam as determinações de concentração celular (X), concentração de glicose, concentração de açúcares redutores totais (ART) e atividade da amiloglicosidase (A). A determinação da concentração celular era feita através da determinação da massa de matéria seca de microrganismos, conforme metodologia tradicional (4). A determinação da concentração de glicose era executada na amostra filtrada, pelo método da glicose-oxidase (4). A determinação da concentração de ART era efetuada através de uma hidrólise enzimática do polissacarídeo presente na amostra, e posterior dosagem de glicose (10). A atividade de amiloglicosidase no caldo era obtida colocando-se uma aliquote da amostra em presença de solução de amido a 4% (pH = 4,2) a 60°C, durante 1 hora, e dosando-se a massa de glicose gerada ao fim deste período (11). Define-se a unidade de atividade (U) como sendo a quantidade de enzima que libera 1 grama de glicose, em 1 hora, nas condições do ensaio padronizado. Além destas determinações, faziam-se ainda, ao longo dos cultivos, medidas da concentração de oxigênio dissolvido, através de eletrodo galvânico.

Tabela 1 - Condições iniciais dos cultivos descontínuos de *Aspergillus awamori* NRRL 3112.

Símbolos: S_0 = Concentração inicial de ART; X_0 = Concentração celular inicial; A_0 = Atividade da amiloglicosidase no instante inicial.

Ensaios	pH	S_0 (g/l)	X_0 (g/l)	A_0 (U/l)
D ₁	4,0	21,0	0,44	31,6
D ₂	4,0	38,3	0,37	24,1
D ₃	4,0	52,8	0,39	31,9
D ₄	4,0	80,2	0,42	15,2
D ₅	4,0	88,6	0,59	22,9
D ₆	4,0	99,6	0,57	16,5
D ₇	4,0	122,5	0,63	16,4
D ₈	5,0	20,0	0,45	25,0
D ₉	5,0	45,0	0,38	31,0
D ₁₀	5,0	58,0	0,33	19,0
D ₁₁	5,0	83,1	0,47	19,6
D ₁₂	5,0	93,0	0,41	29,0
D ₁₃	5,0	130,0	0,50	22,0

Resultados

Na Tabela 1 apresentam-se as condições iniciais de cultivo dos vários ensaios realizados, e na Tabela 2, um resumo dos resultados obtidos.

Nas Figuras 1 e 2, estão indicadas, como ilustração, curvas típicas de concentração celular, atividade da amiloglicosidase, concentração de glicose e ART, para os ensaios D₂ ($S_0 = 38,3\text{g/l}$) e D₆ ($S_0 = 99,6\text{g/l}$), ambos efetuados a pH 4,0. Para os demais ensaios obtiveram-se curvas com aspecto semelhante, observando-se em todos os casos, uma produção de enzima associada ao crescimento, conforme se pode notar na Figura 1. Apresentam-se ainda, na Figura 2, os valores da concentração de oxigênio dissolvido em função do tempo, para os ensaios mencionados.

Discussão

Nas Figuras 3, 4 e 5 indicam-se os valores da atividade máxima da amiloglicosidase (A_{\max}), concentração celular final (X_f), produtividade em células

Tabela 2 - Resumo dos resultados obtidos nos cultivos descontínuos de *Aspergillus awamori* NRRL 3112.

Símbolos: t_f = Tempo para consumo da fonte de carbono; X_f = Concentração celular em t_f ; S_f = Concentração de ART em t_f ; t'_f = Instante em que se atingiu a máxima atividade da amiloglicosidase; S'_f = Concentração de ART em t'_f ; A_{\max} = Atividade máxima da amiloglicosidase, em t'_f .

Ensaios	t_f (h)	X_f (g/l)	S_f (g/l)	t'_f (h)	S'_f (g/l)	A_{\max} (U/l)
D ₁	17	8,1	0,20	16	0,47	470
D ₂	23	11,6	0,20	28	0,17	1823
D ₃	30	13,0	0,28	33	0,28	2297
D ₄	42	14,5	0,39	44	0,39	2480
D ₅	44	14,7	0,86	48	0,53	2076
D ₆	68	14,9	0,70	60	11,26	1190
D ₇	85	16,0	0,19	72	19,57	1660
D ₈	16	9,8	0,50	18	0,50	790
D ₉	26	12,5	0,10	28	0,10	2440
D ₁₀	33	15,5	0,10	39	0,10	4650
D ₁₁	42	15,2	0,18	48	0,18	4864
D ₁₂	52	18,6	0,20	58	0,20	6850
D ₁₃	64	14,9	0,20	72	0,20	5700

Figura 1 - Concentração celular e atividade da amiloglicosidase para os ensaios D₂ e D₆.

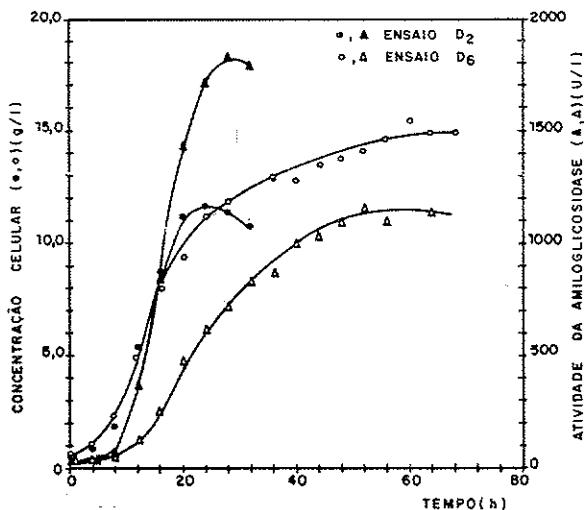


Figura 2 - Concentração de glicose, ART e oxigênio dissolvido para os ensaios D₂ e D₆.

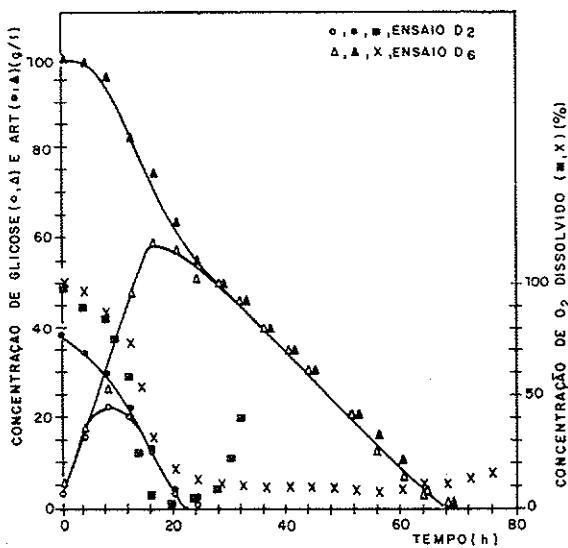
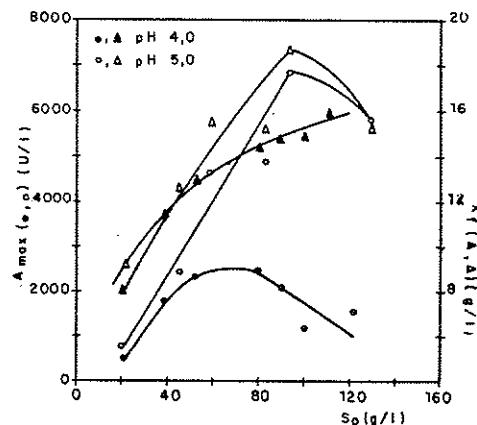


Figura 3 - Atividade máxima da amiloglicosidase (A_{max}) e concentração celular final (X_f) a pH 4,0 e 5,0, em função da concentração inicial de polissacarídeo (S_0).



(P_X), produtividade em enzima (P_A), fatores de conversão substrato a células ($Y_{X/S}$) e substrato a enzima ($Y_{A/S}$), em função da concentração inicial de polissacarídeo (S_0).

As produtividades e os fatores de conversão foram calculados a partir dos dados das Tabelas 1 e 2, através das equações abaixo:

$$P_X = \frac{X_f - X_0}{t_f} \quad P_A = \frac{A_{max} - A_0}{t_f}$$

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f}; \quad Y_{A/S} = \frac{A_{max} - A_0}{S_0 - S_f}$$

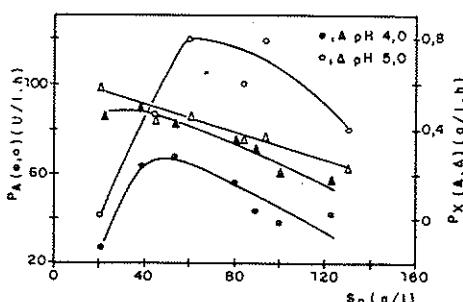
As curvas indicadas nas Figuras 3, 4 e 5, mostram uma influência marcante do pH e de S_0 na síntese de amiloglicosidase por *Aspergillus awamori* NRRL 3112, em processo descontínuo. Em trabalho anterior (9) já havia sido ressaltada a influência sensível do pH, quando então se empregou S_0 igual a 80g/l.

Com relação ao crescimento celular, observa-se pela Figura 3, a obtenção de valores crescentes de X_f , a pH 4,0, à medida que se aumenta S_0 , atingindo-se um valor máximo de 16g/l, para um valor de S_0 da ordem de 120g/l. Por outro lado, a pH 5,0, observam-se valores crescentes de X_f apenas até um valor de S_0 ao redor de 90g/l, passando a decrescer a partir de então. O máximo valor de X_f , a pH 5,0 foi de 18g/l.

As Figuras 4 e 5 mostram, por outro lado, um comportamento decrescente dos parâmetros P_X e $Y_{X/S}$ em função de S_0 , obtendo-se valores ligeiramente superiores para o pH 5,0. Tal comportamento decrescente pode ser entendido como uma consequência da ocorrência de limitação de oxigênio em todos os cultivos efetuados com S_0 acima de 20g/l, conforme indicado na Figura 2, nos quais se atingiu concentrações de oxigênio dissolvido abaixo de 10% (4). Desta forma, os mais altos valores de P_X e $Y_{X/S}$ foram observados para um S_0 da ordem de 20g/l.

Com relação à produção de amiloglicosidase, observa-se, pela Figura 3, para ambos os valores de pH ensaiados, a obtenção de valores crescentes para a atividade enzimática final no caldo, à medida que se aumenta S_0 . Em seguida, atinge-se um valor máximo para um determinado S_0 , passando a decrescer a partir de então.

Figura 4 - Produtividade em enzima (P_A) e em células (P_X), a pH 4,0 e 5,0, em função da concentração inicial de polissacarídeo (S_0).



Verifica-se ainda, que a pH 5,0 este valor máximo é acentuadamente mais elevado do que o obtido a pH 4,0. No primeiro caso obteve-se 6850U/l para $S_0 = 93,0\text{ g/l}$, enquanto no último se obteve 2480U/l, para $S_0 = 80,0\text{ g/l}$.

Deve-se ressaltar também, que estes valores máximos obtidos para a atividade enzimática são significativamente superiores àqueles obtidos com $S_0 = 20\text{ g/l}$, isto é, da ordem de 8 vezes para o pH 5,0, e 5 vezes para o pH 4,0. Portanto, torna-se bastante clara a ocorrência de uma aumento sensível no efeito induutivo, ao se trabalhar com valores crescentes de S_0 .

Por outro lado, a obtenção de valores de atividade acentuadamente mais elevados para o pH 5,0, principalmente numa região de elevados valores de S_0 , conforme indicado na Figura 3, leva a uma hipótese conjunta de uma atuação mais intensa do efeito induutivo, ao lado de um efeito repressivo menor, neste valor de pH.

Tal hipótese pode ser melhor entendida através da Figura 6, onde se comparam os valores das velocidades específicas de produção da amiloglicosidase (μ_A), para dois ensaios efetuados com valores muito próximos de S_0 , a pH 4,0 e 5,0 (ensaios D₃ e D₁₀), nos quais se obtiveram cinéticas de crescimento semelhantes.

Define-se μ_A como:

$$\mu_A = \frac{1}{X} \frac{dA}{dt} \quad (\text{U/g.h})$$

onde X é a concentração celular (g/l) e dA/dt é a velocidade de produção da amiloglicosidase (U/l.h), obtida a partir das curvas de atividade em função do tempo (6).

Nas curvas apresentadas na Figura 6, observa-se nitidamente a existência de duas

Figura 5 - Fatores de conversão substrato a enzima ($Y_{A/S}$) e substrato a células ($Y_{X/S}$), a pH 4,0 e 5,0, em função da concentração inicial de polissacarídeo (S_0).

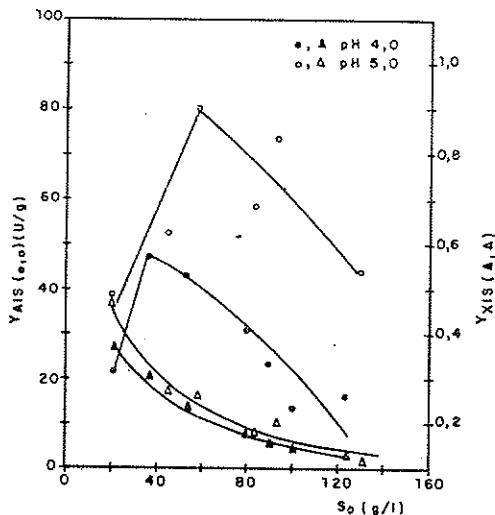
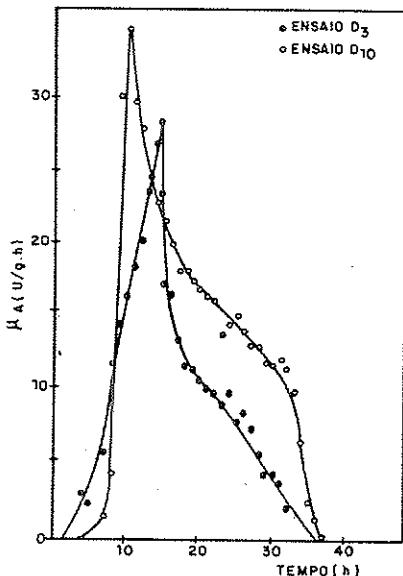


Figura 6 - Velocidade específica de produção da amiloglicosidase (μ_A) em função do tempo, para os ensaios D₃ e D₁₀.



fases: uma primeira, na qual μ_A é crescente, e uma segunda, na qual μ_A é decrescente. A primeira fase corresponde ao período no qual se tem ainda polissacarídeo presente no meio, e portanto uma atuação efetiva do efeito induutivo. A segunda fase, por outro lado, corresponde ao período em que se tem apenas glicose no meio, ou seja, o polissacarídeo foi totalmente hidrolisado. Portanto, a segunda fase corresponde a um período de uma atuação intensa do efeito repressivo exercido pela glicose. Verifica-se pois, pela Figura 6, que os valores de μ_A são sempre superiores para o ensaio a pH 5,0 indicando, portanto, que as células estão mais produtivas do que no ensaio a pH 4,0.

Deve-se observar que esta diferença é particularmente mais nítida na fase de μ_A decrescente, região na qual se tem também valores elevados para a concentração celular. Como decorrência desse fato, resulta uma velocidade global de produção da enzima (dA/dt) sensivelmente maior, e portanto uma atividade enzimática final no caldo muito superior àquela obtida no ensaio a pH 4,0, conforme indicado na Tabela 2.

Finalmente, pode-se observar ainda, pelas Figuras 4 e 5, analogamente ao já observado para as atividades máximas (Figura 3), um comportamento semelhante de P_A e Y_A/S em função de S_0 .

Observa-se a obtenção de maiores produtividades em enzima numa região de S_0 entre 40 a 80g/l para o pH 4,0, e entre 60 a 90g/l para pH 5,0.

Entretanto, deve-se ressaltar que na produção industrial de uma determinada enzima, é de fundamental importância associar-se elevadas produtividades com igualmente elevadas atividades no caldo, a fim de se diminuir os custos nas etapas de recuperação do produto.

Desta forma, analisando-se conjuntamente as Figuras 3 e 4, observa-se que para o pH 4,0, a região ideal de operação de S_0 , em processo descontínuo, seria realmente entre 40 a 80g/l, obtendo-se atividade da ordem de 2000 a 2500U/l. Entretanto para o pH 5,0 seria mais aconselhável trabalhar com um valor de S_0 na faixa de 80 a 120g/l, quando se obtém então valores bastante elevados para a atividade enzimática final no caldo, isto é, da ordem de 6000 a 7000U/l.

Referências Bibliográficas

1. Aunstrup, K. - Production, isolation and economics of extracellular enzymes. In: Wingard Jr., L.B.; Katchalski-Katzir, E. & Goldstein, L., eds. - Appl. Biochem. Bioeng., 2:27-69, 1979.
2. Barton, L.L.; Georgi, C.E. & Lineback, D.R. - Effect of maltose on glucoamylase formation by *Aspergillus niger*. J. Bacteriol., 111:771-777, 1972.
3. Crueger, W. & Cruegger, A. - Enzymes. In: Crueger, W. & Cruegger, A., eds. - Biotechnology: a textbook of industrial microbiology, 161-186p., 1984.
4. Facciotti, M.C.R. - Produção de amiloglicosidase por *Aspergillus awamori* NRRL 3112 em fermentação submersa: estudo do processo semicontínuo e da influência da concentração inicial de polissacarídeo no processo descontínuo. São Paulo, Escola Politécnica da USP, 1986. (Tese de Doutoramento).
5. Greene, H.C. & Fred, E.B. - Maintenance of vigorous mold stock cultures. Ind. Eng. Chem., 26:1297-1299, 1934.
6. Le Duy, A. & Zajic, J.E. - A geometrical approach for differentiation of a experimental function at a point applied to growth and product formation. Biotechnol. Bioeng., 15:805-810, 1973.
7. Ramachandran, N.; Sreekanthiah, K.R. & Murthy, V.S. - Influence of media composition on the production of alpha-amylase and amyloglucosidase by a strain of *Aspergillus niger*. Starch/Starke, 31:134-138, 1979.
8. Sá-Correia, I. & Uden, N. Van. - Production of biomass and amylase by the yeast *Lipomyces kononenkoae* in starch-limited continuous culture. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 13:24-28, 1981.
9. Schimdell, W.; Facciotti, M.C.R.; Kilikian, B.V.; Aboutboul, H. & Aguero, J.M.A. - Influência da oscilação do pH na síntese de amiloglicosidase por *Aspergillus awamori*. Rev. Microbiol. (São Paulo), 19:71-77, 1988.

10. Schimidell, W. & Fernandes, M.V. - Comparação entre hidrólise ácida e enzimática de amido para determinação de açúcares redutores totais. *Rev. Microbiol.* (São Paulo), 8:98-101, 1977.
11. Schimidell, W. & Menezes, J.R.G. - Influência da glicose na determinação da atividade da amiloglicosidase. *Rev. Microbiol.* (São Paulo), 17:194-200, 1986.

AN EPIZOOTIC IRIDOVIRUS OF ORTHOPTERA (GRYLLOTALPIDAE: SCAPTERISCUS BORELLII) AND ITS PATHOGENICITY TO TERMITES (ISOPTERA: CRYPTOTERMES)

Harold G. Fowler

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

Recebido para publicação em 09/12/87

Summary

An iridovirus was repeatedly isolated from field populations of the mole cricket, *Scapteriscus borellii*. In local populations, this iridovirus acts as an epizootic, and attacks all instars of the crickets. This is the first isolation of a naturally occurring iridovirus in Gryllotalpidae. Laboratory tests show that this virus is highly pathogenic to mole crickets as well as to dry-wood termites of the mole crickets as well as to dry-wood termites of the genus *Cryptotermes*. This is also the first virus showing activity against termites.

Resumo

Um iridovírus epizoótico de Orthoptera [Gryllotalpidae: *Scapteriscus borellii*] e sua patogenicidade em cupins [Isoptera: *Cryptotermes*]

Um iridovírus foi isolado várias vezes de populações naturais da paquinha, *Scapteriscus borellii*. Nas populações locais, o iridovírus encontra-se como um epizoótico, atacando todos os estágios das paquinhas. O registro é o primeiro para um iridevirus natural em Gryllotalpidae. Ensaios de laboratório demonstram que o vírus é altamente patogênico à paquinhas, bem como à cupins do gênero *Cryptotermes*. Também, é o primeiro registro para ocorrência de vírus com atividades contra cupins.

Introduction

The iridoviruses are an interesting group of invertebrate pathogens, which have been shown to have activity in certain mollusks, flies, and Lepidoptera (1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11). However, there is only one, apparently undocumented, report of iridoviruses from Orthoptera (7), and no reports of these viruses in Gryllotalpidae. Furthermore, no published information has established the presence of iridoviruses in termites (Isoptera). Iridoviruses have been shown to be quite active in the suppression of certain insect populations (4, 9), and have, therefore, been considered as potential candidates in programs of microbial control of certain pests. This report documents the first naturally occurring iridovirus in Gryllotalpidae, and provides evidence that the iridovirus isolated from mole crickets (Orthoptera: Gryllotalpidae: *Scapteriscus*) is highly infective to mole crickets, as well as showing a strong activity and infectiveness in dry-wood termites (*Cryptotermes*). Mole crickets are major agricultural pests in certain regions of Brazil, the United States, and the Caribbean (3), while the dry-wood

termites are world-wide problems. The characterization and confirmation of this iridovirus can be found elsewhere (2).

Materials and Methods

Occurrence of iridovirus in natural populations of *Scapteriscus borellii* Giglio-Tos

- From 1983 through 1987, collections of mole crickets were undertaken throughout the State of São Paulo. Collections were generally obtained along river banks by digging with a shovel in areas in which mole cricket surface galleries were present. Soil was generally tossed into the river, and mole crickets surfacing were hand-collected and transported to the laboratory for evaluation of pathogenic agents. Further sampling details can be found in (3). Because of the sampling method employed, sample size varied greatly, and no method that could quantify mole cricket densities per m³ of soil could be economically employed, and the present method suffered from variation from one paid student collector to another. Nevertheless, the data collected do provide information on the relative incidence of pathogens and parasites (3). A total of 1,532 individual site collections were performed during this time period, and crickets were held in the laboratory in plastic buckets or individual glass vials filled with moist sterilized sand to screen for any pathogens or parasites present in the field collection.

The characteristic bluish color of crickets infected with iridovirus (2) greatly facilitated its diagnosis. This coloration could even be detected in field collected crickets. Final confirmation was provided by an examination of the haemolymph of newly dead or dying crickets. Under phase contrast, the viral crystals could easily be identified, and corresponded to known characteristics (2).

Infectivity to mole crickets - Freeding transmission studies were performed by placing mole crickets with diagnostic signs of iridoviral infection in buckets of field collected crickets, which had been held for a minimum of 21 days without showing the diagnostic signs of viral or other infections. Crickets are scavengers and tend to feed upon dead conspecifics. A separate series of controls were established by killing healthy crickets and placing these in buckets as before. Depending upon their availability nymphal crickets were tested by size classes, such that a control group of the same size class was available to accompany the experimental group. To assure the availability of virus for future tests, due to the inavailability of cell tissue cultures, infected crickets were frozen and used as needed.

One small-scale field study was undertaken by releasing diagnostically infected, but not dead, crickets into a small sandy beach of the Corumbataí River, in Rio Claro, SP, in June, 1987. The beach, 3 x 15m, had a relatively large mole cricket population, as evidenced by the amount of subsurface galleries present. Thereafter, weekly samples were performed by excavation with a shovel. The total number of bluish crickets, as well as the total number of crickets collected, were recorded. Captured crickets, both healthy and diagnostically infected with virus, were then released again into the beach.

Infectivity to termites - The idea that the iridovirus could be pathogenic to termites was to an accidental contamination. Filter paper, which had been placed in petri plates as incubation chambers for diseased crickets, was inadvertently placed in a laboratory culture of the dry wood termite, *Cryptotermes brevis* (Walker). Within 2 weeks, the culture was decimated, with dying termites exhibiting the characteristic bluish coloration of an iridoviral infection. Examination of the haemolymph of the dying termites under phase contrast revealed the presence of diffraction patterns characteristic of viral infections (2, 8). Tests were restricted to this species of termite, as it was the only one in culture in laboratory.

To visualize eventual virus particles, haemolymph or homogenate from fat bodies were centrifuged, and examined as a "wet mount" preparation in a transmission electron microscope (Zeiss EM 9 S-2). Additional tissues were fixed in

cacodylate-buffered glutaraldehyde and sent to Florida for more detailed studies (see ref. 2).

To confirm this accidental finding, cultures of *C. brevis* (each approximately with 50 workers) established in plywood sections in plastic refrigerator containers were tested in the following manner. Mole crickets with characteristic iridoviral diagnosis were macerated in insect saline solution, and the solution was then filtered through filter paper to retain fat and skeletal debris. The filtrated was then thoroughly agitated and applied evenly over a filter paper in a sterilized petri plate. When almost dry, the filter paper was placed into a termite culture as a food source, or bait. Controls consisted of using mole crickets without diagnostic iridoviral infections, and repeating the procedure as before. A total of 3 experimental and 3 control cultures were evaluated. Evaluation consisted of culture examination every 1 to 3 days over period of 3 weeks. Because the number of *C. brevis* workers varied from culture to culture, evaluation was expressed as the rate of death.

Final confirmation that the virus was the causative agent of death was performed by injecting the haemolymph of infected individuals into healthy individuals of separate cultures with a microsyringe (approximately 0.5 cc). These termites were then followed closely by visual examinations until death.

Results

Incidence - Although definitive confirmation was only obtained in May, 1985, records of field collections of crickets before this date, and especially during 1985, revealed that at least 58 collections, plus an additional 33 collections in 1986-1987, had symptoms resulting in death which characteristic of iridoviral infections. These symptoms, in the advanced stage of infection, included a bluish coloration of the abdomen, and especially of the fat bodies, a swollen abdomen, and reduced levels of activity. Thus, although only 91 of 1,532 site collections, which varied in the number of crickets collected from 1 to more than 200 individuals, could be definitely confirmed to possess symptoms of iridoviral infections (4%), in the individual collections mortality ranged from 72% to 100% with 3 weeks of laboratory screening. These levels are characteristic of an epizootic. Electron microscope studies (Figure 1) indicated the presence of presumptive viral particles with hexagonal profile, 150-170nm in diameter in the crude preparations. Similar particles were also observed by Boucias & Col. (2) in tissue sections from infected mole cricket. These data are additional evidences that the disease affecting mole cricket is viral in nature, and that the virus is an iridovirus.

Of the 91 collections with confirmed iridoviral presence, 31 were during June-August, 29 in September-November, 18 in March-May, and 13 in December-February. As the sampling effort was not uniform, especially during 1986 and 1987, and as many collections were performed by paid student labor, no statistical studies of seasonal incidence were performed. Nevertheless, the incidence of iridoviral infections did appear to be more pronounced during the cooler months of the year.

Figure 1 - Electron micrograph of iridovirus isolated from *Scapteriscus borellii*. Magnification is 5.7×10^2 .

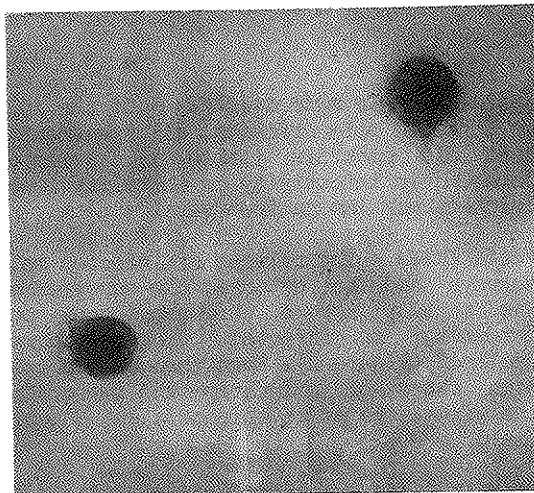


Figure 2 - The progression of iridoviral incidence in an experimental field population of *Scapteriscus borellii*. In week 1, 5 infected crickets were introduced into the population.

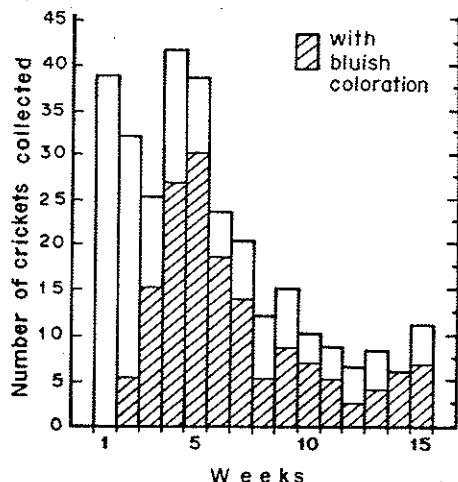


Table 1 - Results of paired tests, using freshly killed iridoviral infected and healthy mole crickets as baits in feeding tests for mortality. The mortality is expressed as the number of dead or missing crickets after 3 weeks. In all cases, the number of crickets in control and experimental groups is the same. Cricket size is expressed as the maximal pronotal length.

Symbols: * = Number of crickets given iridovirus = number of crickets given control baits; ** = $P \leq 0.01$ for all tests.

Pronatal length (mm)	Number tested*	Mortality after 3 weeks		G statistic**
		control	iridovirus	
3.0	20	0	18	42.0477
3.0	26	4	25	40.5912
3.0	32	3	30	53.7854
3.1 - 6.0	18	0	15	32.6809
3.1 - 6.0	20	2	20	42.0476
3.1 - 6.0	20	2	20	42.0476
6.1 - 9.0	20	4	20	33.8248
6.1 - 9.0	45	12	39	35.6288
9.0	33	5	30	43.0750
9.0	19	2	17	27.1054
Overall	253	34	234	365.0800

Infectivity to mole crickets - Of the 10 paired comparisons with feeding healthy or infected mole crickets, all treatment groups had consistently higher mortalities than did controls (Table 1). Irrespective of cricket size, no differences were detected in infectivity or mortality (Table 1), indicating that no size class of crickets was immune from viral attack.

Field tests - The release of infected mole crickets into an area in which previous surveys had not detected the occurrence of iridovirus demonstrated that the virus was rapidly spread throughout the population (Figure 2). Furthermore, the percentage of infected crickets increased exponentially, while the population declined (Figure 2). Even though mole cricket populations are highly fluid, with high rates of emigration and immigration, these preliminary results suggest that the virus acts as an epizootic and quickly reduces mole cricket populations in the field.

Termite tests - Feeding studies indicated that the iridovirus spreads rapidly among termite colonies with an accompanying high mortality (Figure 3). This spread may be further assisted by partial cannibalism and through anal trophallaxis, as well as by the highly aggregated nature of colony organization.

Dead termites demonstrated the same general symptoms as found in mole crickets: bluish coloration and swollen abdomens. Injection of haemolymph of infected termites into healthy termites produced the same symptoms and death within 5 to 20 days.

Discussion

The pathological and clinical characteristics of the virus is in agreement with those of the invertebrate iridoviruses (5, 10). This iridovirus was also found to possess the same effect and diagnostic symptoms in the not closely related mole crickets and dry wood termites. However, a broad host spectrum is also

characteristic of the iridoviruses (5, 9, 11). Characterization of the virus by Dr. Drion Boucias, obtained through a project with ESALQ (personal communication), suggests that this virus is quite different from other known invertebrate iridoviruses based upon restriction enzyme profiles and DNA molecular weights.

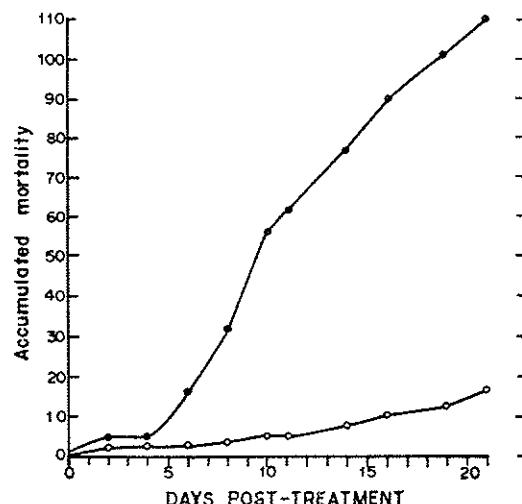
The wide host spectrum exhibited by most iridoviruses (9, 10), complicates their usage in microbial control programs. However, this spectrum is probably no greater than that found in the widely used fungal pathogens of insects, *Metarrhizium anisopliae* Sorok and *Beauveria bassiana* Vuill (1, 8). As such, it is possible that the virus could be propagated for application in areas of high mole cricket density, with corresponding high levels of mole cricket damage, such as in the seasonal flood plain regions of the Amazon. Possibly, this application could be through the release of previously infected crickets into high density populations. As mole crickets are scavengers and eat dead conspecifics as well as vegetation, and that populations tend to be aggregated in the field, viral control may indeed be possible. Although we have not yet performed field collections on a large scale in the Amazon and are therefore uncertain of the occurrence of the virus in that region, its epizootic nature in field populations of mole crickets in São Paulo is promising. This suggests that other components of the soil fauna have coevolved with the virus, and that this virus may be the major factors limiting mole cricket populations in central Brazil, where mole crickets are not economic problems. Therefore, the environmental risks of its introduction into the Amazon are probably less than for its introduction into the Caribbean or North America, where introduced populations of mole crickets are serious economic pests. Studies on its occurrence and infectivity in pest and nonpest soil arthropods of the Amazon, as well as on the mole cricket species which are pests, *Neocurtilla hexadactyla* Perty and *Scapteriscus didactylus* Scudder, must be performed before its release into the region is attempted. In particular, its effect on other components of the soil meso-fauna must be carefully evaluated well in advance. In spite of these restrictions, this iridovirus might provide a viable economic alternative to solving a major pest problem of the Amazon, as the chlorinated hydrocarbon pesticides are now banned and no economic alternative is presently available in the market.

The results with the dry wood termite, *Cryptotermes brevis*, are highly promising. This termite is an exotic species in Brazil, and is primarily limited to urban areas where it attacks wooden furniture and finishings. Further studies could be directed toward its formulation into a termite microbial insecticides for spot treatments against this important, and ever expanding, pest termite.

Acknowledgments

I thank Dr. Otavio Pavan of UNICAMP for initially confirming that an iridovirus was responsible our field mortality, and Dr. Drion Boucias and Dr. Sergio Alves for

Figure 3 - The total accumulation mortality in laboratory cultures of *Cryptotermes brevis* exposed (closed circles) or not (open circles) to iridovirus in filter paper baits. Shown is the total mortality of 3 experimental cultures and 3 control cultures (approximately 150 termites for both controls and experimental treatments).



follow-up work and encouragement. The assistance of Dr. Carminda da Cruz Landim in providing electron micrographs of the virus is graciously acknowledged. João Justi assisted greatly in field collections and Maria Teresa Vieira de Camargo in the laboratory. This study was financed in part by the USDA (Grant nº 83-CRSR-2-2162). I thank my wife and children for enduring hard times because of this work, but they made conditions much more pleasurable.

References

1. Alves, S.B. - Vírus entomopatogênicos. In: Alves, S.B. - Controle Microbiano de Insetos. São Paulo, Ed. Manoel, 171-187pp. 1986.
2. Boucias, D.G.; Maruniak, J.E. & Pendland, J.C. - Characterization of an iridovirus isolated from the southern mole cricket, *Scapteriscus vicinus*. *J. Invertebr. Pathol.*, 50, 238-245, 1987.
3. Fowler, H.G. - O controle natural das paguinhas neotropicais (Orthoptera: Gryllotalpidae: *Scapteriscus* e *Neocurtilla*). *Actas X Congr. Latinoamericano Zool.*, Vol. II, (no prelo).
4. Fuxa, J.R. & Tanada, Y. - Epizootiology of insect diseases. New York, Wiley and Sons, 1987.
5. Hall, D.W. - Pathobiology of invertebrate icosahedral cytoplasmic deoxyriboviruses (Iridoviridae). - In: *Viral insecticides for Biological Control*. New York, Academic Press, 163-196p., 1985.
6. Marmarosch, K., & Sherman, K.E. - *Viral insecticides for Biological Control*. New York, Academic Press, 1985.
7. Martignoni, M.E. & Iwai, P.J. - A catalog of viral diseases of insects, mites and ticks. 4th Ed. Gen. Tech. Rep. PNW-195, Portland, OR, USDA Forest Ser. Pac. Northwest Res. Stn., 51p., 1986.
8. Poinar, G.O. & Thomas, G.M. - Diagnostic manual for the identification of Insect Pathogens. New York, Plenum Press, 1978.
9. Stairs, G.O. - Use of virus for microbial control of insects. In: Burges, H.D. & Hassey, N.W. - *Microbial Control of Insects and Mites*. New York, Academic Press, 97-124p., 1971.
10. Tinsley, T.W. & Kelly, D.C. - Taxonomy and nomenclature of insect pathogenic viruses. In: Marmarosch, K. & Sherman, K.E. - *Viral Insecticides for Biological Control*, New York, Academic Press, 3-25p., 1985.
11. Vaughn, T.L. - Virus and rickettsial diseases. In: Cantwell, G.E. - *Insect Diseases*, Vol. I. New York, Marcel Dekkens, Inc., 49-85p., 1974.

EPIDEMIOLOGY OF RABIES IN CHILE, 1950-1986: A DESCRIPTIVE STUDY OF LABORATORY - CONFIRMED CASES

Santiago Ernst M.

Institute of Preventive Veterinary Medicine
Faculty of Veterinary Sciences
Universidad Austral de Chile
Casilla 567. Valdivia. Chile

Recebido para publicação em 26/01/88

& Fernando Fabrega G.

Institute of Public Health
Ministry of Health
Marathon 1000. Santiago. Chile

Summary

From 1950 to 1986, 5309 cases of rabies in man and animals were laboratory-confirmed in Chile. The main geographical area of rabid infection was the central part of the country, especially the V Región and the Metropolitan Region. Rabies occurred mainly in dogs in an urban cycle; however, between 1985 - 1986 a sylvatic cycle appeared with cases in insectivorous bats (*Tadarida brasiliensis*). The temporal pattern of the disease shows three periods: one from 1950 to 1960 with an increasing trend and a cyclical component. The other from 1961 to 1970 with a decreasing trend, and the last one from 1971 to 1986 characterized by a low frequency with irregular fluctuations. No cases were detected in 1982 and 1984. Factors related to the geographical, temporal and host-species variations are discussed.

Resumo

No Chile, entre os anos 1950 e 1986, 5309 casos de raiva humana e animal foram confirmados pela laboratório. Os casos distribuiram-se geográficamente na região central do país, especialmente na V e na Região Metropolitana. A doença apresentou-se especialmente em cães, em um ciclo urbano, porém, entre 1958 e 1986, um ciclo silvestre adquiriu grande importância encontrando-se casos de raiva em morcegos insetívoros (*Tadarida brasiliensis*). A distribuição de raiva, ao longo do período estudado, pode ser dividida em três fases. A primeira, de 1950 a 1960, caracterizada por frequência ascendente e uma variação ciclica quinquenal. Na segunda fase, de 1961 a 1970, observou-se tendência descendente e na terceira, de 1971 a 1986, a doença se apresentou em baixa frequência, com variações irregulares. Não foram detectados casos de raiva nos anos 1982 a 1984. São discutidos os fatores responsáveis pela distribuição espacial, temporal e por espécie animal.

Introduction

Rabies continues to be a serious health and economic problem despite the measures taken in recent decades. This is true particularly in Latin America where urban rabies predominates with a large number of cases in human beings and domestic animals. In the Americas, between 1970 and 1979, a total of 2412 cases of the disease were reported in humans and 167746 in dogs. Over 370000 persons are bitten each year and an average of 260000 require treatment. In the vast majority of instances, dog bites are responsible for rabies in man, as well as for many wounds requiring prophylactic antirabic treatment together with medical and surgical care (7). In Latin America only Uruguay, Barbados, Jamaica and some Caribbean islands are free of rabies (2).

This report review the incidence of rabies in Chile and the control measures taken during the 37 - year period from 1950 to 1986. It also identifies some factors related to the endemicity of the disease.

Material and Methods

Data concerning the total number of laboratory-confirmed cases of rabies between 1950 to 1986 were gathered retrospectively from the records of the Institute of Public Health, Ministry of Health, the rabies diagnostic center for the whole country. Information concerning the geographical origin of samples, date of diagnosis and type of animal affected was also obtained.

During this 37-year period the laboratory introduced a change in its diagnostic techniques for rabies. Initially, examination (Seller's stain) of brain tissue for Negri bodies was combined with the mouse inoculation technique. Later, the fluorescent antibody technique was substituted for the Negri body examination. The retention of mouse inoculation as the definitive technique provides the necessary basis for maintaining comparability of the data collected with the two techniques (5).

The method consisted of the epidemiological description of the distribution of cases of rabies in the period studied according to the geographical location, hosts involved and year of diagnosis. For the purpose of the geographical analysis, the country was divided into twelve general regions (I to XII) plus one Metropolitan Region (Figure 1) (3).

Figura 1 - Schematic map of Chile.

Results

A total of 5309 cases of rabies were laboratory-confirmed in Chile for the 1950 - 1986 period.

The disease was limited mainly to the central regions of the country from the V to the IX Regions. The major concentration of cases was recorded in the V Region (18.6%) and in the Metropolitan Region (51.8%). The I Region, the region farthest north, bordering with Perú, contributed 0.2 percent of the total number of positive diagnoses. The situation of rabies in this region was unique with sporadic outbreaks in 1961, 1977, 1979 and 1980. During the 1960 - 1969 decade, cases decreased in the II, IV, V and X Regions. Areas free of the zoonosis included the III, XI and XII Regions (Table 1).

Dogs accounted for 4483 (85.7%) of all the cases of rabies, showing that this

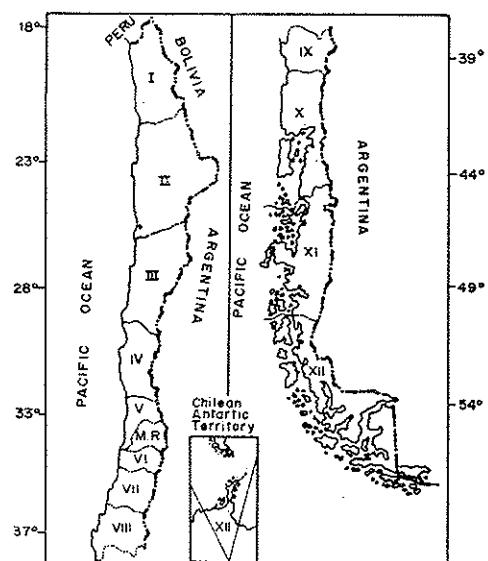


Table 1 - Cases of rabies in all species by years and by regions, Chile 1950-1986.

YEARS	REGIONS												TOTAL	
	I	II	III	IV	V	M.R.	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	
1950	-	-	-	-	84	316	7	11	13	9	7	-	-	447
1951	-	-	-	-	50	151	15	3	14	2	6	-	-	241
1952	-	-	-	-	31	98	10	-	13	7	8	-	-	167
1953	-	-	-	-	11	111	8	1	14	9	-	-	-	154
1954	-	-	-	-	13	230	7	6	8	5	2	-	-	271
1955	-	-	-	-	45	378	18	5	30	9	2	-	-	487
1956	-	-	-	1	27	155	25	28	9	11	2	-	-	258
1957	-	-	-	-	38	69	11	20	8	12	-	-	-	158
1958	-	-	-	-	44	62	13	11	24	23	-	-	-	177
1959	-	-	-	-	77	107	26	4	36	17	-	-	-	267
1960	-	-	-	20	159	354	30	11	32	22	1	-	-	629
1961	-	-	-	12	125	300	64	13	46	18	2	-	-	580
1962	-	26	-	2	155	99	46	45	50	20	-	-	-	443
1963	-	3	-	-	59	54	68	42	14	5	-	-	-	245
1964	-	16	-	-	41	36	69	42	19	7	-	-	-	230
1965	1	11	-	-	13	38	23	27	31	8	-	-	-	152
1966	-	1	-	-	6	34	11	13	14	2	-	-	-	81
1967	-	-	-	-	2	29	2	5	12	7	-	-	-	57
1968	-	-	-	-	-	45	6	1	8	8	-	-	-	68
1969	-	-	-	-	-	16	4	1	8	2	-	-	-	31
1970	-	-	-	-	-	4	2	-	4	5	-	-	-	15
1971	-	-	-	-	-	7	10	-	1	3	-	-	-	21
1972	-	-	-	-	-	5	5	-	1	6	-	-	-	17
1973	-	-	-	-	-	5	2	-	1	12	-	-	-	20
1974	-	-	-	-	-	5	-	-	-	2	-	-	-	7
1975	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	2
1976	-	-	-	-	-	2	-	1	3	4	-	-	-	10
1977	7	-	-	-	-	3	1	2	-	7	-	-	-	20
1978	-	-	-	-	-	5	-	-	1	1	-	-	-	7
1979	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	2
1980	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
1981	2	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	6
1982	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
1983	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
1984	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
1985	1	-	-	-	6	13	1	-	-	-	-	-	-	21
1986	-	-	-	-	-	15	-	1	-	-	-	-	-	16
TOTAL	12	57	-	35	986	2.748	484	294	420	343	30	-	-	5.309
3	0.2	1.1	0.0	0.6	18.6	51.8	9.1	5.5	7.9	4.6	0.6	0.0	0.0	100

species is the principal recognized transmitter of rabies in Chile. The disease was also diagnosed in other carnivores. Two hundred and twenty five cats were found rabid. They constituted 4.3 per cent of laboratory-confirmed cases. Rabies was detected in other domesticated animals, but the relative role of these species as reservoirs of rabies and sources of human infection was minor. A total of 523 cases were diagnosed: 374 (7.2%) in cattle and 149 (2.8%) in other species including horses, swine, sheep, goats and wild animals. Only one case of wildlife rabies in a grey fox (*Dusicyon griseus*), was detected in the 1950 - 1984 period; but in 1985 - 1986 the first cases in bats were reported, affecting 25 insectivorous bats (*Tadarida brasiliensis*). Between 1950 - 1986, seventy eight cases of human rabies were confirmed by the laboratory (Table 2).

The temporal pattern of the disease shows three periods in the years under review: 1950 to 1960; 1961 to 1970 and 1971 to 1986. The trend of rabies from 1950 to 1960 showed a slight increase over the years. A five year cycle was evident in this period; this cycle was aborted in 1965. Starting in 1961, a downward trend appeared. In 1983 the disease occurs sporadically and no cases were detected in 1982 and 1984 (Figure 2).

Discussion

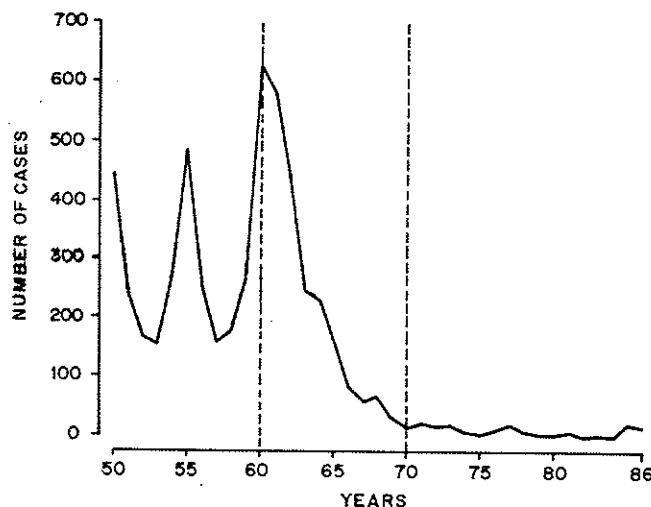
Rabies has been an important public health hazard in Chile with many cases of the

Table 2 - Laboratory-confirmed cases of rabies by species, Chile 1950-1986.

Symbols: C = Canine; B = Bovine; F = Feline; O = Other.

YEARS	A N I M A L				HUMAN	TOTAL
	Total	C	B	F		
1950	436	385	30	19	2	447
1951	235	202	14	18	1	241
1952	164	139	14	5	6	167
1953	153	142	3	4	4	154
1954	267	240	20	5	2	271
1955	476	436	16	9	15	487
1956	254	211	21	8	14	258
1957	156	130	13	9	4	158
1958	173	144	19	9	1	177
1959	261	216	20	19	6	267
1960	623	558	28	28	9	629
1961	575	510	31	22	12	580
1962	440	374	29	25	12	443
1963	243	204	21	11	7	245
1964	225	187	26	8	4	230
1965	151	126	16	4	5	152
1966	80	60	7	5	8	81
1967	57	52	4	1	-	57
1968	68	56	6	3	3	68
1969	30	26	3	1	-	31
1970	15	12	2	-	1	15
1971	20	16	4	-	-	21
1972	16	8	7	-	1	17
1973	20	10	8	1	1	20
1974	7	3	1	2	1	7
1975	2	2	-	-	-	2
1976	10	4	3	1	2	10
1977	20	12	4	2	2	20
1978	7	4	3	-	-	7
1979	2	2	-	-	-	2
1980	1	-	1	-	-	1
1981	6	6	-	-	-	6
1982	-	-	-	-	-	-
1983	1	1	-	-	-	1
1984	-	-	-	-	-	-
1985	21	-	-	2	19	21
1986	16	5	-	4	7	16
TOTAL	5231	4483	374	225	149	5309
%	100	85.7	7.2	4.3	2.8	-

Figura 2 - Cases of rabies in Chile, 1950-1986.



disease diagnosed in the central regions of the country. Several factors have helped to sustain its endemicity in the V to the IX Regions. Among others, the high incidence and persistence of dog rabies in relation to dog population densities and demography, particularly with the ever-increasing stray dog population in the major urban centers.

In Chile, rabies constitutes an essentially urban problem, propagated primarily by dogs. This situation becomes more critical in the fastly-growing surrounding areas of large and medium-sized cities where a poorly controlled stray dog population is fastly expanding. Large numbers of free-roaming dogs are a common sight in Santiago, the capital city, and other large cities such as Valparaíso (Region IV), Concepción (Region VIII) and Temuco (Region IX). Some of these dogs may be traceable to private owners, but most are truly stray, with no anti-rabies vaccination history. From 1950 to 1986, this susceptible stray dog population played a crucial role in the spreading of the disease.

Urban rabies is a problem in almost all Latin American and some Caribbean cities. Dogs and cats account for more than 96 percent of the animal cases and are responsible for almost all human cases. The incidence of rabies in dogs between 1970 to 1980, ranges between 0 and 793 for every 100,000 dogs in the major cities. Annual average for the decade in Latin America and the Caribbean were over 18,000 dogs with rabies and more than 300,000 persons treated with post-exposure vaccination (1). The data accumulated in this survey show that dogs accounted for 85.7 percent of all cases diagnosed in the laboratory, showing that this species is the principal recognized reservoir and transmitter of rabies in Chile.

Although rabies has been reported in cats, cattle, sheep, swine, goats and horses, the number of cases has been relatively small. While it would be possible for these domestic animals to transmit the disease to other animals, epidemiologic evidence suggests that they are not important in maintaining the disease.

One case of wildlife rabies was registered in the 1950 - 1984 period in a grey fox (*Dusicyon griseus*). In Chile, foxes are distributed in all the territory, but their density is low. Thus, rabies in the fox population is not self-perpetuating. The source of infection in the only case diagnosed was probably a dog, species which is used in great numbers to hunt foxes. During 1985 - 1986 a sylvatic cycle was evident with rabies in insectivorous bats (*Tadarida brasiliensis*); 25 cases were reported during these two years. Rabies in bats had not been previously described in Chile, but the disease probably existed unnoticed for several decades or more before it was reported. This situation has been described in countries where urban rabies is controlled. Wildlife rabies emerges as a new threat for man and domestic animals.

In the period studied, 78 human cases of rabies were registered. There was a general decline in incidence of rabies in man; from 11 cases reported in 1950 to nil in 1972. This decline is undoubtedly a reflection of measures directed towards the prevention of human cases: the observation of suspected animals for clinical detection of rabies, the post-exposure vaccination of persons, and a successful control program that brought about a reduction of the incidence of the disease in dogs, the greatest single source of infection for man. It has been shown that there is a very close relationship between the number of canine rabies cases and resultant cases in humans, and that when dog rabies is controlled, the number of cases in people drops correspondingly (4).

Mass immunization of dogs and elimination of stray dogs have been shown to be effective measures to interrupt the canine transmission cycle and to prevent the occurrence of rabies in man. Successful national programmes in the past have been reported, for instance in Hungary (1935-1944), Japan (rabies-free since 1956) and Malaysia (1953-1956) (8). In the United States a nation wide rabies control program (1950-1965) interrupted the urban cycle of dog-to-dog transmission, in spite of a steadily increasing dog population. Panama City began a successful program in 1957 and has remained practically free of urban rabies. Effective programs against urban rabies were carried out in such large cities as Bogota and Cali, Colombia, in 1976-1977; and Lima, Perú in 1973-1974. Recently, Argentina has reported that between 1977 and 1982 canine rabies in the province of Buenos Aires, causing 90 percent of the total national cases in the past, has been almost completely

eliminated (1).

In Chile, from 1950 to 1960 a control program was implemented in the cities with highest incidence of human and canine population density. This program included elimination of stray dogs and vaccination of dogs with the avian-embryo Flury strain (IEP) vaccine. During the decade that followed (1961-1970), mass-production of suckling mouse brain rabies vaccine for human and animal use was started. The house-to-house mass vaccination of dogs with complete coverage of residential neighbourhoods every two years or when focal outbreaks appeared between regularly scheduled campaigns was introduced in all the regions with endemic rabies. Removal of dogs not in compliance was an important measure immediately following completion of vaccination of a neighbourhood. During the last years of the decade, neighbourhood vaccination centres were established mainly in low-income high density areas.

A surveillance system was implemented in 1976, based on an increased number of randomly collected samples from the greater risk areas and from those that had ceased to be so over the past few years. In 1977, the international surveillance system reported the existence of rabies in the south of Perú. During the second half of that year, the first cases were reported in the northern city of Arica, in the I Region, near the border with Perú. Epidemic outbreaks occurred in the area surrounding Arica in the years 1977, 1979 and 1981, causing public concern and calling for great efforts of control and surveillance.

In the II Region a 5-year outbreak was originated in 1962 caused by dog brought in from the southern regions where rabies is endemic; the only case reported in the I Region in 1965 was a consequence of this epidemic. A similar situation occurred in the IV Region where cases informed for the year 1956 and the period 1960-1962 were a result of the concurrently increase of rabies in the V Region.

Areas free of the zoonoses included the III, XI and XII Regions. Scozia (1966) verifies the same situation for the period 1936-1950, all of which ratifies, with certitude, that these regions have been free from the disease during the last 45 years.

The results of the temporal distribution point to the existence of three different periods: one from 1950 to 1960, the other from 1961 to 1970, and the last one from 1971 to 1986. The trend of rabies from 1950 to 1960 shows a slight increase over the years due to the fact that the growth of the canine population kept pace with that of human population, specially in urban areas. Mention should also be made, of the absence of systematic activities in order to attain the control of rabies during most of this period. As an important aspect of the pattern of rabies in Chile a cyclical component was evident from 1950 to 1960. The cyclic behavior of the disease was seen to have a frequency of five years. A common explanation is that there are changes in the composition of the dog population, mainly in the urban centers, which influence the general cyclical pattern. Periodically, every five years, increasing number of susceptible animals are found, creating situations conductive to epidemic outbreaks (6). This cycle was aborted in 1965, and starting in 1966 the disease appeared with a sharply decreasing trend.

The results, as reflected by the incidence of human and animal rabies, show an acceleration of the favourable trend described earlier, particularly during 1980 to 1984, period characterized by a low frequency with irregular fluctuations. These changes in the situation was made possible through the annual implementation of an intensive control program with increasingly ambitious goals and more significant achievements. In 1983 only one case occurred, and no cases were detected in 1982 and 1984, but in 1985 and 1986 a changing pattern appeared with cases in insectivorous bats and the resumption of rabies in dogs and cats.

At this stage one can conclude that rabies is a declining infection in Chile, but it remains a public health problem which should be duly taken into account in health programs.

While rabies is limited principally to the central regions of the country, areas free of the disease should continue to be closely monitored. Control measures must be maintained in the northern border while rabies continues to exist in the south of Perú.

The systematic gathering of samples at the regional level should be an early

warning system to alert health officials of a new potential of a rabid epidemic. In addition to this, continual dog immunization and selected removal of unvaccinated dogs must be maintained in the endemic areas, in order to reduce the population of susceptible dogs, the main reservoir of the disease in the country.

The health hazards associated with rabies in insectivorous bats is still not clear, because rabies in wildlife has not been fully investigated in Chile.

References

1. Acha, P. - A review of rabies prevention and control in the Americas, 1970 - 1980. Overall status of rabies. Bull. Off. Int. Epiz., 93:9-52, 1981.
2. Acha, P. & Szyfres, B. - Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales. 2 ed. Washington, D.C. Organización Panamericana de la Salud, Publicación Científica nº 503, 1986.
3. Chile, Comisión Nacional de la Reforma Administrativa - Nueva división político - administrativa de la República de Chile. Santiago, 1979.
4. Fekadu, M. - Rabies in Ethiopia. Am. J. Epidemiol., 115:266-273, 1982.
5. Kaplan, N.M. & Koprowski, H. - Laboratory techniques in rabies. 3r. ed. Geneva. WHO Monograph Series nº 23, 1973.
6. Scozia, A. - Análisis epidemiológico de la rabia en Chile. Santiago, Universidad de Chile, 1986 (Tesis de Licenciatura).
7. Szyfres , L.; Arrossi, J.C. & Marchevsky, N. - Rabia urbana: el problema de las lesiones por mordedura de perro. Bol. Of. Sanit. Panam., 92:
8. World Health Organization (WHO). - Guidelines for dog rabies control. Document WHO/UPH/83. 43, Geneva.

"DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DO ABORTO EQUINO A VÍRUS ATRAVÉS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA E SORONEUTRALIZAÇÃO"

Ivanete Kotait
 Zélia M.P. Peixoto
 Luzia H. Queiroz
 Elenice M.S. Cunha
 Maria Conceição A.M. Souza
 Romeu Macruz
 & Carmem A. de Freitas

Recebido para publicação em 07/03/88

Instituto Biológico
 Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252
 Caixa Postal 7119
 01051 São Paulo SP

Resumo

Descreve-se a adaptação da técnica de imunofluorescência direta e da microtécnica de soroneutralização, em cultura de células de linhagem VERO, para o diagnóstico do aborto equino a vírus. Amostras de lesões pulmonares, hepáticas e esplênicas de fetos abortados, que foram positivas pela técnica de imunofluorescência direta, acarretaram lesões em camundongos adultos, quando inoculadas por via intracerebral. Pulmões, fígado e coração dos animais inoculados revelaram lesões características de infecção pelo vírus do aborto equino, quando submetidos ao exame histopatológico. Em 159 amostras de soro de animais clinicamente suspeitos da doença, foi possível a detecção de anticorpos específicos, através da soroneutralização pela microtécnica, utilizando-se como antígeno a amostra A4/72 do vírus do aborto equino. Sugere-se este procedimento para a pesquisa de animais portadores, como medida de controle da enfermidade.

Summary

Laboratorial diagnosis of Equine Virus Abortion through immunofluorescence and serumneutralization test

In this paper it is described the standartization of direct immunofluorescence and serumneutralization test, in VERO cells, for the diagnosis of Equine Virus Abortion. Using fluorescent antibodies and inoculation in adult mice it was detected positive reaction in lung, liver and spleen from aborted fetus. Organs from these animals showed tipical lesions of equine virus abortion by histopathology. It was also detected the presence of antibodies in serum colected from suspected mares. It's sugested the study of carriers, throught serology to disease's control.

Introdução

O aborto equino ou rinopneumonite equina é causado por um vírus da família Herpesviridae, da subfamília Alphaherpesvirinae (*Equid herpesvirus 1*).

A primeira descrição clínica foi feita por Dimock & Edwards (4), em 1933, porém o isolamento do vírus somente foi possível em 1936, em Kentucky, Estados Unidos. Atualmente, o Aborto Equino a Vírus (AEV) é observado, com frequência, no Japão, na África do Sul e na Europa, especialmente na Inglaterra (1).

No Brasil, a primeira ocorrência da doença foi assinalada em 1964 (3), embora o

vírus tenha sido identificado apenas em 1966, através das provas comparativas com a amostra Kentucky (10). Posteriormente, em 1972, foi isolada outra amostra viral (A4/72), proveniente de um animal pertencente a propriedade de criação localizada no município de Campinas* (Reiner & Col.).

O diagnóstico clínico é feito com base nos sintomas respiratórios e na incidência de aborto em certo número de éguas prenhas. A identificação do agente ou do anticorpo tem sido feita, em vários países, através da soroneutralização, da fixação de complemento e da imunofluorescência (1, 5, 6, 8, 12, 13).

Sendo o aborto equino causado por um herpesvírus, a verificação de animais portadores é de fundamental importância para o seu controle, visto que os animais infectados podem permanecer portadores durante longos períodos, sendo estes a fonte de infecção mais importante.

O presente trabalho teve por objetivo adaptar as técnicas de imunofluorescência e da microtécnica de soroneutralização para o diagnóstico do vírus do aborto equino.

Material e Métodos

Amostras de campo - Foram encaminhados pulmões, baço e fígado de 19 fetos abortados, provenientes de diferentes municípios do Estado de São Paulo.

Soros - Amostras de soro de 1178 animais pertencentes a propriedades de diferentes regiões do Estado de São Paulo, suspeitos de haverem sido infectados com o vírus do aborto equino.

Culturas Celulares - A linhagem celular utilizada foi a VERO, cultivada em monocamadas com meio Eagle, com 10% de soro bovino.

Animais de laboratório - Utilizaram-se, para a inoculação das amostras suspeitas, camundongos adultos e hamsters lactentes.

Vírus padrão - Foi utilizada a amostra A4/72, isolada na Seção de Raiva e Encefalomielite do Instituto Biológico, em 1972, a partir de órgãos de feto abortado, provenientes do município de Campinas, e adaptada à cultura de células VERO.

Soro padrão - Foi preparado em cobaias, através de inoculações, por via subcutânea, de 1000 DICI 50%, da cepa A4/72. Uma semana após a última inoculação, os cobaias foram sangrados, por punção cardíaca, e o seu soro titulado pela técnica de fixação de complemento, segundo Osler (11).

Conjugado fluorescente - O soro hiperimune foi submetido à precipitação com sulfato de sódio, dialisado em solução salina, sendo posteriormente feita a dosagem da proteína pelo método do biureto, a purificação da IgG por cromatografia, o teste de especificidade pela imunoeletroforese e a marcação da IgG com isotiocianato de fluoresceína, segundo técnica preconizada por Camargo (2).

Com o conjugado assim obtido, foi realizada a titulação através do preparo de diluições, de base 2, a partir de 1/5 e até 1/320. O título foi considerado como a maior diluição que forneceu reações fluorescentes específicas frente ao antígeno A4/72.

Preparo de amostras - Prepararam-se lâminas, a partir de impressão de fígado, baço e pulmão do feto abortado e, também, suspensões destes órgãos em Eagle, a 20%, para inoculação em sistemas sensíveis.

Técnica de imunofluorescência direta - Célula VERO, cultivadas em laminulas

*Reiner, U.R.; Lucca Neto, D. de; Nilsson, M.R.; Nilsson, T.T.; Kotait, I. - Isolamento do vírus do aborto equino em Campinas, Estado de São Paulo. Anais do XIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 283p., Brasília, D.F., 1972.

colocadas em tubos de Leighton, foram infectadas com a cepa A4/72 e, também, prepararam-se lâminas por impressão de fígado e com cortes de pulmão, baço e fígado de feto abortado e de órgãos dos animais que apresentaram sintomas característicos e morreram.

As lâminas, após fixação em acetona, durante 30 minutos, foram coradas com conjugado fluorescente e a leitura foi feita em microscópio de epiiluminação ZEISS.

Inoculação de animais - Os camundongos adultos foram inoculados com 0,03ml de suspensão de órgãos fetais, pela via intracerebral e os hamsters lactentes com 0,5ml, pela via intraperitoneal.

Histopatologia - Amostras de órgãos de camundongos mortos, após a inoculação de suspensão de órgãos fetais, foram fixadas em formol a 20%, incluídas em parafina e coradas pela técnica de hematoxilina-eosina.

Microtécnica de soroneutralização - Em placas de poliestireno, de 12,7 x 9,5cm, de 96 orifícios, com fundo plano, foram colocados 25ml dos soros a serem testados (diluição 1/5) e 25ml do antígeno (100 DICT 50%) e incubados a 37°C durante 30 minutos, em estufa.

Após o período de incubação, a cada orifício foram adicionados 200µl de suspensão de células VERO, contendo aproximadamente 10.000 - 20.000 células. As placas eram lacradas com fita adesiva, não tóxica, e incubadas durante 72 horas, à temperatura de 37°C.

A cada prova eram testados soros de referência, com anticorpo e sem anticorpo contra o vírus do aborto equino e realizada a titulação do vírus, para controle da dose infectante viral.

Os soros eram considerados positivos quando neutralizavam o efeito citopático viral e negativos quando apresentavam o efeito citopático característico.

Resultados

O soro hiperimune apresentou título fixador de complemento igual a 1 ou 256 e o conjugado, utilizado na técnica de anticorpos fluorescentes, forneceu título de 1 ou 10.

A Figura 1 mostra células VERO, com inclusões intranucleares, infectadas com o vírus do aborto equino e submetidas à técnica de anticorpos fluorescentes.

Suspensões preparadas a partir de pulmões, fígado e baço de 3 fetos abortados, procedentes de uma propriedade do município de Campinas, foram positivas pelo teste de imunofluorescência direta e infectaram camundongos adultos, provocando paralisia e morte em 72 horas.

A histopatologia do pulmão, fígado e coração de camundongos inoculado revelou: acentuadíssimas lesões de pneumonia intersticial linfocitária, discretos focos hemorrágicos, enfisema pulmonar, algumas áreas de hepatite portal linfocitária e discreto acúmulo de linfócitos no miocárdio.

Os hamsters inoculados apresentaram os seguintes sintomas: abatimento, decúbito com movimentos de pedalagem, paralisia e morte.

A microtécnica de soroneutralização revelou a presença de anticorpos contra o vírus do aborto equino em 159 dos 1178 soros examinados:

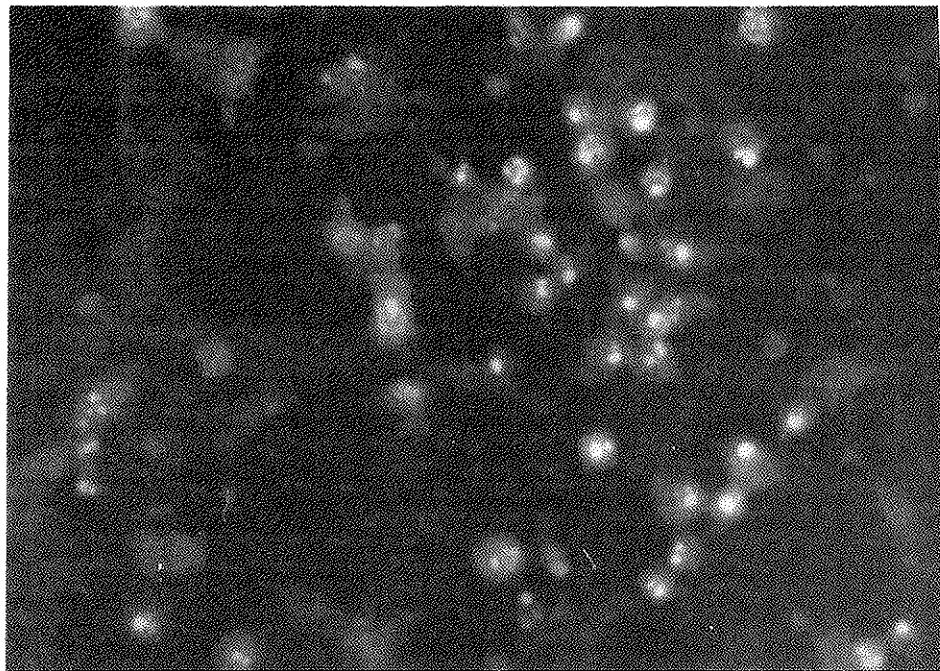
Discussão e Conclusões

Não há, na literatura nacional, relato da aplicação da imunofluorescência no diagnóstico do aborto equino a vírus e raros são os trabalhos apresentados em outros países (12, 13).

Em nossas condições, a técnica de anticorpos fluorescentes mostrou-se de valor para a pesquisa do antígeno viral do aborto equino, visto ser esta uma técnica de rápida execução e comprovada sensibilidade e especificidade (9).

A soroneutralização para a pesquisa de anticorpos tem se apresentado, juntamente

Figura 1 - Células VERO, infectadas com o vírus do aborto equino, coradas pela técnica de anticorpos fluorescentes (1200X).



com o ensaio imunoenzimático, com uma das melhores técnicas para a pesquisa de anticorpos contra os herpesvírus (7). O microteste em células VERO apresenta as vantagens de baixo custo, rápida execução, sensibilidade, especificidade e necessidade de pequenos volumes de reativos.

A pesquisa rotineira de anticorpos tem revelado a sua presença em equinos pertencentes a propriedades localizadas em vários Estados da Federação e em diferentes regiões do Estado de São Paulo, entre as quais podem ser citadas, principalmente, Ribeirão Preto, Presidente Prudente e Sorocaba (Kotait & Col., dados não publicados).

A identificação do vírus do aborto equino, após 15 anos do último isolamento no Brasil, e de seus anticorpos, confirma as inúmeras suspeitas clínicas dos últimos anos e sugere a necessidade da implantação destas técnicas nos diferentes laboratórios da rede oficial e o estabelecimento de vigilância sanitária para verificação de animais portadores.

Referências Bibliográficas

1. Bagust, T.J. - The Equine Herpesviruses. *Vet. Bul.* 42(2):79-92, 1971.
2. Camargo, M.E. - Introdução às técnicas de imunofluorescência. Instituto de Medicina Tropical, São Paulo, 114p., 1973.
3. Côrrea, W.M. & Nilsson, M.R. - Observações preliminares sobre o aborto equino e vírus no Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, 31(3):13-15, 1964.
4. Dimock, W.W. & Edwards, P.R. - Is there a filterable virus of abortion in mares? *Suppl. Kent. Agric. Exp. St. Bull.*, 333, 1933.
5. Doll, E.R.; McCollum, W.H.; Wallace, M.E.; Bryans, J.T. & Richards, M.G. - Complement fixation reactions in equine virus abortion. *Am. J. Vet. Res.*, 14:40-45, 1953..

6. Doll, E.R. & Bryans, J.T. - Development of complement fixing and virus-neutralizing antibodies in viral rhinopneumonitis of horses. *Am. J. Vet. Res.*, 23:843-846, 1962.
7. Gustafson, F.P. - Herpesvirus diseases of mammals and birds: comparative aspects and diagnosis. In: - Kurstak, E. & Kurstak, C. *Comparative Diagnosis of Viral Diseases*. Vol. III. New York. Academic Press, p.205-263, 1981.
8. Gutekunst, D.E.; Malquist, W.A. & Becvar, C.S. - Antigenic relatedness of Equine Herpes Virus types 1 e 3. *Arch. Virol.*, 56:33-45, 1978.
9. McNulty, M.S. & Allan, G.M. - Applications of immuno - fluorescence in veterinary viral diagnosis. In: - McNulty, M.S. & Mc Ferran, B. - *Recent Advances in Virus Diagnosis*. Netherlands, Martinus Nijhoff Publishers, p.15-26, 1984.
10. Nilsson, M.R. & Côrrea, W.M. - Isolamento do vírus do aborto equino no Estado de São Paulo. *Arq. Inst. Biol.*, 33(2):23-25, 1966.
11. Osler, A.G.; Strauss, J.H.; Mayer, M.M. - Diagnostic complement fixation. I. A method. *Am. J. Syph.*, 36:140-53, 1952.
12. Shimizu, Y.; Suzuki, T. & Kawakami, Y. - Fluorescent antibody technique for the detection of equine rhinopneumonitis infection in horses. *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.*, 11:125-133, 1971.
13. Smith, I.M.; Girard, A.; Corner, A.H. & Michell, D. - The fluorescent antibody technique in the diagnosis of equine rhinopneumonitis virus abortion. *Cand. J. Comp. Med.*, 36:303-308, 1972.

COPPER IMMOBILIZATION BY HIGH MOLECULAR WEIGHT COMPOUNDS EXCRETED BY AGING CULTURE OF *ANKISTRODESMUS DENSUS* (CHLOROCOCCALES)

Armando Augusto Henriques Vieira

Federal University of São Carlos, Biological Sciences Department, Via Washington Luiz, Km 235 13560 São Carlos SP, Brazil

Recebido para publicação em 21/06/88

& Otacírio Rangel Nascimento

University of São Paulo, Institute of Physics and Chemistry P.O. Box 369 13560 São Carlos SP, Brazil

Summary

Aliquots were sampled from a culture of *Ankistrodesmus densus* 0, 5, 9, 14, 19, 26 and 37 days old and exposed to different copper concentrations. The inhibiting effect of Cu^{2+} was observed by means of chlorophyll-a determination during about 18 days. It was observed that the copper concentration necessary to inhibit cells growth increased with the aging of culture. It is assumed that this is due to the accumulation of high molecular weight compounds in the medium, which complex Cu^{2+} . With Electron Paramagnetic Resonance (EPR) technique, it was possible to determine that about 20 μg of ion Cu^{2+} is chelated per mg of both dried high molecular weight compounds excreted and forming capsules of *A. densus*.

Resumo

*Imobilização de íons Cu^{2+} por compostos de alto peso molecular excretados por *Ankistrodesmus densus* (Chlorophyceae) em diferentes idades de cultivo*

De uma cultura de *A. densus* foram amostradas alíquotas com 5, 9, 14, 19, 26 e 37 dias de idade, além de um controle no tempo zero, e expostas a diferentes concentrações de Cu^{2+} (CuSO_4). O efeito inibidor do crescimento das células algáceas pelo cobre foi observado através de determinações de clorofila-a durante cerca de 18 dias para cada idade. Foi observado que a concentração de cobre necessária para inibir o crescimento, aumenta com idade da cultura. Mostra-se que isso se deve à acumulação no meio de cultura de compostos de alto peso molecular, principalmente heteropolissacarídeos, que complexam o íon Cu^{2+} . As cápsulas extraceituulares que envolvem as células também são efetivas na imobilização desse íon. Cerca de 20 μg do íon cobre é imobilizado por miligrama de peso seco desses compostos.

Introduction

Several species of freshwater microalgae, mainly Desmidiaceae and Chlorococcales, release reasonable amounts of high molecular weight organic compounds (9). The Rev. Microbiol., São Paulo, 20(1):133-139, Jan./Mar. 1989.

release of such compounds make us wonder about possible extracellular functions for the excreted organic matter, apparently lost by the organisms. A possible extracellular function would be to create a microenvironment around the cell properly called "phycosphere" by early researches, which would allow the cell, among other functions, to chelate metal ions such Cu^{2+} present in eventually toxic concentrations.

Several microorganisms such as yeast, fungi and bacteria are capable themselves of producing substances which may reduce metal toxicity (1, 2, 5). Also one can find references to microalgae (4, 8, 10, 11, 14).

In chemically and physically stable environments such as large lakes, rivers and oceans this protective function will not be very important since most of the dissolved copper will be bound to high affinity natural dissolved ligands present at low concentration (12). In this case, the immediate importance of the excreted substances will be its role in natural dissolved ligands pool. However in small freshwater bodies where great changes in physico-chemical condition occur due to natural events or wastes, the chelation of the Cu^{2+} at toxic levels will be very important to the survival of certain microalgae.

The present work determines the concentrations of Cu^{2+} which can inhibit the cell growth increase with age of the culture due to the accumulation of excreted compounds in the media mainly complex polysaccharides which produce copper complexes detected by Electron Paramagnetic Resonance (EPR) technique.

Material and Methods

The experiments were carried out with cells of the planktonic microalgae *Ankistrodesmus densus* Kors., Chlorophyceae (strain nº 003 UFSCar) growth in WC medium (6) with N and P reduced to 1/5 of the original concentration and without copper, Tris and EDTA. The culture was started in a pirex 8L carboy with 4L of medium inoculating axenic cells in exponential growth. Illumination was provided by 40W fluorescent tubes ($100\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) with a light/dark cycle of 12h:12h. A constant temperature of $23\pm1^\circ\text{C}$ was maintained and the culture was continuously aerated by gentle bubling of filtered air. The pH throughout all the experiment slithly changed around 7.0. The cells sampled from carboy culture in different ages - (0, 5, 9, 14, 19, 26, and 37 days old) - were exposed to different concentrations of Cu^{2+} (CuSO_4 Merck) and its viability observed by chlorophyll-a concentration measurements (13). The cell numbers were kept at 8.10^4ml^{-1} in each age reducing it by centrifugation and culturing them in conical flasks with 50ml of suspension for each copper concentration to be tested. After 5 days of age the subcultures in conical flasks were enriched with WC modified nutrients. The initial copper concentrations at time zero (inocula) was settled in a pre test using centrifuged cells. The cells were exposed to different copper concentrations by 18 days and chlorophyll-a sampling was done each two days. Cell counts were made in a Fucks-Rosenthal haemocytometer. The dissolved extracellular carbohydrate was analysed by the phenol-sulfuric acid method using glucose as a standard (3). Protein measurements were made using Folin phenol method (7). When the culture was 34 days old 3mg of Cu^{2+} was added to 1L of it and 16 hours later were analysed by Electron Paramagnetic Ressonance to determine the spectra of complexes formed and to measure the ion concentration complexed per mg of both dried high molecular weight compounds dissolved in the medium and forming extracellular capsules (Vieira & Nascimento, in press, J. Plankton Res., 10(6), 1988).

Results

Figure 1 shows the growth curves of carboy cultures from which cells at different ages were taken and exposed to different Cu^{2+} concentrations. The cells assayed at zero time. i.e., fresh medium without excretes, and exposed to concentration between 0.01 and 0.15mg Cu^{2+-1} have shown an increase in the lag phase for each tested concentration. But, an increase in the chlorophyll-a concentration only occurred in

Figure 1 - Cell numbers, extracellular dissolved carbohydrates and chlorophyll-a concentrations in the carboy culture.

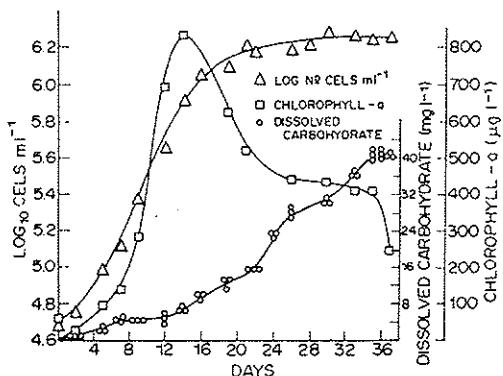
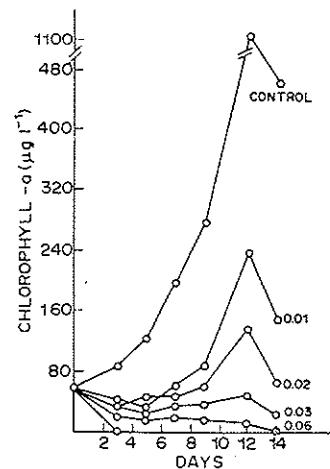


Figure 2 - Growth curves of aliquots sampled at zero time from the carboy culture and submitted to different copper concentrations. Data for non growth at 0.10 and 0.15 mg Cu²⁺ l⁻¹ have been omitted, for better clarity. Numbers in each curve represent copper concentration (mg Cu²⁺ l⁻¹).



the cells exposed to 0.01 and 0.02 mg Cu²⁺ l⁻¹ (Figure 2). In the other concentrations a striking precoce bleaching of the cells was observed at 0.1 and 0.15 mg Cu²⁺ l⁻¹. After 18 days of exposition to copper the cells from these concentrations inoculated in fresh media did not show any viability. Using 5 days old cells when the total dissolved carbohydrate concentration in the media is around 2.6 mg l⁻¹, we can see (Figure 3) that although long lag phases still occur, the Cu²⁺ inhibiting concentrations were increased. A significant increase in chlorophyll-a occurred at 0.04 mg Cu²⁺ l⁻¹ but the bleaching at 0.1 mg was not so rapid as that observed with the cells of zero time. Nevertheless, it was with 9 days old cells, when the total dissolved carbohydrate concentration in the medium reached 4.5 mg l⁻¹, that the influence of excreted compounds on the Cu²⁺ inhibition effect was most evident (Figure 4A). Here the cells exposed to 0.1 mg Cu²⁺ l⁻¹ presented a relatively short lag phase and an increase in chlorophyll-a concentration similar to that observed in the control. Even at the copper concentrations of 0.15 and 0.18 which completely inhibited cell growth at the 5 days old cells, the 9 days old cells presented considerable growth besides a long lag phase. At 0.2 mg Cu²⁺ l⁻¹ concentration there was no growth. When these cells are washed and resuspended

Figure 3 - Growth curves of aliquots sampled from the carboy culture at the 5th day and submitted to different copper concentrations.

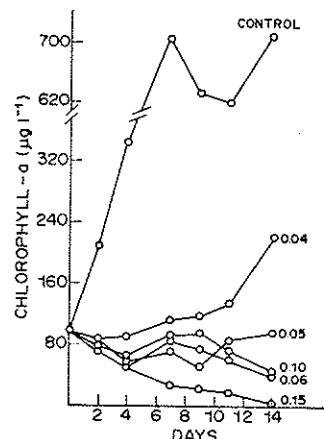


Figure 4 - Growth curves of aliquots sampled at the 9th day from the carboy culture and submitted to different copper concentrations.
Symbols: (A) = With the own media; (B) With the cells washed and resuspended in fresh media.

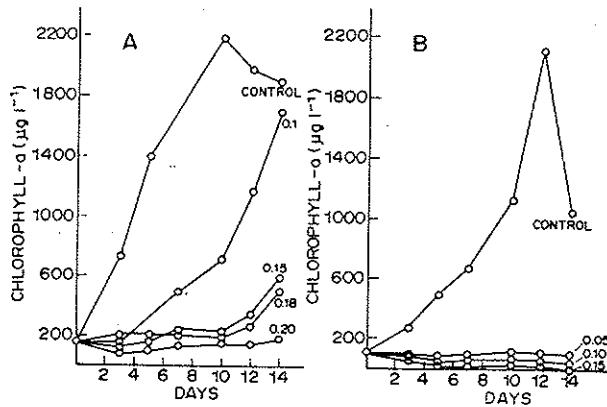
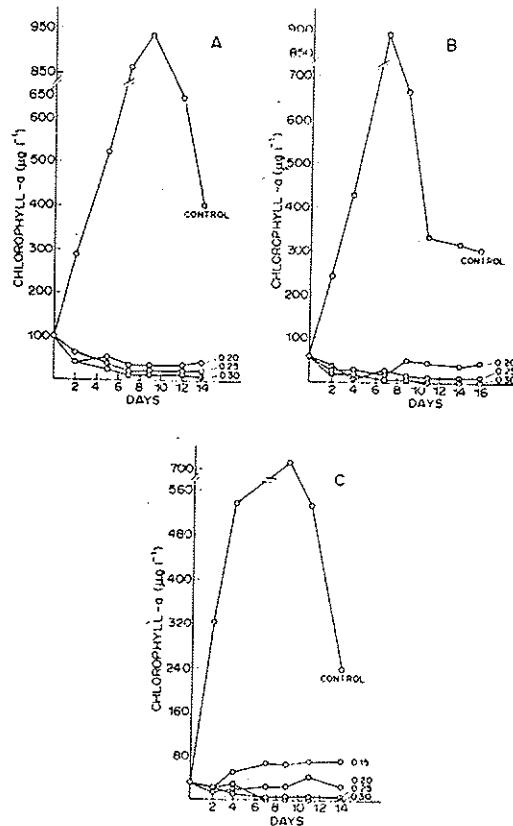


Figure 5 - Growth curves of aliquots sampled at the 14th day (A), 19th (B) and 26th day (C) from the carboy culture and submitted to different copper concentrations.



in fresh media growth is not observed even at 0.05mg Cu^{2+} concentration (Figure 4B).

The effect of excreted compounds in attenuating the inhibiting action of copper on the cell growth at concentrations $>0.2\text{mg Cu}^{2+}$ was not effective when using culture media of 14, 19 and 26 days old (Figure 5). Only when the cells were inoculated in 37 days old medium there was small increase in the chlorophyll-a concentration in the cells exposed to 0.20 and 0.25mg Cu^{2+} but not at 0.30 and 0.35mg Cu^{2+} (Figure 6A). However any growth did not occur when the cells at this age were suspended in fresh media even at low concentrations such 0.15mg Cu^{2+} (Figure 6B).

In order to characterize the chelation compounds and to verify if the excretion materials binds Cu^{2+} ions, the EPR spectra were made in three different preparations described in a paper which is in press (Vieira & Nascimento). The EPR parameters of these complexes show that around $20\mu\text{g}$ of ion per mg of dried extracellular compounds is chelated and immobilized.

Discussion

A comparison of quantitative aspects of growth among different cell ages could not have been done using chlorophyll-a curves since at different ages the inocula were also at different physiological conditions. This can be observed in the control growth curves. Therefore our objective is to observe growth in the qualitative aspect, i.e., if Cu^{2+} inhibits or not the growth as quantified by the chlorophyll-a concentration.

At Cu^{2+} concentrations where the synthesis of chlorophyll-a was inhibited, the number of cells did not decrease but remained around the number in the inocula. Because in this species of algae it is very difficult to distinguish between dead and alive cells under the microscope we have decided to use chlorophyll-a concentration as a parameter to estimate growth.

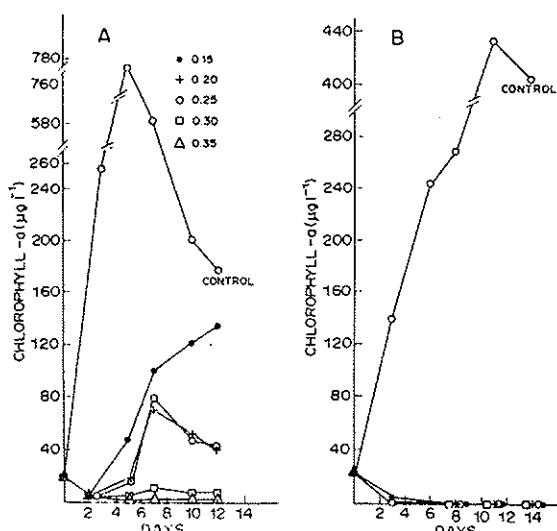
It is possible that some of the Cu^{2+} were immobilized by precipitation considering that the pH was 7.0. Therefore, the inhibiting concentrations found might not be the real ones. However, it is evident that the concentrations that inhibited growth increased as the age of culture increased. Also, it was demonstrated (Figure 4B and 6B) that this effect is not due to the age of the cell itself but to the excretes accumulated in the media which complexate a fraction of free Cu^{2+} .

A large amount of the *A. densus* excretion are complex polysaccharides with absence of sulphate groups and possible presence of small amounts of carboxyl groups with rhamnose, arabinose, xylose, mannose, galactose and glucose in its monosaccharide composition (15). In batch cultures the polysaccharides are accumulated in the media making it viscous. This would explain why the Cu^{2+} concentrations inhibiting growth were much higher in the older culture media.

Besides the effect of dissolved polysaccharide the Cu^{2+} ion can also be chelated

Figure 6 - Growth curves of aliquots sampled at the 37th day from the carboy culture and submitted to different copper concentrations.

Symbols: (A) With the own media; (B) With the cells washed and resuspended in fresh media.



by mucilaginous capsules surrounding cells in the stationary growth phase. These capsules are rare during the exponential growth probably because there is not enough time for its accumulation since in this species the capsules are discarded with the cell walls in the cell division process - cast-off half-portions in the autospores releasing. However, during the stationary phase the mucilaginous capsules surround most of single cells, cenobia and cast-off half-portions of wall material. The dissolution of such capsules is very slow (15).

Also the occurrence of long lag phases at inhibiting but not lethal copper concentrations were early observed by Steeman-Nielsen and Wium-Andersen (10). About that one can make two assumptions: first, the growth of cells is inhibited by non lethal concentrations. After some time a kind of physiological adaptation to those copper concentrations occur in these cells. Second, besides cell division is not occurring, they could be continuously releasing organic matter which after some time will reach a sufficient concentration to chelate the Cu^{2+} . Steemann-Nielsen and Wium-Andersen (10) report that in *Nitzschia palea* the copper itself could induce an increase in excretions through "leaky membranes".

We are investigating if small molecular weight polysaccharides also works in the chelation role.

Acknowledgements

We would like to thank the financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (proc. nº 85/1828-0) and to Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) (proc. nº 403985/87.0).

References

1. Bitton, G. & Freihofer, V. - Influence of extracellular polysaccharides on the toxicity of copper and cadmium toward *Klebsiella aerogenes*. *Microb. Ecol.*, 4:119-1235, 1978.
2. Bremer, P.J. & Loutit, M.W. - The effect of Cr (III) on the form degradability of a polysaccharide produced by bacterium isolated from a marine sediment. *Marine Environ. Res.*, 20:249-259, 1986.
3. Dubois, M.; Gills, K.A.; Hamilton, G.K.; Rebers, P.A. & Smith, F. - Colorimetric method of determination of sugars and related substances. *Analyt. Chem.*, 28:350-356, 1956.
4. Fogg, G.E. & Westlake, P.F. - The importance of extracellular products of algae in fresh water. *Verhandel intern. Ver. Limnol.*, 12:319-323, 1955.
5. Gadd, G.M. & Griffiths, A.J. - Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microb. Ecol.*, 4:303-317, 1978.
6. Guillard, R.R.L. & Lorenzen, C.J. - Yellow-green algae with chlorophyllid-c. *J. Phycol.*, 8:10-14, 1972.
7. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.Y.; Farr, A.L. & Randall, R.J. - Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275, 1951.
8. Martin, D.F. - Coordination chemistry of the oceans. In Gould, R.F. (ed). *Equilibrium Concepts in Natural Water Systems*. A.C.S. Adv. in Chem. Series 67, pp.255-269, 1967.
9. Nalewajko, C. & Schindler, D.W. - Primary production, extracellular release and heterotrophy in two lakes in the E.I.A., northwestern Ontario. *J. Fish. Res. Board. Can.*, 33:219-226, 1976.
10. Steemann-Nielsen, E. & Wium-Andersen, S. - Copper ions as poison in the sea and in freshwater. *Mar. Biol.*, 6:93-97, 1970.
11. Sunda, W. & Guillard, R.R.L. - The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton. *J. Mar. Res.*, 34:511-529, 1976.
12. Sunda, W.G. & Hanson, A.K. - Measurement of free cupric ion concentration in sea water by a ligand competition technique involving copper sorption onto C18 SEP-PAK cartridges. *Limnol. Oceanogr.*, 32(3):537-551, 1987.

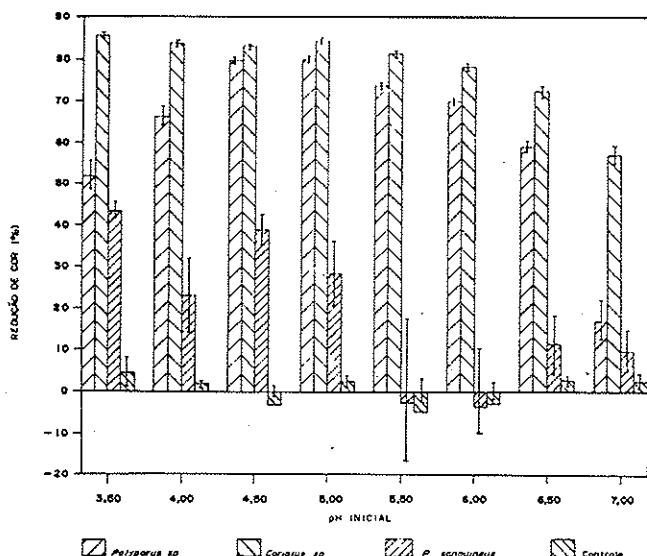
13. Talling, J.F. and Driver, D. - Some problems in the estimation of chlorophyll-a in phytoplankton. Proc. conference on primary productivity measurements, marine and fresh-water; held at Univ. Hawaii, 1961, U.S. Atomic Energy Comm. TID-7633, 142-146, 1963.
14. Van den Berg, C.M.G.; Wong, P.T.S. & Chau, Y.K. - Measurement of complexing materials excreted from algae and their ability to ameliorate copper toxicity. J. Fish. Res. Board. Ca., 36:901-905, 1979.
15. Vieira, A.A.H. & Myklestad, S. - Production of extracellular carbohydrate in cultures of *Ankistrodesmus densus* Kors. (Chlorophyceae). J. Plankton. Res., 8(5):985-994, 1986.

Errata

Descoloração microbiológica do efluente de uma indústria de celulose Branqueada*

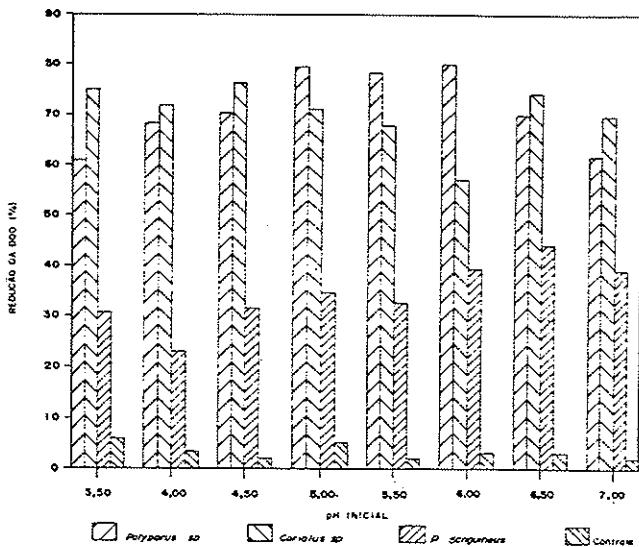
ONDE SE ENCONTRA: Figura 2 pag. 427

SUBSTITUA-SE POR: Figura 2 - Redução da cor do efluente de uma indústria de celulose branqueada com diferentes valores de pH inicial por diferentes fungos causadores de podridão-branca.



ONDE SE ENCONTRA: Figura 3 pag. 428

SUBSTITUA-SE POR: Figura 3 - Redução da DQO do efluente de uma indústria de celulose branqueada por diferentes fungos causadores de podridão-branca a diferentes valores de pH inicial.



INFORMAÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA SBM

"Antibiotic Inhibition of Bacterial Cell Surface Assembly and Function". P. Actor; L. Danco-Moore; M.L. Higgins; M.R.J. Salton; G.D. Shockman. American Society for Microbiology. Washington, USA, 1988.

O livro "Antibiotic inhibition of bacterial cell surface assembly and function" publicado pela American Society of Microbiology (Washington, D.C.), tem como editores pesquisadores de prestígio de Filadelfia e de New York, entre eles, Milton Salton e Gerald Shockman.

O livro inclue capítulos dentro das grandes divisões: Estrutura e função, Modelos do crescimento celular, Estrutura e biossíntese da parede, Autólise e hidrolases da peptidoglicana, Proteínas ligantes da penicilina, Permeabilidade da membrana externa, β -Lactamases, Outros antibióticos, Resistência e, finalmente, um capítulo final de H.J. Rojers focalizando em sumário, alguns aspectos fundamentais da bioquímica das estruturas de superfície de bactérias.

Os capítulos sobre Estrutura e Função ressaltam o pouco conhecimento atingido na matéria e as dificuldades técnicas intrínsecas que impedem o correlacionamento estreito entre análises bioquímicas de preparações "puras" e estruturas originais in vivo. Uma contribuição interessante é relativa à natureza multilaminar da mureína e à correlação entre a extensão das fitas de glicana e o grau de "cross-linkage" em mureinas de diferentes amostras de *Escherichia coli*.

Nos capítulos ligados aos Modelos de Crescimento celular, são focalizadas experiências realizadas com bactérias Gram negativas, *Streptococos* e *Bacillus*. Muito motivante é o capítulo de Mendelson e Thwaites que estuda em *Bacillus subtilis* os estados de torção das macrofibras e a biomecânica dos filamentos bacterianos. A modulação da torção (determinada em microscopia de contraste de fase) por diversos fatores e condições nutritivas é revista em detalhe.

Análises químicas e espectroscópicas de componentes isolados da parede celular e sua utilização em projetos centrados na biossíntese destes componentes, aparecem em 5 capítulos que incluem também a ação da ampicilina em *Ancyllobacter aquaticus*, modelo para estudo da pressão de turgência e a rutura ou "vasamento" celular.

A série de capítulos sobre autólise e hidrolises envolve aspectos de organização de autolisinas no envelope bacteriano e dos processos de autólise da peptidoglicana em *E. coli* e *Streptococcus*. De grande interesse são duas comunicações de pesquisadores espanhóis sobre a genética e caracterização bioquímica de enzimas líticas capazes de degradar a parede celular de *Streptococcus pneumoniae*. Curiosamente, todas as enzimas líticas de *S. pneumoniae* e de seus bacteriófagos exigem a presença de colina nos ácidos teicóicos para sua atividade.

Uma das partes mais desenvolvidas do livro é relativa às Proteínas ligantes da penicilina. Aspectos da evolução de α -peptidases e β -lactamases; configuração, topologia e expressão de proteínas ligantes da penicilina em *E. coli* e *B. subtilis*; natureza e papel na indução da lise por antibióticos β -lactâmicos, de proteínas ligantes em *Staphylococcus aureus*; alvos das β -lactamas em cocos Gram positivos e desenvolvimento de resistência à Penicilina G em *Streptococcus mutans* foram discutidos, sobre resultados fartamente documentados.

Os capítulos sobre permeabilidade da membrana externa focalizam basicamente a permeabilidade a β -lactamas e a resultante sensibilidade/resistência aos antibióticos β -lactâmicos. A resistência a antibióticos é também focalizada nos capítulos sobre β -lactamases. São estudados também os mecanismos moleculares da indução de β -lactamases inclusive aspectos de regulação gênica.

Apesar da grande ênfase dada aos antibióticos β -lactâmicos, outros antibióticos, atuando em diferentes sítios da parede celular bacteriana são também considerados. Um excelente capítulo de Jeffs e Nisbet relata a descoberta, isolamento e determinação da estrutura (por HPLC, cromatografia de afinidade e FAB-spectrometria de massa) de vários antibióticos glicopeptídicos.

Outros antibióticos, como os ácidos fosfínicos relacionados à D-alanina e D-alanil-D-alanina; a moenomicina, um inibidor da polimerização da peptidoglicana

em *Escherichia coli*; as γ -lactamas; são também abordados. Drogas não convencionais como o lipídio dodecilglicerol são tema de um capítulo, no qual é mostrado que esta substância além de estimular a autolisina que hidrolisa a parede celular, interfere com a síntese da peptidoglicana, em espécies de *Streptococcus*.

Alvos aniónicos na superfície bacteriana e a ligação com antibióticos poliaciônico s são discutidos em 2 capítulos, usando como modelos *S. subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Mecanismos específicos de resistência a antibióticos são descritos em *S. aureus* (resistência à metacilina e superprodução de proteína ligante de penicilina) e enterococos (resistência a β -lactamas). Resistência e tolerância aos antibióticos β -lactâmicos são discutidos em pneumococos e *S. aureus*.

Como o livro concentra as comunicações à Conferência da ASM de igual título realizada em Filadelfia (1987), seu objetivo é principalmente a discussão dos últimos avanços na pesquisa básica sobre estruturas bacterianas de superfície e mecanismos de ação de antibióticos que aí atuam. Como apontam os editores, foi intrigante a aplicação de modernas tecnologias químicas, físicas, moleculares e genéticas a problemas de ambos interesses teórico e prático. O livro é pois de alta valia a pesquisadores e estudantes de pós-graduação. Sua linguagem é acadêmica e elevado seu nível científico. As comunicações, apresentadas na forma de capítulos, estão documentadas com numerosos resultados experimentais que muito enriquecem a apresentação e discussão dos dados.

Obviamente, devido à sua natureza, não se trata de um compêndio com apresentação didática, horizontal e exaustiva do tema escolhido. Focaliza antes, tendências e progressos recentes, em determinada área científica, sobretudo no que toca a nova metodologia empregada.

Luiz R. Travassos
Escola Paulista de Medicina
Rua Botucatu, 740
Caixa Postal 20207
04023 São Paulo SP

I Encontro Nacional de Microbiologia e infecção hospitalar - Ribeirão Preto - São Paulo - 15 a 17 de maio de 1989

O Ministério da Saúde e a Sociedade Brasileira de Microbiologia se associam, juntamente com outras entidades relacionadas à área de Infecção Hospitalar, para patrocinar o "I Encontro Nacional de Microbiologia e Infecção Hospitalar", na cidade de Ribeirão Preto SP. Este evento pretende reunir microbiologistas e profissionais da saúde interessados nos seguintes temas básicos:

- A função do Laboratório de Microbiologia no controle de Infecções Hospitalares;
- Resistência Bacteriana - Marcadores Genéticos aplicados à epidemiologia das Infecções Hospitalares;
- Uso e controle de Antimicrobianos a nível hospitalar
- Informática X Microbiologia e Controle de Infecções Hospitalares.

Local: Teatro Municipal de Ribeirão Preto

Coordenador: Dr. Carlos Emilio Levy (HC-FMRP-USP)

Secretaria Executiva: Embarge Turismo Ltda.

Rua São José 1406 - Ribeirão Preto SP

Tel. (016) 634-4354 a/c Maria Alice

Hilda ou Verinha

Telex 164021 Cep: 14025

Programa

15/05/89

- 20:00hs Cerimônia de Abertura
- 20:45hs Conferências:
- Mecanismos de Resistência de Bactérias Gram negativas frente aos Aminoglicosídeos.
- Papel do Microbiologista no Controle de Infecção Hospitalar.
- 22:10hs Coquetel

16/05/89

- 8:00hs Mesa redonda:
- Etiologia das Infecções Hospitalares.
- 10:30hs Mesa-redonda
- Técnicas especiais em Microbiologia aplicadas ao Controle de Infecção Hospitalar.
- 14:00hs Mesa-redonda:
- Investigação de Fontes de Infecções Hospitalares.
- 16:30hs Mesa-redonda:
- O Laboratório de Microbiologia na Investigação Epidemiologica de Surtos de Infecção Hospitalar.

17/05/89

- 8:00hs Mesa-redonda:
- Resistência Bacteriana - Marcadores Genéticos aplicados à Epidemiologia das Infecções Hospitalares.
- 10:30hs Mesa-redonda:
- Infecção Hospitalar - Resistência Bacteriana e novos Antimicrobianos: enfoque do especialista.
- 14:00hs Mesa-redonda:
- Controle de Antimicrobianos em Hospitais e surtos de Infecção por cepas multirresistentes.
- 16:30hs Mesa-redonda:
- Informática e Microbiologia.
- 20:00hs Encerramento:
- Propostas para melhor desempenho da Microbiologia no controle das Infecções Hospitalares.

1) International Journal: Water Science and Technology: March 1989.

Esta publicação é editada pela International Association on Water Pollution Research and Control (IAWPRC).

Nesta edição serão publicados os proceedings da reunião sobre "Health - Related Water Microbiology 1988". Uma série de trabalhos de grande interesse em microbiologia sanitária serão apresentados. É possível a aquisição deste número, através da Pergamon Press.

2) Symposium on Health - Related Water Microbiology

Será realizado de 01 a 05 de Abril de 1990, em Tübingen - West Germany.

Informações:
 Prof. W.O.K. Grabow
 Deptº of Medical Virology
 University of Pretoria
 P.O. Box 2034
 0001 Pretoria
 South Africa

LILACS - Literatura Latino-Americana em Ciências da Saúde, uma fonte de informação para o profissional da saúde.

BIREME - Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde

Organização Pan-Americana da Saúde / Organização Mundial da Saúde-São Paulo, Brasil

Este, da mesma forma que muitos outros periódicos latino-americanos, 450 aproximadamente, é analisado e indexado na base de dados LILACS (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde).

LILACS é o resultado de um esforço coletivo, coordenado pelo BIREME, para

registrar e difundir a produção intelectual do profissional da Saúde latino-americano, qualquer que seja a forma ou o meio em que aparece publicada. Livros, periódicos, publicações governamentais, trabalhos apresentados em congressos, seminários ou conferências, teses, etc. são incorporados à LILACS, respeitados os critérios de seleção estabelecidos.

A captação e processamento de toda essa literatura é responsabilidade de cada Centro Coordenador Nacional (CCN) que compõe a Rede Latino-Americana e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde. BIREME, Centro Regional da OPAS, ajuda os CCN em seu trabalho e exerce a coordenação a nível regional.

Quem gera a informação (autores e editores) deve participar deste esforço coletivo fazendo com que os CCNs sejam depositários de todo documento gerado, para sua análise e possível inclusão na base de dados. Sem esta colaboração, de inegável interesse mútuo, o processo de captação é extraordinariamente dificultado e pode ser a causa da ausência na LILACS de um grande volume de documentos. Alimentada pela maioria dos países da Região, LILACS possui hoje mais de 60.000 citações bibliográficas e resumos de documentos (artigos de periódicos, relatórios técnico-científicos, publicações governamentais, teses, etc.) de autores latino-americanos. Este acervo de informação é acessível em linha e também está disponível no suporte eletrônico conhecido como CD-ROM (Compact Disc - Read Only Memory). Mais de 140 instituições da Rede Latinoamericana já contam com o equipamento de leitura de CD-ROM e recebem regularmente do BIREME as atualizações da base de dados para sua operação a nível institucional.

No decorrer do presente ano a base de dados LILACS será cedida ao Deutsches Institut fur Medicinische Dokumentation und Information (DIMDI) para acesso em linha dos países da Comunidade Econômica Europeia. Iqualmente, espera-se que a literatura da Espanha e Portugal seja incorporada proximadamente na LILACS.

Da LILACS são extraídos dois produtos impressos: IMLA (Index Medicus Latinoamericano) e LILACS-SP. O primeiro, de frequência trimestral, inclui citações bibliográficas e resumos de artigos publicados nos periódicos analisados. O segundo, de frequência irregular, inclui citações bibliográficas e resumos de trabalhos referidos à área de Saúde Pública.

Para informação adicional, favor dirigir-se à:

Seleção e Aquisição
BIREME - Centro Latino-Americanano e
do Caribe de informação em Ciências
da Saúde
Rua Botucatu, 862
04023 São Paulo SP, Brasil

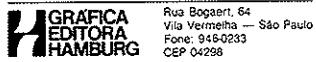
"Principles of Biotechnology" - 2nd edition, 211p., 1988. Alan Wiseman. Surrey University Press. Ed. Chapman and Hall, New York, USA.

Esta publicação enfoca os seguintes temas: aplicação à biotecnologia dos princípios da microbiologia industrial, da genética microbiana, da enzimologia e da engenharia dos processos de fermentação; biotecnologia do isolamento e purificação de enzimas e utilização de enzimas imobilizadas.

A complexidade de cada tema aqui abordado seria suficiente para um livro, portanto, as poucas páginas desta publicação já indicam que cada um dos temas é abordado muito superficialmente. Não é um livro indicado para o especialista, no entanto é útil para estudantes ou pesquisadores em áreas afins, pois fornece uma visão geral de temas importantes na biotecnologia.

Maria Therezinha Martins
Instituto de Ciências Biomédicas II
Cidade Universitária - USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
05508 São Paulo SP

Fotolitos e Impressão



Rua Bogaert, 64
Vila Vermelha — São Paulo
Fone: 946-0233
CEP 04298

