

Revista de Microbiologia



SBM

**Sociedade
Brasileira de
Microbiologia**

São Paulo — Brasil

Volume 21 Número 1 Jan.-Mar. 1990

GUIDELINES TO AUTHORS

Revista de Microbiologia (Published by the Brazilian Society for Microbiology) publishes original research papers, research notes and occasionally reviews covering all aspects of Microbiology. A paper is a comprehensive contribution to the subject; a note or short communication is a concise account of new and significant findings and a review is an authoritative, critical account of recent and current research in a specific field to which the author has made notable contributions.

All submissions should be written in Portuguese or preferentially in English. The decision to accept manuscript is made by the Editorial Board.

Submission of a paper to this Journal is understood to imply that it has not previously been published and that it is not being considered for publication elsewhere.

ORGANIZATION AND FORMAT OF THE MANUSCRIPT. Type every portion of the manuscript double-space with a wide margin at the left on UNE A-4 format sheets and the pages should be numbered sequentially. Papers must be restricted to a maximum of 15 printed pages including figures and tables (this corresponds to approximately 25 typewritten pages).

The front page should include title, name(s), of the author(s), institution affiliation(s) and complete address(es). Three to five keyword should also be included.

Papers should be divided into: Abstracts in English and in Portuguese (not exceeding 250 words). Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments and References. Results and Discussion can be combined.

Abbreviations and symbols should follow the recommendations of the IUPAC-IUB Comission and the Metric System is to be used throughout.

Cite each listed references by numbers in the text. References should be numbered and arranged in alphabetical order as indicated in the following examples.

Ingram, L.O. & Conway, T. - Expression of different levels of the ethalogenic enzymes from *Zymomonas mobilis* in recombinant strains of *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. **54**:397-404, 1988.

Fleming, H.P. - Fermented Vegetables. - In: Rose, A.H., ed. - Economic Microbiology. London, Academic Press, p. 228-258, 1982.

Krieg, N.R. & Holt, J.C., eds. - Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore, Williams & Wilkins, v. 1. 1984.

Only those photographs which are strictly necessary for the understanding of the paper should be submitted. Fotoprints must be of sufficient quality to ensure good reproduction. They should be numbered on the back and identified with the first author's name written in pencil. Legends for linedrawings and photographs should not exceed the printing area (13x20 cm). All elements in the drawing should be prepared to withstand reductions. Drawings and line figures should be drawn in black ink on tracing paper and should be prepared as indicated for the photographs. Colored illustrations are not accepted.

Tables should be compiled on separate sheets with a descriptive title and numbered independently of the figures using Arabic numerals.

Please indicate with a soft pencil the approximate location of tables and figures in the left margin of the page.

NOTES. Notes should be restricted to 6 typewritten pages and intended to present experimental observations and descriptions of techniques or methodological changes of interest. They should be written according to the guidelines given for papers, but without the heading divisions, and their abstracts should not exceed 50 words. Figures and tables should be restricted to maximum of 2 figures or 2 tables, or 1 table and 1 figure.

REVIEWS. Review articles should deal with microbiological subjects of broad interest. Specialists will be called upon to write them. In addition to an abstract, they may contain a list of contents.

PROOFS. On acceptance of the paper, one galley proof will be sent to the nominated author to check for typesetting accuracy. The corrected proofs should be duly returned within 10 days. If delays were observed, the proofs will be corrected by the editorial staff and published. Broader changes implying recombination of the text will be at the author's expense. Fifteen offprints of each paper are supplied free of charge. Additional reprints will be billed at cost price if requested upon returning the corrected galley proofs.

Papers must be submitted, in triplicate, to the Executive Director.

Revista de Microbiologia
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
Cidade Universitária – USP
05508 – São Paulo – SP – Brasil

Regina Toledo

Diretor Executivo: WALDEREZ GAMBALE

CONSELHO EDITORIAL

Adauto Ivo Milanez
Alcides Serzedello
Allen Norton Hagler
Ana Clara G. Schenberg
Andrejus Korolkovas
Antonio Fernando Pestana de Castro
Aramis Augusto Pinto
Arlete Emily Cury
Astrea Mennuci Giesbrecht
Augusto Cezar Montelli
Caio Marcio Figueiredo Mendes
Carlos da Silva Lacaz
Carmo Elias A. Melles
Celeste Fava Netto
Claudete Rodrigues Paula
Daison Olzany Silva
Edmar Chartone de Souza
Ernesto Hofer
Flavio Alterthum
Galba Maria Campos Takaki
Hermann Gonçalves Schatzmayr
Homero Fonseca
Ises de Almeida Abrahanson
João Lúcio de Azevedo
Johanna Doberciner
José Alberto Neves Candeias

Leda Cristina Santana Mendonça Hagler
Leon Rabinovith
Luiz Rachid Trabulsi
Marcelo Magalhães
Maria Aparecida Shikanai Yasuda
Maria Lucia B.O. Rácz
Maria Regina Fernandes Toledo
Maria Therezinha Martins
Mauro Faber de Freitas Leitão
Milton de Uzeda
Myrna Sabino
Moacyr Alcojarado Rebello
Paulo Hideki Yasuda
Paulo Suyoshi Minami
Sebastião Timo Iaria
Sérgio Olavo Pinto da Costa
Sérgio Eduardo Longo Fracallanza
Silvio Arruda Vasconcelos
Sumie Hoshino Shimizu
Vera Lucia Garcia Calich
Waldemar Francisco
Walderez Gambale
Willibaldo Schmidell Netto
Zoilo Pires Camargo

Secretária Executiva: Maria Aparecida de Souza Lima

Os artigos publicados na Revista de Microbiologia são indexados em: Current Contents (USA); CNRS – Centre National de la Recherche Scientifique (França); Chemical Abstracts Service (USA); Cambridge Scientific Abstract (USA); Commonwealth Mycological Institute (England); Hamdard National Foundation (Paquistão); IMLA - Index Medicus Latino Americano (Brasil); Institut Nauchoi Informatsii (URSS); Periodica (México); Sumarios Correntes Brasileiros; UMI – University Microfilms International (USA).

Auxílio Financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); FINEP.

Fotocomposição e Impressão: PRÓDICA GRÁFICA E EDITORA LTDA. Fone: 36.6691

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
05508 - São Paulo - SP
BRASIL
Fone: (011) 813-96-47
TELEX: 11 35085
FAX: 88 79875

REVISTA DE MICROBIOLOGIA - SBM

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

Sociedade Brasileira de Microbiologia

Diretoria

Presidente

Maria Therezinha Martins
Inst. de C. Biomédicas - USP
Dept. de Microbiologia
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
05508 - São Paulo - SP

Vice-Presidente

Walderez Gambale
Inst. de C. Biomédicas - USP
Dept. de Microbiologia
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
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.
Fac. de Ciências Farm. - USP
Conjunto das Químicas
Cidade Universitária
05508 - São Paulo - SP

Conselho Fiscal

Paulo S. Minami (FCF/USP)
Claudete R. Paula (ICB/USP)
Sebastião Timo Iaria (ICB/USP)

Coordenadores de Programas da SBM

Microbiologia de Alimentos (Sebastião T. Iaria - ICB/USP);
Microbiologia Clínica (Sérgio E. L. Fracalanza - UFRJ/RJ);
Microbiologia Industrial (Leonardo Perego Jr. - FCF/USP);
Microbiologia Ambiental (Maria Therezinha Martins - ICB/USP);
Micologia (Benedito Corrêa - ICB/USP);
Microbiologia do Solo (Ely Nahas - UNESP - Jaboticabal/SP);
Micotoxinas (Mirna Sabino - IAL - SP);
Infecções Hospitalares (Carlos Emílio Levy - FMRP);
Taxonomia. Coleções de Cultura (Vanderley P. Canhos - UNICAMP - 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; 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, 1374
05508 - São Paulo - SP - Brasil
Fone: (011) 813-9647
TELEX: 11 35085
FAX: 88 79875

EDITORIAL

Desde outubro de 1987 a Direção da Revista de Microbiologia tem seguido uma política de aprimoramento gradativo a nível científico e administrativo.

Os trabalhos enviados para publicação somente tem sido aceitos após aprovados por dois revisores, escolhidos dentro da comunidade científica nacional. Havendo impasse são submetidos a um terceiro e ainda havia a possibilidade de que o autor recorresse ao Conselho Diretor da Revista.

Através dessa sistemática, desde outubro de 1987 até dezembro de 1989 (Rev. 18:3 a Rev. 20:4) foram publicados 201 trabalhos e recusados 48.

O fluxo de entrada de trabalhos novos tem sido de 2 por semana e a demora para publicação, que era em torno de 12 meses ou mais, foi reduzida para 6-8 meses, em virtude do aumento do número de trabalhos de 17 para 22 por revista. Nesse período, a Revista foi publicada trimestralmente e sem nenhum atraso.

Em termos de divulgação a nível nacional a Revista tem sido enviada para todos os sócios quites com a SBM e, através de assinatura anual, para indústrias, laboratórios particulares e para 109 bibliotecas. A nível internacional tem sido enviada também através de assinatura, para bibliotecas de diversos países como Alemanha, Argentina, Canadá, Chile, China, Colômbia, Portugal, França, Inglaterra, Suíça, USA, Venezuela, etc...

Durante esse período contamos com apoio constante do MCT, CNPq, e FINEP por meio do Programa de Apoio a Publicações Científicas, mas em 1989 esse auxílio ficou extremamente defasado, chegando a cobrir apenas 2% dos custos da Revista.

Nos dois últimos números recorremos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo que, num espírito científico louvável, prontamente atendeu nossa solicitação e as dificuldades foram minimizadas.

Temos nos defrontado com obstáculos de toda ordem mas o apoio e o reconhecimento da comunidade tem feito com que a Revista a cada dia se fortaleça e se firme, a despeito da crítica infundada que por vezes parte de pequenos grupos alheios a vontade de uma comunidade.

Dentro dessa política de aprimoramento, a Revista de Microbiologia inicia 1990 com importantes modificações como: a implantação do Conselho Editorial, a publicação em português e inglês, inclusão de resumo mais abrangente em inglês e ainda importantes mudanças na apresentação gráfica.

A fim de que se implantasse o Conselho Editorial amplo, foram contatados renomados cientistas que prontamente atenderam a SBM e aos quais expressamos nossos agradecimentos por esse valioso apoio. Ao Conselho competirá: efetuar o acompanhamento da Revista avaliando sua qualidade; emitir opiniões sobre possíveis modificações; julgar trabalhos enviados ou indicar outros profissionais para fazê-lo; dirimir dúvidas quando autores de trabalhos não aceitos solicitarem nova revisão, enfim, participar ativamente da política científica da Revista. Assim como tem acontecido, continuaremos contando com a assessoria dos membros da SBM, ou de especialistas de outras áreas, no julgamento de trabalhos e, embora esses colegas não sejam identificados para os autores, consideramos que, como reconhecimento pelo trabalho, seus nomes devam ser apresentados no último número de cada ano.

As publicações passarão a ser feitas apenas em português e inglês. No entanto, visando maior divulgação e o acesso de pesquisadores do exterior às informações, será exigido que os resumos em inglês sejam mais consistentes a fim de que possam ser fontes de consultas.

Atendendo ao novo estatuto da SBM, aprovado no XV Congresso Brasileiro de Microbiologia (Ribeirão Preto, julho/89), estão sendo apresentadas as modificações da Diretoria, com a inclusão do Conselho Fiscal e dos Coordenadores de Área. A partir deste número, foi incluída, ainda, a relação das indexadoras da Revista atendendo às críticas recebidas por essa omissão.

Quanto à forma, algumas modificações foram feitas: os textos são digitados em microcomputador e impressos a laser; as dimensões foram alteradas visando maior economia de material e a capa modificada.

Esperamos que a nova Revista de Microbiologia atenda às suas expectativas e que recebamos sua

colaboração através do envio de seus melhores trabalhos.

Esta revista, que há vinte anos tem mantido – a despeito de dificuldades políticas e financeiras – a regularidade de suas publicações, acredita que é da sua colaboração o nosso fortalecimento.

A partir desse número a Direção Executiva da Revista de Microbiologia passará, por indicação da Diretoria da SBM, a ser de responsabilidade do Prof. Dr. Flávio Alterthum, docente do Depto. de Microbiologia do ICB/USP, membro dos mais ativos da Sociedade Brasileira de Microbiologia, que se encarregará da condução da Revista pelo longo caminho que ainda temos a percorrer.

DIRETORIA DA REVISTA DE MICROBIOLOGIA

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA
VOLUME 21 JANEIRO-MARÇO 1990 NÚMERO 1
REV. MICROBIOL. (S. PAULO), 21(1)

CONTEÚDO-CONTENTS	PAG
Toledo, M.R.F.; Trabulsi, L.R. Freqüência de <i>Escherichia coli</i> enteroinvasora em crianças com diarréia e em controles, em São Paulo, SP, Brasil Frequency of enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> in children with diarrhea and healthy controls, in São Paulo, SP, Brazil	1
Vargas, A.A.T.; Athayde, J.T.; Graham, P.H. Métodos de inoculação do feijoeiro com <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>phaseoli</i> Methods of bean inoculation with <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>phaseoli</i>	5
Campos, E.P.; Dib Neto, J.; Unterkircher, C.; Camargo, Z.P. Avaliação sorológica na evolução de 20 doentes com Paracoccidioidomicose Serological evaluation in follow up of the Paracoccidioidomycosis patients	11
Rosa, C.A.; Resende, M.A. de; Franzot, S.P.; Moraes, P.B. de; Barbosa, F.A.R. Distribuição de leveduras e coliformes em um lago do Karst do Planalto de Lagoa Santa – MG, Brasil Yeasts and coliforms distribution in a paleo-karstic of Lagoa Santa Plateau – MG, Brasil	19
Araújo, J.M. de; Azevedo, J.L. de Efeitos da acriflavina em diferentes espécies de <i>Streptomyces</i> produtores de actinomicina Effects of acriflavine on three actinomycin producer species of <i>Streptomyces</i>	25
Hofer, E.; Hernandez, D. Incidência de <i>Vibrio cholerae</i> não 01 em afluentes de estações de tratamento de esgotos da cidade do Rio de Janeiro, RJ Incidence of non-01 <i>Vibrio cholerae</i> in influents of sewage treatment plants in Rio de Janeiro city, RJ, Brazil	31
Danelli, M. das G.M.; Peralta, J.M.; Teixeira, L.M.; Formiga, L.C.D. Anticorpos monoclonais para a toxina diftérica: produção e análise através de técnicas imunoenzimáticas Monoclonal antibodies to diphtheria toxin: production and analysis by immunoenzymatic techniques	41
Fernández, H.; Trabulsi, L.R. Comparação de dois meios de cultura e valor do exame direto no diagnóstico da infecção intestinal por <i>Campylobacter jejuni/coli</i> Comparison of two culture media and value of direct microscopic examination for the diagnosis of the intestinal infection due to <i>Campylobacter jejuni/coli</i>	49
Monteiro, R.T.R.; Baraibar, A.; Tsai, S.M. Sobrevivência de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>phaseoli</i> em sementes tratadas com fungicidas Survival of <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv <i>phaseoli</i> on fungicide treated seed	55

Schoenlein-Crusius, I.H.; Pires, C.L.A.; Milanez, A.I. Successão fúngica em folhas de <i>Quercus robur</i> L. (Carvalho) submersas em um lago situado no município de Itapecerica da Serra, SP Fungal succession on <i>Quercus robur</i> L. leaves submerged in a lake in the municipality of Itapecerica da Serra, SP	61
Barbosa, R. de C.S.B.C.; Giesbrecht, A.M.; Montanari, C.A.; Miller, J. Estudos preliminares da atividade antimicrobiana de novas acil-semicarbazidas e aciltio-semicarbazidas Preliminary studies of the antibiotic activity of some new acylsemicarbazides and acylthiosemicarbazides	69
Cereda, M.P.; Bonet, A.F.; Valles, S.; Alberola, J. Tratamento anacróbio em duas fases, de suspensões amiláceas II. Fase matanogênica. Influência da adição de CN ⁻ A two-phase anaerobic treatment of starch suspensions II. Methanogenic phase. Influence of CN ⁻ addition	73
Milanese-Rubilar, A.A.; Maugeri, F. Modelling alcohol production and cell viability in a cascade reactor with immobilized cells	79
Ruiz, R.L.; Môs, E. do N. Produção de biomassa de <i>Spirulina maxima</i> para alimentação humana e animal	85
Tauk, S.M.; Schoenlein-Crusius, I.H.; Petenate, A. Modelo ecológico dos nutrientes, microorganismos e atividade enzimática de solo sob vegetação de cerrado tratado com vinhaça, Corumbataí, SP Ecological model of nutrients, microorganisms and enzymatic activity of soil in a cerrado area treated with vinasse, Corumbataí, SP	99
Solari, C.A.; Reis, E.M.F. dos; Hofer, E.; Basílio, C.A.; Valido, C.M.S. de R.; Luna, L.L. Pesquisa de <i>Helicobacter (Campylobacter) pylori</i> em pacientes com queixas referentes ao trato gastrointestinal superior <i>Helicobacter (Campylobacter) pylori</i> in patients with upper gastrointestinal symptoms	109
Kroon, E.G.; Ferreira, P.C.P.; Golgher, R.R. Eficiência de várias amostras do vírus da doença de Newcastle na produção de interferon humano de membranas amnióticas	115
Kroon, E.G.; Novo, M.A. da S.; Ferreira, P.C.P.; Golgher, R.R. A produção de interferon humano de membranas amnióticas (IFN-MA) Production of human amniotic interferon	121
Mazur, C.; Machado, R.D. The isolation and identification of the contagious ecthyma virus of caprines in cell cultures	127
Martins, R.M.B.; Golgher, R.R. Relação entre propriedades biológicas do vírus parainfluenza 1 e produção de interferon humano de membrana amniótica Biological properties of parainfluenza 1 virus and human amniotic interferon production	131
Informações Técnico-Científicas SBM	137

FREQUENCY OF ENTEROINVASIVE *ESCHERICHIA COLI* IN CHILDREN WITH DIARRHEA AND HEALTHY CONTROLS, IN SÃO PAULO, SP, BRAZIL.

M. Regina F. Toledo¹
Luiz R. Trabulsi¹

SUMMARY

The frequency of enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) was determined in the feces of 2 groups of children living in São Paulo, Brazil, whose ages ranged from 1 day to 5 years. One of these groups consisted of 224 children living in a slum, being 107 with acute diarrhea (cases) and 117 without any gastrointestinal disturbances (controls). The other group was formed of 915 children who lived in different areas of the city, 701 being cases and 214 being controls. In the slum children EIEC was isolated from 15.9% of the cases and 6.0% of the controls. From the non-slum population, the frequency of EIEC was much lower, being 2.3% and 0.9% in cases and controls, respectively. In the two groups of children having diarrhea the frequency of EIEC increased in accordance with the age of the children, being in the slum group 7.1% (< 1 year), 16.7% (1 to 2 years) and 20.0% (> 2 years); in the non-slum group its frequency was relatively smaller in the 3 age groups. In the over 2-year-old children having diarrhea EIEC was the enteropathogen most frequently isolated from the slum children (20.0%) and the fourth most frequent agent (7.6%) in the non-slum group. In this latter group EIEC was more frequent than *Salmonella*, EPEC, Rotavirus, and *Yersinia*. In both control groups EIEC was isolated only from the over 2-year-old children, being 14.9% in the slum population and 6.2% in the non-slum population. All the ten known EIEC serotypes were isolated in this study. A new EIEC serotype was isolated as well.

INTRODUCTION

Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) are *E. coli* bioserotypes that cause a *Shigella*-like disease in man. At present, the following *E. coli* O serogroups or sub-groups are known to contain EIEC bioserotypes: 28ac, 29, 112ac, 124, 136, 143, 144, 152, 164, and 167 (3, 6, 9, 11, 12, 14).

EIEC bioserotypes have been found in association with both sporadic and endemic acute diarrhea in several countries (7, 8, 10, 14, 15).

However, the information available on the role played by these organisms in endemic diarrhea of children is very scant and frequently incomplete. The studies, in which the screening of EIEC strains was made by the Serény test, usually included only a small number of children (4, 5). On the other hand, when the screening was made by agglutination tests, only part of the known EIEC bioserotypes was searched (14). However, recently Taylor et al. (10) have studied 200 children with diarrhea, in Thailand, using methods that

1 Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Escola Paulista de Medicina, Rua Botucatu, 862 – 3º andar – Edifício Ciências Biomédicas, 04023 São Paulo SP, Brazil

would detect any EIEC strains, independently of their bioserotypes.

In the present study, we have investigated the frequency of EIEC bioserotypes in the feces of a large number of children with diarrhea and controls, screening the strains by biochemical and serological tests, and by the Serény test. The results obtained suggest that EIEC may be very frequent agents of endemic diarrhea, depending on the age and living conditions of the children.

The results described in this study were partially presented in the XI Congress on Tropical Medicine and Malaria, Calgary, Canada, 1984.

MATERIAL AND METHODS

Children studied – Two populations of children, belonging to low income families, were studied. One population consisted of children living in a slum, located in the southeast of São Paulo city; and the other one, consisted of non-slum children living in different areas of the city. The slum children population included 107 cases and 117 controls and the non-slum ones, 701 cases and 214 controls. Cases and controls in both populations were, respectively, children with acute diarrhea and without symptoms of intestinal infections, at the time of feces collection for culture. The children with diarrhea had fluid stools at the time of admission and more than the usual number of stools per day. The slum children were studied between March 1982 and June 1983, and the non-slum ones between February 1977 and May 1982.

Isolation and identification of EIEC and other enteropathogens – EIEC were isolated by plating the feces on MacConkey and SS media (Difco Laboratories). For the identification of the colonies, the following steps were performed:

- 1) five to ten lactose-negative and lactose-positive colonies, growing on both media, were identified by the following biochemical tests: gas from glucose, urease, H₂S, phenylalanine, lysine, Simmons'citrate, motility, and indole;
- 2) strains suspected of EIEC, that is, the lysine-negative ones (6, 9, 12), were submitted to slide agglutination tests in enteroinvasive *E. coli* antisera. Antisera against the following *E. coli* O serogroups were used: 28ac, 29, 112ac, 124, 136, 143, 144, 152, 164, and 167. These antisera were prepared in rabbits according

to the procedures described by Edwards and Ewing for preparation of *E. coli* antisera (2);

- 3) one agglutinating and one non-agglutinating lysine-negative strain of each child were both submitted to the Serény test (13). Only the *E. coli* strains positive in the Serény test were considered to be EIEC.

Enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), *Yersinia enterocolitica*, and *Campylobacter* were isolated and identified as described elsewhere (13). For the isolation and identification of *Shigella* and *Salmonella* and for all the techniques used in this study, the recommendations of Edwards and Ewing were followed (2). Rotavirus was searched by the "Rotazyme" ELISA method (Abbot Laboratories).

RESULTS

EIEC frequency in the slum children – In the slum children (Table 1), EIEC were found in 15.9% of the cases, and in 6.0% of the controls. Among the cases, the rate of isolation increased sharply with the age of the children. It started with 7.1% in the children under 1 year, increased to 16.7% in the children between 1 and 2 years, and reached 20% in those children over 2. In the control group, these bacteria were isolated only from the children over 2, in a frequency of 14.9%.

As compared with the other agents isolated from the cases EIEC were the 4th more frequent

Table 1 – Frequency of EIEC in slum children with diarrhea (cases) and in controls in different age groups

Age group (years)	Cases			Controls		
	Total	With EIEC		Total	With EIEC	
		Nº	%		Nº	%
< 1	28	2	7.1	50	0	0.0
1-2	24	4	16.7	20	0	0.0
> 2	55	11	20.0	47	7	14.9
Total	107	17	15.9	117	7	6.0

enteropathogen in children under 1 year, the second one in children between 1 and 2, and the first in the children over 2.

EIEC frequency in the non-slum children – Table 2 shows the frequency of EIEC in the non-slum children. In contrast with the slum ones, EIEC were found in a relatively small percentage of the children with diarrhea, except for those over 2 years. In this age group, they were found in 7.6%

DISCUSSION

The main aspect of this study is the demonstration that EIEC can be found in high frequency in children with endemic diarrhea, a fact that has not been recognised so far. In the slum, those bacteria were the second most frequent enteropathogen in the children 1 to 2 years old, and the first one in those aged 2 or more. In the non-slum population, although the frequency was not so high, they were isolated more frequently than *Salmonella* and other enteropathogens, from the children over 1 year.

Comparison of our results with those referred in the literature is of limited value because frequently the populations studied and the methods used are not comparable. However, it should be mentioned that recently Chatterjee and Sanyal (1) reported the isolation of EIEC strains from 43 (16.3%) of 263 patients hospitalized with diarrhea disease in Calcutta and Taylor and coworkers (10) found these organisms in 10 (5%) of 200 children with dysentery in Thailand.

Analysis of the data in Tables 1 and 2 shows that EIEC strains were rather frequent in children aged 2 or more, without diarrhea, suggesting that immunity against EIEC infection was relatively common among those children. This fact raises doubts on the etiological significance of EIEC in the diarrhea presented by the children of the same age group.

Regarding serotypes it is interesting to note the high prevalence of 5 of them and that all the 10 known serotypes as well a new one were found in this study. Studies to determine the O antigen of this new EIEC serotype are in progress.

RESUMO

Freqüência de *Escherichia coli* enteroinvasora em crianças com diarréia e em controles, em São Paulo, SP, Brasil.

A freqüência de *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC) foi determinada nas fezes de 2 grupos de crianças, na faixa etária de 1 dia a 5 anos, habitantes da cidade de São Paulo. Um dos grupos era constituído de 224 crianças de uma favela, sendo 107 com diarréia aguda (casos) e 117 controles. O outro grupo consistia de 915 crianças que habitavam diferentes áreas da cidade, sendo 701

Table 2 – Frequency of EIEC in non-slum children with diarrhea (cases) and in controls in different age groups

Age groups (years)	Cases			Controls		
	Total	With EIEC		Total	With EIEC	
		Nº	%		Nº	%
< 1	549	8	1.4	151	0	0.0
1-2	86	3	3.5	31	0	0.0
> 2	66	5	7.6	32	2	6.2
Total	701	16	2.3	214	2	0.9

of the children. In the control group, these bacteria were found only in the children over 2, similar to what was observed in the controls, in the slum population. In the cases of this population EIEC were the 7th most frequent enteropathogen in the children under 1 year and became the 4th in the children over 2. In this age group they were more frequent than *Salmonella*, EPEC, Rotavirus, and *Yersinia*.

Serotypes of EIEC strains – Although all ten known EIEC serotypes have been isolated in this study, serotypes 028ac, 0136, 0167, 029 and 0143 accounted for 78.6% of the strains. Two EIEC strains having the same O antigen did not react with any of the antisera used. These strains were antigenically related to *Shigella flexneri* 4 and to some *E. coli* O antigens.

casos e 214 controles. Nas crianças da favela, EIEC foi isolada de 15,9% dos casos e de 6,0% dos controles. Na população não favelada, sua freqüência foi bem menor, tendo sido de 2,3% e 0,9%, em casos e controles, respectivamente. Nas crianças com diarréia, faveladas e não faveladas, a freqüência de EIEC cresceu a medida que aumentou a idade das crianças, tendo sido, na população favelada, 7,1% (menores de 1 ano), 16,7% (entre 1 e 2 anos) e 20,0% (maiores de 2 anos). Na população não favelada, a freqüência destes colibacilos foi relativamente menor, nas 3 faixas etárias. Nas crianças com diarréia, acima de 2 anos, EIEC foi o enteropatógeno mais freqüentemente isolado das crianças faveladas (20,0%) e o 4º agente mais freqüente (7,6%), em crianças não faveladas, sendo, neste último grupo de crianças, mais freqüente que *Salmonella*, EPEC, Rotavirus e *Yersinia*. Nos 2 grupos-controle, EIEC foi isolada apenas de crianças acima de 2 anos, em uma freqüência de 14,9%, na população da favela e de 6,2%, na população não favelada. Todos os dez sorotipos isolados de EIEC foram isolados neste estudo, assim como, também, um novo sorotípo de EIEC.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge the help of Dr. Jayme Murahovschi and Dr. Ulysses Fagundes Neto, who were responsible for the clinical studies of the children. We are also grateful to Sonia M.S. Kitagawa and Arelis L. Torres, our graduate students, for the bacteriological assistance and to Prof. José Alberto Neves Candeias, for the identification of Rotavirus.

This work was supported by grants from FINAEP (Financiadora de Estudos e Projetos), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), and FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo).

REFERENCES

- Chatterjee, B.D. & Sanyal, S.N. – Is it all Shigellosis? *Lancet.*, ii: 574, 1984.
- Edwards, P.R. & Ewing, W.H. – Identification of Enterobacteriaceae. 3rd. ed. Minneapolis, Burgess Publishing Co., 1972.
- Gross, R.J.; Thomas, L.V.; Cheasty, T.; Day, N.P.; Rowe, B.; Toledo, M.R.F. & Trabulsi, L.R. – Enterotoxigenic and enteroinvasive *Escherichia coli* strains belonging to a new O group, 0167. *J. Clin. Microbiol.*, 17: 521-523, 1983.
- Guerrant, R.L.; Moore, R.A.; Kirschenfeld, P.M. & Sande, M. – Role of toxigenic and invasive bacteria in acute diarrhea of childhood. *N. Engl. J. Med.*, 293: 933-936, 1975.
- Gurwith, M.J. & Williams, T.W. – Gastroenteritis in Children: A two-year review in Manitoba. I. Etiology. *J. Infect. Dis.*, 136: 239-247, 1977.
- Kano, E.; Peixoto, E.S.; Gonçalves, L.M.; Calzada, C.T.; Pessôa, G.V.A. – Isolamento de *Escherichia coli* invasora, em São Paulo, no período de junho de 1978 a dezembro de 1980. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 41: 37-41, 1981.
- Lányi, B.; Szita, J.; Ringelmann, B. & Kovach, K. – A waterborne outbreak of enteritis associated with *Escherichia coli* serotype 124:72:32. *Acta. Microbiol. Hung.*, 6: 77, 1959.
- Sakazaki, R.; Tamura, K. & Saito, M. – Enteropathogenic *Escherichia coli* associated with diarrhea in children and adults. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, 20: 387-399, 1967.
- Silva, R.M.; Toledo, M.R.F. and Trabulsi, L.R. – Biochemical and cultural characteristics of invasive *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, 11: 441-444, 1980.
- Taylor, D.N.; Echeverria, P.; Pál, T.; Sethabut, O.; Saiborisuth, S.; Sricharmorn, S.; Rowe, B. & Cross, J. – The role of *Shigella* spp, enteroinvasive *Escherichia coli*, and other enteropathogens as causes of childhood dysentery in Thailand. *J. Infect. Dis.*, 153: 1132-1138, 1986.
- Toledo, M.R.F. & Trabulsi, L.R. – New invasive *Escherichia coli* strain. *J. Clin. Microbiol.*, 11: 422-423, 1980.
- Toledo, M.R.F. & Trabulsi, L.R. – Correlation between biochemical and serological characteristics of *Escherichia coli* and results of the Serény test. *J. Clin. Microbiol.*, 17: 419-421, 1983.
- Trabulsi, L.R. – Microbiologia das infecções intestinais. Rio de Janeiro. Atheneu (Atualização em Microbiologia Clínica vol. 1), 1981.
- Trabulsi, L.R.; Toledo, M.R.F. & Zuliani, M.E. – Novas bactérias patogênicas para o intestino do homem. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 9: 31-39, 1967.
- Tulloch, E.F. Jr.; Ryan, K.J.; Formal, S.B. & Franklin, F.A. – Invasive enteropathic *Escherichia coli* dysentery: An outbreak in 28 adults. *Ann. Intern. Med.*, 79: 13-17, 1973.

Recebido para publicação em 18/8/89.

MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DO FEIJOEIRO COM *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* BV *PHASEOLI*

Alvaro A. T. Vargas¹
José T. Athayde²
Peter H. Graham³

RESUMO

Foram conduzidos dois experimentos, objetivando testar formas de inoculação de sementes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*, L.) com *Rhizobium*. No primeiro experimento, conduzido em casa-de-vegetação com um solo ácido, foram avaliados os efeitos da inoculação com a peletização das sementes com CaCO₃ e com a aplicação de solução de sacarose utilizando estirpes de *Rhizobium* e cultivares de feijão, que diferiam quanto a tolerância a pH ácido em dois níveis de calagem. Houve efeito do método de inoculação, cultivar e calagem no peso dos nódulos secos e na matéria seca da planta. A utilização do cultivar ou do *Rhizobium* tolerante a acidez melhorou o desenvolvimento das plantas. A peletização das sementes diminuiu o estresse de acidez do solo. Entretanto, o melhor crescimento das plantas foi observado quando cultivar e estirpe de *Rhizobium* eram tolerantes a acidez, estavam associados à calagem no solo, e o método de inoculação incluiu a peletização das sementes. O segundo experimento, conduzido em condições de campo, avaliou o efeito de estreptomicina aplicado nas sementes, na simbiose do feijoeiro com os rizóbios nativos no solo, assim como 4 formas de inoculação: mistura das sementes com água, com solução de sacarose, com solução de goma arábica e peletização das sementes. A estreptomicina, na dosagem utilizada, aumentou a nodulação natural no feijoeiro. Houve efeito da inoculação das sementes, no número e tamanho dos nódulos e no rendimento de grãos com relação à testemunha. Não houve diferenças entre os métodos de inoculação, exceto no tamanho dos nódulos. A utilização de água isoladamente, aplicada junto ao inoculante, apresentou a maior quantidade de nódulos pequenos.

INTRODUÇÃO

A inoculação das sementes de feijão com o seu *Rhizobium* homólogo tem se apresentado como uma prática agrícola capaz de substituir a fertilização com nitrogênio mineral, proporcionando uma economia substancial nos custos de

produção desta cultura (7, 11). Na rizosfera do feijoeiro, os rizóbios inoculados nas sementes infectam os pelos radiculares culminando com a formação de nódulos simbióticos que reduzem o N₂ atmosférico até o NH₃ assimilável pela planta. Este método de inoculação tem se consistido na adição de água na pasta inoculante, antes de sua

1 Centro de Energia Nuclear na Agricultura, CENA-USP, C.P. 94, CEP 13400 - Piracicaba - SP, Brasil.

2 Empresa Capixaba de Pesquisa Agropecuária, EMCAPA, C.P. 391, CEP 29000 - Vitória - ES, Brasil.

3 Soil Science Department, University of Minnesota, St. Paul, MN 55108, USA.

mistura com as sementes das leguminosas (16).

Entretanto, vários fatores como a competição por sítios de infecção nodular com estirpes nativas já estabelecidas nos solos (10, 18), ou mesmo a acidez do solo (12, 13) podem afetar o estabelecimento e a colonização do solo destes rizóbios introduzidos através da inoculação das sementes. Visando principalmente favorecer a sobrevivência destes rizóbios inoculados, diversos métodos de inoculação têm sido testados por diferentes autores (3, 5, 6). Entre as diversas formas de inoculação destaca-se o uso de sacarose (2, 15) e a peletização das sementes através da adição de goma arábica junto à mistura das sementes com carbonato de cálcio (1, 4, 15).

Este trabalho teve como objetivo testar diferentes formas de inoculação de sementes de feijão, assim como verificar as possíveis implicações destas técnicas de inoculação, com rizóbios e cultivares de feijão que diferem quanto a tolerância a acidez do solo.

MATERIAL E MÉTODOS

Inoculação do feijoeiro em casa-de-vegetação

Este experimento foi conduzido em casa-de-vegetação em St. Paul, Minnesota, EUA, no período de maio a junho de 1984. As temperaturas neste período, durante o dia/noite no interior da casa-de-vegetação foram 28/23°C, respectivamente. O solo utilizado neste experimento foi coletado na região de Carimagua, Colômbia, e classificado como um Oxisolo (Latosolo). A análise química revelou os seguintes valores: pH (água/solo) = 4,6; $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+} = 1,4 \text{ meq}/100 \text{ g}$; $\text{K}^+ = 0,36 \text{ meq}/100 \text{ g}$; $\text{Al}^{3+} = 2,7 \text{ meq}/100 \text{ g}$; $\text{P} = 1,8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ e matéria orgânica = 4%. Foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado, no fatorial $5 \times 2 \times 2$, com três repetições, estudando-se cinco formas de inoculação em 2 cultivares de feijão e dois níveis de calagem. Os tratamentos de inoculação das sementes do feijoeiro foram: testemunha sem inoculação; inoculação com a estirpe CIAT632 + sacarose; inoculação com a estirpe CIAT899 + sacarose; inoculação com CIAT632 + peletização (com CaCO_3); inoculação com CIAT899 + peletização. As duas estírpes CIAT899 e CIAT632 são eficientes na fixação do N_2 e são tolerante e sensível a acidez, respectivamente (8). O meio de cultura foi o de manitol e extrato de levedura - YM (16), sendo que as células foram incubadas por 4

dias à 28°C. A contagem do número de células, utilizando a câmara de Petroff-Hausser e um microscópio de contraste de fase, apresentou uma população de $1,3 \times 10^9$ e $5,0 \times 10^9$ rizóbios/ml para as estírpes CIAT899 e CIAT632, respectivamente. Ambas suspensões de células foram diluídas em solução salina, assim de ajustar a concentração para 10^9 rizóbios/ml. No preparo dos dois inoculantes, foi utilizado turfa préviamente peneirada a 100 mesh, neutralizada com CaCO_3 e autoclavada por 1 hora a 126°C. Para cada 200 g de turfa, foram adicionados 50 ml de meio de cultura contendo a estirpe de *Rhizobium*. Os dois inoculantes foram incubados à temperatura ambiente por duas semanas. Antes de serem utilizados, foram realizadas duas contagens pelo método de diluição em placas, com o meio YM e agar.

Os dois cultivares de feijão utilizados, "Capixaba Precoce" e "Negro Argel", são tolerantes e sensíveis a pH 4,5, respectivamente (12). Os dois níveis de calagem, zero e 4 ton/ha, foram baseados na curva de neutralização do solo com CaCO_3 . A aplicação de 100 mg de CaCO_3 em 50 g de solo (4 ton/ha), foi suficiente para elevar o pH do solo de 4,6 para 5,7. Assim, para cada pote contendo 2,5 kg de solo, foram adicionados 5 g de CaCO_3 . Os vasos foram umedecidos até a capacidade de campo e incubados à temperatura ambiente por um mês. No plantio, todos os tratamentos receberam uma fertilização básica com KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 e MgSO_4 , na concentração de 150, 50 e $26 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, respectivamente. Foi adicionado 1 ml por pote de solo, da solução de micronutrientes contendo os seguintes elementos: 10 g Fe (SO_4)₇ H_2O ; 2 g (NH_4) MoO₄ \cdot 4 H_2O ; 0,5 g ZnSO₄ \cdot 7 H_2O ; 1,0 g CuSO₄ \cdot 5 H_2O ; 2,0 g H₃BO₃; 2,0 g MnSO₄; 20,0 g ácido cítrico; 1 litro de água destilada.

As sementes foram esterilizadas superficialmente com HgCl_2 0,02% (16), lavadas com água estéril e inoculadas. As dosagens do inoculante para 100 g de sementes foram: 10 ml de solução de sacarose (25% p/v); 3 g de inoculante, ou 10 ml de solução de goma arábica (40% p/v); 3 g de inoculante; 5 g de CaCO_3 no caso de peletização das sementes. Após a inoculação, as sementes foram secas por uma hora, sendo plantadas 10 sementes/vaso. Uma semana após a emergência, os potes foram desbastados para 2 plantas/vaso. A irrigação do experimento foi feita com água destilada, autoclavada por 126°C/1 hora. As plantas foram colhidas aos 43 dias após o plantio, sendo os nódulos destacados das raízes e secos a 60°C/3 dias, assim como a parte aérea da planta.

Inoculação do feijoeiro em condições de campo

O experimento foi instalado em novembro/1984, na fazenda experimental da EMCAPA, no município de Viana, estado do Espírito Santo, utilizando o delineamento experimental de blocos ao acaso, com três repetições, testando os métodos de inoculação das sementes de feijão na cultivar "Capixaba Precoce". A análise química do solo revelou os seguintes valores: pH (água/solo) = 5,0; Al^{3+} = 0,6 meq/100 g; $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ = 3,0 meq/100 g; P = 2 mg.kg⁻¹; K⁺ = 70 mg.kg⁻¹; matéria orgânica = 2,4%.

Seis tratamentos foram utilizados. Uma testemunha sem inoculação; um tratamento sem adição dos rizóbios, mas com a aplicação de estreptomicina nas sementes; e quatro métodos de inoculação, empregando-se sementes umedecidas com água, com solução de sacarose, com solução de goma arábica ou peletizadas com CaCO₃. A preparação do inoculante e as dosagens utilizadas, foram feitas conforme mencionado no experimento anterior. As estirpes de *Rhizobium* utilizadas neste experimento foram C-05 e SEMIA-487. O número de células no inoculante foi determinado pela diluição em placa, contendo o meio YM e agar. A adição de estreptomicina seguiu o mesmo procedimento utilizado na peletização das sementes com CaCO₃, mas sem o uso da pasta inoculante. Para este tratamento, a solução de goma arábica continha 300 mg.kg⁻¹ de estreptomicina.

A área total da parcela foi de 18 m², contendo 6 linhas de 6 m de comprimento, espaçadas de 0,50 m. As quatro linhas centrais foram reservadas para a avaliação do rendimento de grãos e as duas linhas restantes utilizadas como bordaduras e avaliações de nodulação. Um mês antes do plantio foi feita a calagem com 2 ton/ha de calcário dolomítico. A adubação básica foi realizada no plantio na seguinte dosagem (kg/ha): 150 de P₂O₅ (superfósфato simples); 16 de K (cloreto de potássio); 5 de Zn (sulfato de zinco); e 0,2 de Mo (molibdato de sódio). Aos 23 dias após a semeadura, foram realizadas as avaliações de nodulação, sendo determinado o número e diâmetro dos nódulos. O rendimento de grãos foi avaliado no final do ciclo da cultura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaio em casa-de-vegetação

Houve efeito ($P < 0,01$) para cultivar, cala-

gem, formas de inoculação e interação significativa destes fatores, no peso dos nódulos secos e na matéria seca da parte aérea da planta. A inoculação com *Rhizobium* melhorou a nodulação das duas cultivares utilizadas aumentando o rendimento da matéria seca das plantas. Na ausência da calagem, o cultivar "Capixaba Precoce" apresentou um maior peso da parte aérea da planta do que o cultivar "Negro Argel", quando a inoculação foi feita com CIAT899 + sacarose (Tabela 1). Entretanto, esta mesma diferença não foi observada quando a inoculação das sementes foi feita com a estirpe CIAT632 e sacarose. As estirpes CIAT899 e CIAT632 são tolerante e sensível a pH 4,5 + 100 uM de alumínio, respectivamente (8). Esta tolerância à acidez, provavelmente, contribuiu para que a estirpe CIAT899 estabelecesse uma simbiose mais eficiente nas condições deste experimento.

As diferenças mais marcantes no rendimento de matéria seca da parte aérea da planta, entre os cultivares "Capixaba Precoce" (CP) e "Negro Argel" (NA), podem ser observados nos tratamentos com a inoculação mas sem a calagem. Estes dois cultivares, CP e NA, são citados como tolerante e sensível a pH 4,5, respectivamente (12). Mesmo assim, o máximo rendimento em matéria seca, encontrado para os dois cultivares, foi com a aplicação da calagem. Vargas e Graham (12) encontraram um efeito benéfico do cultivar "Capixaba Precoce", no estabelecimento e na nodulação da estirpe CIAT632, com as plantas crescendo em vasos de Leonard (modificado) à pH 4,5. Este benefício é citado como um efeito do cultivar na rizosfera, diminuindo o estresse de acidez na estirpe CIAT632. Entretanto, neste ensaio, utilizando o solo "Carimagua" que possui um alto teor de Al^{3+} , um possível efeito do cultivar "Capixaba Precoce" neste rizóbio ficou limitado. Assim, para diminuir o estresse de acidez, foram necessários a utilização do cultivar e do *Rhizobium* tolerantes à acidez (Capixaba Precoce/CIAT899), ou a aplicação da calagem, quando um dos simbiontes era sensível à acidez.

As populações viáveis dos rizóbios inoculados foram 4,3 e $1,6 \times 10^8$ células/g de turfa, para as estirpes CIAT899 e CIAT632, respectivamente. Entretanto, o efeito benéfico dos rizóbios inoculados nestes experimento, foi possivelmente limitado pelas condições de estresse ácido do solo. No tratamento CIAT632 + peletização das sementes com CaCO₃ no cultivar Capixaba Precoce, houve um aumento no rendimento de matéria seca das plantas em 20% sobre o tratamento CIAT632 +

Tabela 1: Matéria seca da planta e peso dos nódulos secos das cultivares de feijão Negro Argel (NA) e Capixaba Precoce (CP) em dois níveis de calagem e diferentes formas de inoculação das sementes.

Cultivar	Calagem	Peso da matéria seca da planta (g/vaso)					
		Testemunha	Inoculação utilizando Sacarose		Peletização com CaCO ₃		CIAT 632
			CIAT 632	CIAT 899	CIAT 632	CIAT 899	
NA	zero	1.49	1.51	1.73	1.61	1.97	
	4 ton/ha	1.81	1.87	2.77	2.19	2.53	
CP	zero	1.32	1.80	2.61	2.25	1.91	
	4 ton/ha	1.72	2.18	2.67	2.28	2.86	
Peso dos nódulos secos (mg/vaso) *1							
NA	zero	1.77	1.91	1.33	1.91	9.06	
	4 ton/ha	2.88	6.14	15.39	5.63	12.48	
CP	zero	1.55	2.20	5.71	1.00	5.26	
	4 ton/ha	2.57	12.75	13.64	14.51	12.78	

*1: Dados transformados para análise sendo expressos como $\sqrt{x + 1}$. LSD 5% matéria seca da planta 0,52, peso dos nódulos, 2,13.

Tabela 2 – Número de nódulos por classes de diâmetro de nódulos e rendimento de grãos, obtidos através de inoculação com *Rhizobium* na cultivar Capixaba Precoce em função do método de inoculação. Avaliação realizada 23 dias após o plantio.

Tratamentos	Número de nódulos com diâmetro (mm) diferente, por planta				Número de nódulos por planta	Rendimento de grãos (kg/ha)
	< 2	2 – 3	3 – 5	> 5		
Água	25,4a	4,9a	4,6b	1,3a	36,3a	1581ab
Peletização CaCO ₃	11,7b	3,7a	9,5a	1,7a	26,6ab	1339ab
Goma Arábica	11,3b	3,6a	9,0a	1,2a	25,2ab	1584ab
Sacarose	16,5ab	4,3a	4,2a	1,1a	25,9ab	1665a
Testemunha	2,2c	1,0b	1,5c	1,0b	4,9c	1248b
Testemunha + Estreptomicina	13,1b	4,0a	3,9b	2,0b	21,6b	1236b

* Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de DUNCAN.

* Dados transformados em $\sqrt{x + 0,5}$, para análise de variância, exceto o peso de grãos.

sacarose nesta mesma variedade. De acordo com Vargas e Graham (14) a acidez pode afetar a multiplicação dos rizóbios na rizosfera do feijoeiro. A presença do CaCO₃ na superfície da semente provavelmente diminuiu o estresse da acidez do solo durante o estabelecimento desta simbiose.

Embora a avaliação dos nódulos neste experimento tenha sido realizada aos 43 dias após o plantio, parte dos mesmos se encontravam em avançado estado de senescência. Assim, os valores encontrados para o peso dos nódulos secos foram baixos, dificultando a correlação com a

matéria seca da planta. Entretanto, pode ser constatado um efeito benéfico na nodulação, quando a estirpe ou cultivar tolerante a acidez foram utilizados nos tratamentos onde não houve aplicação de calcário.

No tratamento testemunha (Tabela 1), a população de rizóbios nativos no solo foi suficiente para infectar as raízes do feijoeiro e formar nódulos. Nesses tratamentos, a calagem estimulou essa nodulação e aumentou o rendimento de matéria seca da planta nos dois cultivares.

A utilização de cultivares de feijão e estirpes de *Rhizobium* tolerantes a acidez, assim como a peletização das sementes com CaCO₃, contribuiu na fixação simbiótica do N₂. Isto, porém, não eliminou totalmente a interferência dos fatores de acidez do solo.

Inoculação do feijoeiro em condições de campo

Para todos os tratamentos com a inoculação das sementes com *Rhizobium*, houve um aumento no número e tamanho dos nódulos e no rendimento de grãos no feijoeiro cultivar "Capixaba Precoce" (Tabela 2). A concentração de rizóbios no inoculante antes de aplicado às sementes, foi superior a 10⁸ células/g de turfa. Esta dosagem parece ter sido o suficiente para proporcionar uma nodulação eficiente neste cultivar de feijão, mesmo existindo uma população nativa de rizóbios já estabelecida naquele local, conforme pôde ser constatado pela nodulação natural que ocorreu nas parcelas sem a inoculação (testemunha).

A mistura de turfa inoculante apenas com água, apresentou um maior número de nódulos com tamanho inferior a 2 mm. Como foi utilizado apenas um inoculante contendo uma mistura de duas estirpes, não temos uma explicação para esta diferença. A nodulação das leguminosas é geneticamente controlada por ambos os simbiontes. Entretanto, a influência do método de inoculação no tamanho dos nódulos, conforme registrado neste ensaio, merece maiores estudos.

Neste ensaio, a utilização de sacarose foi o melhor tratamento na produção de grãos (1665 kg/ha), proporcionando um aumento de 25% no rendimento de sementes sobre a testemunha não inoculada. Burton (2) encontrou um maior índice de sobrevivência do *Rhizobium* na superfície das sementes, quando foi utilizado uma solução de sacarose a 25%, do que quando utilizou apenas água para o preparo da pasta inoculante. Resultados similares foram encontrados por Vargas & Suhet (15), que compararam diversos métodos de

inoculação em sementes de soja com *Bradyrhizobium japonicum*. Estes autores obtiveram uma nodulação e fixação do N₂ mais alta com a mistura da pasta inoculante quando uma solução de sacarose (25% p/v) foi utilizado. No ensaio que conduzimos, foi esta à concentração de sacarose, mas trabalhando com rizóbios de crescimento rápido. Diferente dos rizóbios de crescimento lento (*Bradyrhizobium*), o *Rhizobium* é bastante versátil no seu requerimento nutricional quanto a fonte de carbono (9). Assim, o revestimento das sementes com sacarose, além de possibilitar uma maior sobrevivência ao *Rhizobium*, pode ter sido utilizado como fonte de energia para a sua multiplicação durante a germinação das sementes no solo.

A peletização das sementes tem sido observada como um dos métodos para diminuir o estresse da acidez durante o estabelecimento e infecção dos pelos radiculares pelos rizóbios (3), ou mesmo no aumento da capacidade competitiva pelas estirpes inoculadas, frente aos rizóbios nativos no solo (8). Isto parece ter sido irrelevante neste ensaio, já que não houve diferenças significativas entre os métodos de inoculação testados no número de nódulos e no rendimento de grãos. É provável que a calagem realizada neste solo tenha diminuído a possibilidade de ser detectado o efeito da peletização das sementes com CaCO₃, nos parâmetros avaliados.

A inclusão neste ensaio, do tratamento sem a inoculação com *Rhizobium*, mas tratando as sementes com estreptomicina, permitiu verificar um possível efeito de microrganismos antagônicos à população nativa de rizóbios neste solo. A estreptomicina aumentou a nodulação natural do feijoeiro, possivelmente ao inibir a multiplicação desta flora antagônica. Mas isto não foi o suficiente para aumentar o rendimento de grãos no feijoeiro. A influência de microrganismos antagônicos ao *Rhizobium*, como mixobactéria ou *Bdellovibrio*, podem afetar o estabelecimento dos rizóbios no solo e o processo de infecção dos pelos radiculares nas leguminosas (17). Este resultado sugere que maiores pesquisas sobre a flora microbiiana antagônica aos rizóbios, assim como alternativas para superar esta limitação devem ser desenvolvidos.

O fato mais relevante neste ensaio foi que todos os 4 métodos de inoculação das sementes com rizóbios, aumentaram a nodulação, possibilitando um aumento significativo no rendimento de grãos. A utilização desta prática agrícola poderá trazer uma sensível economia nos custos de produção desta cultura.

SUMMARY

Methods of bean inoculation with *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*

Two experiments were carried out studying methods of seeds inoculation with *Rhizobium* in beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). The first experiment undertaken in the green house using acid soil tested the effects of inoculation with addition of sucrose solution and pelletization of seeds with CaCO_3 . *Rhizobium* strains and bean cultivars differing in acid pH tolerance were used at two levels of liming. There was effect of inoculation method, cultivar and liming on nodule and shoot dry weight. The use of cultivar or *Rhizobium* tolerant to acidity improved plant development. Pelletization with CaCO_3 alleviated soil acidity stress. However, the best plant growth was achieved when both, *Rhizobium* and cultivar tolerant to acidity were used, lime was applied, and rhizobia were inoculated following seeds pelletization. The second experiment carried out under field conditions tested the effect of streptomycin application on bean seeds in the symbiosis with indigenous rhizobia population. Four inoculation methods were also tested. A mixture of seeds with water, sucrose solution, arabic gum solution, and seeds pelletization with CaCO_3 . Streptomycin application improved bean nodulation by the indigenous rhizobia population. Inoculation increased the number and size of nodules and grain yields. There was no significant difference among inoculation methods but nodule size. Use of water alone applied with the inoculant showed the highest number of small nodules.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arruda, N.B.; Dobereiner, J.; Germer, J. – Inoculação, adubação nitrogenada, e revestimento de calcário em três variedades de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). *Pesq. agropec. bras.* 3:201-205, 1968.
- Burton, J.C. – Methods of inoculating seeds and their effect on survival of rhizobia. In: Nutman, P.S. ed. *Symbiotic nitrogen fixation in plants*. Cambridge, England, Cambridge University Press, 1976. p. 175-189.
- Danso, S.K.A. – Nodulation of soybean in an acid soil: the influence of *Bradyrhizobium* inoculation and seed pelletizing with lime and rock phosphate. *Soil Biol. Biochem.* 20:259-260, 1988.
- Date, R.A. – Microbiological problems in the inoculation and nodulation of legumes. *Plant and Soil* 32:703-725, 1970.
- Faria, S.M.; De-Polli, H.; Franco, A.A. – Adesivos para inoculação e revestimento de sementes de leguminosas. *Pesq. agropec. bras. Brasília*, 20 (2):169-176, 1985.
- Gaur, Y.D. & Lowther, W.L. – Competitiveness and persistence of introduced rhizobia on oversown clover: influence of strain, inoculation rate and lime pelleting. *Soil Biol. Biochem.* 14:99-102, 1982.
- Graham, P.H. & Rosas, J.C. – Growth and development of indeterminate and climbing cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. inoculated with *Rhizobium*. *J. Agric. Sci. Cambridge* 88:503-508, 1977.
- Graham, P.H.; Viteri, S.E.; Mackie, F.; Vargas, A.A.T.; Palacios, A.H. – Variation in acid soil tolerance among strains of *Rhizobium phaseoli*. *Field Crops Res.* 5:121-128, 1982.
- Jordan, D.C. – Rhizobiaceae. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* vol. 1. N.R. KRIEG & J.C. HOLT (Eds.). Williams & Wilkins, Baltimore. pp 234-56, 1984.
- Lovato, P.E.; Pereira, J.C.; Vidor, C. – Flutuação populacional de estípites de *Rhizobium phaseoli* na rizosfera do feijão. *Rev. bras. Ci. Solo* 9:211-218, 1985.
- Ruschel, A.P.; Vose, P.B.; Matsui, E.; Victoria, R.L.; Saito, S.M.T. – Field evaluation of N_2 fixation and N -utilization by *Phaseolus* bean varieties determined by ^{15}N isotope dilution. *Plant and Soil* 65:397-407, 1982.
- Vargas, A.A.T. & Graham, P.H. *Phaseolus vulgaris* cultivar and *Rhizobium* strain variation in acid-pH tolerance and nodulation under acid conditions. *Field Crops Research* 19:91-101, 1988.
- Vargas, A.A.T. & Graham, P.H. – Cultivar and pH effects on competition for nodule sites between isolates of *Rhizobium* in beans. *Plant and Soil* 117:195-200, 1989a.
- Vargas, A.A.T. & Graham, P.H. – Acid pH and host-cultivar effects on early stages of the symbiosis between beans (*Phaseolus vulgaris*, L.) and *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*. *Energ. Nucl. Agric.* 10:17-29, 1989b.
- Vargas, M.A.T. & Suhet, A.R. – Formas e níveis de inoculação para a soja (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivada em solo de cerrado. In: *Seminário Nacional de Pesquisa de Soja*, II, Brasília, 1981. Anais. p. 670-677.
- Vincent, J.M. – A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Blackwell, Burgess and Son LTD, 1970. 164 p. (IBP Handbook, 15).
- Vincent, J.M. *Rhizobium: General Microbiology* In: *A treatise on dinitrogen fixation*. R.W.F. Hardy & W.S. Silver (Eds.). John Wiley & Sons, New York. p 277-366, 1977.
- Voss, M.; Freire, J.R.J.; Selbach, P.A. – Efeito de níveis da calcário no solo e na capacidade de competição de estípites de *Rhizobium phaseoli* por sítios de nodulação. *Pesq. agropec. bras.* 19:433-439, 1984.

Recebido para publicação em 4/9/89.

SEROLOGICAL EVALUATION IN FOLLOW UP OF THE PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS PATIENTS

Campos, E.P.¹
Dib Neto, J.²
Unterkircher, C.³
Camargo, Z.P.³

SUMMARY

Serological evaluation was employed to compare four (4) serodiagnostic tests in the follow up of Pbmycosis patients.

Immunodiffusion (ID), counterimmunoelectrophoresis (CIE), complement fixation test (CF) and magnetic enzyme linked immunoabsorbent assay (MELISA) were compared in the study of the follow up of 20 patients with Pbmycosis being 2 cases of the juvenile form and 18 cases of pulmonary progressive form. The radiological aspect mild, moderate and severe was reported in 2, 6 and 10 and evolutive study showed improvement in 2; worsening in 6 and maintenance in 10 cases. Cor pulmonale was observed in 2 patients.

The semestral serology enhance that: showed after 2 years that: 1. C.I.E. and C.F. positive testes were more observed in cases of clinical maintenance. 2. Clinical remission was followed by I.D. MELISA negative test. The semestral MELISA for clinical follow up of patients revealed improvement optical with densities inferior to 1,90 and relapses superior to 2,00.

INTRODUCTION

Paracoccidioidomycosis (Pbmycosis) is an endemic systemic disease in tropical America and more frequently found in Brazil. The cure is so rare because the disease has an usually a chronic evolution. The remission is observed only long term follow up of the patients (4, 7, 8, 9, 16).

Some authors attempted to demonstrate that there was an effective relationship between the clinical and serological characteristics during the evolution of this disease (4, 7, 8, 9, 11).

There is reasonable correlation between the complement fixation test (CF) with the course of

the treatment and this deep mycosis dissemination (4, 6, 10, 17).

The antigenic complexity of the pathogenic fungi, as well as the presence of similar antigenic components in other agents of the deep mycosis explains the serological cross-reactions, especially between Pbmycosis and histoplasmosis when CF is used (1, 2, 3, 9, 10, 17).

The purpose of this paper is to study the serological evaluation utilizing the comparison of several tests as follows: complement fixation (CF), immunodiffusion (ID), counterimmunoelectrophoresis (CIE), and magnetic enzymelinked immunosorbent assay (MELISA); to find out the

1 Depto. de Moléstias Infecciosas e Parasitárias, Dermatologia e Radiologia, Faculdade de Medicina - UNESP, 18610 Botucatu SP, Brasil

2 Residente do Depto. de Clínica Médica, Faculdade de Medicina - UNESP, 18610 Botucatu SP, Brasil

3 Depto. de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Escola Paulista de Medicina, São Paulo - Brasil

most effective tool for monitoring patients with Pbmycosis.

MATERIAL & METHODS

Patients

The study was carried out on 20 outpatients with Pbmycosis according to age range, sex, life habits and place of origin.

The clinical forms of the disease were identified on the clinical basis data and subsidiary tests. The most frequent clinical manifestation was recorded. All patients received previous treatment by Amphotericin B with 5% glucose solution through a y connection. The sera was obtained from 20 outpatients with Pbmycosis at semestral follow up during two years.

Radiological study

Pulmonary lesions in Pbmycosis were designated as follow: mild, moderate and severe, according to the established criteria from radiological findings by Campos et al (7,8).

Cor pulmonale like syndrome was characterized by radiologic, electrocardiographic and clinical evolutive findings (6, 7, 8).

Laboratory assays

Etiologic diagnosis of Pbmycosis was made in mycology examination of sputum direct or cytoinclusion and histopathology in all patients (14).

The adverse effects caused by Amphotericin B were recorded.

The assays CF, ID, CIE and MELISA were performed according to methods earlier described (1, 2, 3, 9, 10) Serologic profile was constructed during follow up all the outpatients.

Cure criteria

The patients were followed up for two years after semestral clinical evaluation to define remission, relapse or maintenance of Lutz's disease.

Maintenance-means a relative decrease of serological titers and minor laboratory clinical signs.

The remission and relapse represent respectively absence or evidence of clinical - serological - Laboratory manifestations.

Statistical analysis

Sera and clinical characteristics were compared by Mc Nemar and Goodman tests (11, 12, 13).

1. I.D. and MELISA serological types reactions were analysed during semestral clinical follow up by Mc Nemar tests (11).
2. The positive or negative tests were compared with clinical following up conditions, like maintenance relapse or remission by Goodman tests (12, 7, 3).
3. I.D., Melisa, C.I.E. and C.F. serological tests were compared during three semestral follow up utilizing χ^2 and Mc Nemar tests (11).

RESULTS

Patients

All patients were farmers, cigarettes smokers, age range from 13 to 64 years old. The male predominance was 19:1 ratio and 10 referred previous pulmonary disease 19 of them came from Botucatu's region (São Paulo State, Brazil).

The clinical forms Pbmycosis were acute or juvenile type in 2; chronic type in 18 (being 10 unifocal manifestation) of them. The mainly involvement were lungs, mucocutaneous and lymphatic systems. The adrenal, bone, liver, digestive and genital (Fallopian's tube and ovary) systems were involved in 5 from 8 multifocal forms. The clinical manifestations of Pbmycosis is showed in Table 1.

The clinical evaluation in 16 patients showed recovery in 10 and maintenance in 6 after 2 years of follow up. The collateral reaction like shivering and anorexia in 4 and phlebitis in 3 were observed during the Amphotericin B therapy.

Radiological study

Evolutive radiologic analysis of pulmonary lesions revealed: mild in 2, moderate in 6 and severe in 10 patients.

The radiologic examinations of pulmonary lesions demonstrated predominance of interstitial exsudates of the nodular and fibrotic types.

The evolutive study by chest X-rays disclosed improvement in 1, worsening in 7 and maintenance in 10 of lesion types. Two of them developed cor pulmonale like syndrome.

Table 1 – Clinical manifestations of Paracoccidioidomycosis

Clinical manifestations	Number
Respiratory	15
Tegumentary	7
Digestive	5
Lymphatic	3
Arthropathy	2
Genital	1
General Symptoms	1

Laboratory findings

Adverse effects of Amphotericin B were as follow: clearance creatinine decrease in 10; urea and creatinine sera increase in 3 (with hypercale-

mia 5.6 MEg/l in 3) and hypokalemia in 3 patients.

The hyperkalemia was recorded in arterial hypertension with decrease renal flow in 1, increased urea creatinine level sera and hyporeactive adrenal patients. Eletrocardiographic changes were described in 10 patients.

After 2 years no adverse effects of Amphotericin B therapy were observed in 20 outpatients.

The comparative study of serology with clinical evolution was performed after 2 years and the results are seen in the tables II, III and IV.

INTERPRETATIONS

1. I.D. and Melisa reactions presented similar results during semestral serology studies (Mc Nemar test).
2. I.D. and Melisa negative or positive serologies did not have statistical difference during clinical evaluation (Goodman tests).

Table 2 – Clinical and Serology evaluations in Paracoccidioidomycosis patients

Patients	Clinic	Serology					
		Pbmycosis	Evolution	R.F.C.	I.D.	C.I.E	Melisa
1. J.V.R.	Remission			1/128	+	1/64	1.7
2. L.V.F.	Remission			A.C.	-	-	0.38
3. A.A.B.	Remission			A.C.	-	1/8	0.39
4. J.M.N.	Remission			1/16	-	1/4	1.4
5. I.C.L.	Remission			A.C.	1/2	-	0.78
6. J.C.	Maintenance			1/128	1/32	1/128	2.0
7. J.R.	Maintenance			1/8	-	1/4	1.9
8. J.M.	Remission			-	-	-	1.9
9. W.H.	Maintenance			1/256	1/64	1/256	2.8
10. O.L.P.	Remission			A.C.	-	1/4	0.33
11. F.P.D.	Remission			A.C.	-	-	0.9
12. A.S.	Maintenance			1/64	1/16	1/64	0.92
13. G.L.	Remission			A.C.	-	1/8	0.72
14. H.J.B.	Remission			-	-	-	1.0
15. J.B.C.	Maintenance			A.C.	-	1/8	1.8
16. J.C.S.	Maintenance			A.C.	-	1/4	1.9

Titres values: 1. C.F. \leq 1/4 negative \geq 1/8 positive

2. I.D. \leq to 1/2 and C.I.E. \leq 1/4 & 1/6

3. Melisa \leq 1.90 \geq 2.00 I.D. \leq a/1/2

Table 3 – Semestral serology in 11 pbmycosis patients

Patients	Melisa			I.D.			C.I.F.		
	6m.	12m.	18m.	6m.	12m.	18m.	6m.	12m.	18m.
J.V.R.	1.70	1.58	1.43	+ 1/2	-	1/2 +	1/64	-	1/2
C.P.L.	1.70	1.70	2.00	-	-	-	-	-	-
F.R.O.	0.60	1.86	1.86	-	1/2	1/2	1/8	1/2	1/2
G.L.	0.72	2.08	2.10	-	1/4	1/4	1/84	1/8	1/8
I.C.L.	0.78	1.22	1.36	-	-	-	-	-	-
V.M.	1.90	3.60	2.50	+ 1/2	1/64	1/64	-	1/64	1/64
J.C.S.	1.90	2.00	2.00	1/1	1/1	1/1	1/4	1/4	1/4
V.P.	1.60	2.60	2.54	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32
F.D.P.	0.90	0.92	nihil	-	-	nihil	-	-	nihil
J.R.	1.90	2.00	nihil	-	-	nihil	-	-	nihil
J.J.F.O.	1.80	2.30	nihil	1/128	1/128	nihil	1/64	1/64	nihil

ID \leq - a 1/2

Titres values:

1) Melisa

 \geq 2.00 \leq 1.99CIE \leq - a 1/2

2) I.D.

 \leq a 1/2

3) C.I.E.

IV. 1/4; 1/8

V. a 1/2

VI. 1/4:1/8

Interpretations by Mc Nemar and Goodman tests

3. Similar results were obtained with C.F. and C.I.E. negative or positive serological tests during clinical evaluation (Goodman tests).
4. Negative serologies had significative association between I.D. and Melisa when were compared with CIE and C.F. reactions (Goodman tests).
5. I.D./Melisa negative serologies had significative association in clinical remission in the follow up of patients.
6. C.I.E. and C.F. positive serologies were obtained more often in clinical maintenance or relapse. Melisa optical densities less than 1.90 means remission while more than 2.00 define relapse/maintenance of the disease.

DISCUSSION

Concerning age range of patients (from 13 to 64 years old), the predominance of male over female (19:1 ratio) and professional activity, far-

mer workers most frequently found, our data are similar to those described by other published papers (4, 7, 8, 15). The susceptibility to emphysema is increase in heavy smoker patient predisposing a reactivation of pulmonary Pbmycosis focus (4, 5, 6).

Botucatu's region (São Paulo State) seems to have ecological peculiarities that favour the development of Paracoccidioides brasiliensis (4, 5, 6, 7, 8).

The mixed forms observed in 18 of 20 patients suggests the progressive feature or early systemic characteristic (4, 5, 6, 7, 8, 15). The abdomen like syndrome observed in only one patient, with genital involvement (Fallopian's tube and ovary) was related earlier by the authors (5).

The Addison like syndrome (adrenal hyporeactive) was demonstrated in one patient with pulmonary multifocal type (4, 5, 6, 7, 8).

The results of general clinical respiratory and lymphatic symptoms agreed with those reported by other authors (4, 5, 6, 7, 8, 15).

Likewise the predominance of bilateral in-

Table 4 - Semestral Serology in Pbmycosis patients

Patients	ID	Melisa	RFC	CIE
1. J.V.R.	+	1.70	1/128	1/64
2. F.P.D.	-	0.90	AC	-
3. I.C.L.	1/2	0.78	AC	-
4. J.M.N.	-	1.4	1/16	1/4
5. L.V.F.	-	0.38	AC	1/4
6. O.L.P.	-	0.33	1/16	1/4
7. F.R.O.	-	0.60	1/64	1/64
8. A.S.	1/16	0.92	AC	1/8
9. G.L.	-	0.72	1/8	1/4
10. J.R.	-	1.90	-	-
11. H.J.B.	-	1.00	AC	1/16
12. M.I.C.	-	2.00	AC	1/8
13. J.B.C.	-	1.80	AC	-
14. A.M.	-	0.84	-	1/32
15. W.P.	1/16	1.60	1/32	1/128
16. S.C.	1/32	2.00	1/128	1/8
17. A.A.B.	-	0.39	AC	-
18. J.M.	-	1.90	-	1/4
19. J.C.S.	-	1.90	AC	1/4
20. L.F.	1/4	1.15	1/8	1/4

Semestral serology evaluation by Mc Nemar and Goodman tests.

terstitial fibronodular pulmonary lesions were described in earlier published papers (4, 7, 8, 15).

The evolutive radiological analysis showed maintenance in 10; worsening in 7 and impairment in 1 of 18 patients and was similar to the results obtained in previous paper (4, 7, 8).

The presence of chest residual fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease are responsible for the development of cor pulmonale like syndrome in 2 patients (4, 6, 7, 8).

The absence of late reaction as well as the adverse reaction observed during the Amphotericin B therapy are similar to the literature data (4, 7, 8, 16).

The hyperkalemia associated with arterial hypertension, low renal flow and hyporeactive adrenal was described in 3 patients by the authors (4, 6, 7, 8). C.F., C.I.E., I.D. and Melisa reactions were compared utilizing semestral sera in follow up of patients. Significative correlation was observed between C.F. and C.I.E. tests with clinical maintenance or relapse of Pbmycosis patients. Campos & Cols. (1986) verified that I.D., C.F. and I.I.F. reactions are able, together, to define main-

tenance or relapse in longterm evaluation of 35 patients (4, 7).

Melisa and I.D. reactions were able to distinguish remission of maintenance in this patients. This facts were not observed with C.F. and C.I.E. tests in this present study. The anticomplementary sera in C.F. tests were identified by I.D. and Melisa reactions (1, 2). So, I.D. and Melisa represent an advantageous alternative to C.F. in diagnosis and during follow up of Pbmycosis patients (1, 2, 3).

Cano & Restrepo verified that the I.D. is more specific in the diagnosis than C.F. test during and after therapy of patients (9).

Campos & Cols (4, 5, 7) enhanced that it's difficult to correlate C.F. and Immunofluorescence tests with clinical remission criteria in longterm evaluation of Pbmycosis patients. On the other hand; I.D. together with C.F., I.I.F. and Pp enable to establish the clinical remission in 10 out of 35 Pbmycosis patients (7).

Recently, Camargo & Cols (3) demonstrated that *P. brasiliensis* Exo-antigens for I.D. tests were specific and had predictive value in serological study of patients.

Table 4 – Semestral Serology in Pbmycosis patients

Patients	ID	Melisa	RFC	CIE
1. J.V.R.	+	1.30	AC	-
2. F.R.O.	1/2	1.86	AC	1/1
3. J.J.F.D.	1/128	1.15	1/256	1/64
4. M.S.C.	-	2.72	-	-
5. V.M.	1/64	3.60	1/16	-
6. J.V.R.	1/2	1.43	AC	1/2
7. I.C.L.	-	1.22	-	-
8. G.P.L.	-	2.00	1/8	-
9. G.L.	1/4	2.08	1/32	1/8
1. J.V.R.	-	1.58	1/16	1/4
2. J.A.	1/16	2.20	1/32	1/16
3. G.P.L.	-	1.70	AC	-
4. V.P.	1/32	2.60	1/8	1/32
5. J.C.S.	1/1	2.00	AC	1/1
6. V.H.	1/64	2.80	1/256	1/256

35 – Serology – total – Titres values:

All patients with MELISA 2.00 had relapse or active disease maintenance.

Remission 1.90 – Relapse 2.00

RFC 1/8 positive = active or relapse

CIE and ID = negatives e 1/2 – relapse 1/4 : 1/8

R.F.C. 1/4 negative/remission A.C. = anticomplementary sera

R.F.C. A.C. = negative and 1/8 – active or relapse

Semestral serology evaluation by Goodman and Mc Nemar tests

The present study showed that I.D. and Melisa positive or negative tests had significative association during semestral follow up of patients. I.D. and Melisa were correlated more frequently with clinical remission of Paracoccidioidomycosis. These two new facts dysplaied that I.D. and Melisa together, are able to distinguish and to predict the evolution to clinical remission.

Our clinical results are similar to the ones serological evaluation study developed by other authors (1, 2, 3, 17).

On the other hand C.I.E. and C.F. positive reactions were observed more frequently in clinical maintenance or relapse similar to the results referred by Wheat, J.L. (17). These differences were important to establish the clinical in the serology data. In fact; I.D. and Melisa had specificity and had more predictive value than C.I.E. and C.F. tests during semestral follow up of Paracoccidioidomycosis (4, 7). I.D. serologies had a good

correlation with clinical evolutive study developed in deep mycosis by Campos & Cols (7, 8), Camargo and Cols (3); Wheat J.C. (17). Possibly, other fungal antibodies were findings in maintenance or clinical relapse (4, 7, 9, 17), similar to described in Histoplasmose and Pbmycosis (1, 12, 17).

In our research: 8 out of 16 sera had anticomplementary C.F. tests. These findings suggested others fungal antibodies or the quality of the sheep cells must be carefully controlled and also verified the complement in patients sera (17). We observed that anticomplementary C.F. were correlated with C.I.E. positive tests. However, the C.F. remains the gold standard serodiagnostic test in disseminated Paracoccidioidomycosis (6, 17). Campos & Cols dysplaied that C.F. tests are usefull for clinical following up of patients (4, 6, 7, 8).

The present study showed that remission should be defined only during a longterm evaluation where the real evolutive characteristics of

disease were observed (4, 5, 7, 8, 16).

We concluded that:

1. Clinical maintenance was correlated with semestral C.I.E. and C.F. positive serologies tests.
2. Clinical remission of Lutz's disease was followed by I.D. and Melisa negative tests.
3. I.D. and Melisa test are more accurate and have a good correlation with clinical evolution in semestral evaluation of Paracoccidioidomycosis patients.

RESUMO

Avaliação sorológica na evolução de 20 doentes com Paracoccidioidomicose

Compararam-se (4) quatro diferentes reações de sorodiagnóstico evolutivo da Paracoccidioidomicose (Pbmicose). Foram utilizados a I.D. (Imunodifusão), CIE (Contraímunoeletroforese), Fixação do Complemento (F.C.) e a Enzima Magnética ligada por imuno absorção (MELISA), na avaliação clínica semestral de 2 formas juvenil e de 18 formas pulmonares progressivas da Pbmicose.

O padrão leve, moderado e grave foi assinalado, respectivamente, em 2, 6 e 10 doentes, que mostraram na evolução: melhora em 2, piora em 6 e manutenção em 10 das lesões radiológicas avaliadas.

A sorologia semestral aplicada na avaliação de 20 doentes com Pbmicose revelou que: as reações CIE e FC positivas foram mais relacionadas com a manutenção, enquanto que as de I.D. e MELISA negativas estiveram diretamente relacionadas com a remissão clínica na Paracoccidioidomicose. Além disso, a reação de MELISA utilizada semestralmente nos doentes, mostrou que a remissão e a recaída corresponderam, respectivamente, a títulos inferiores ou iguais a 1.90 e superiores ou iguais a 2.00 densidade ópticas.

REFERENCES

1. Camargo, Z.P.; Gueston, J.L.; Drouhet, E. & Improvisi, L. - Magnetic enzyme linked immunosorbent assay (MELISA) for determination of specific IgG in paracoccidioidomycosis. *Sabouraudia*, 22, 291-299, 1984.
2. Camargo, Z.P.; Unterkircher, C. & Drouhet, E. - Comparison between magnetic enzyme linked immunosorbent assay (MELISA) and complement fixation test (C.F.) in diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Sabouraudia*, 24, 77-79, 1986.
3. Camargo, Z.P.; Unterkircher, C.; Campoy, S.P. & Travassos, L.R. - Production of *Paracoccidioides brasiliensis* Exoantigens for Immuno diffusion tests. *J. Clin. Microbiol.* 26:2147-51, 1988.
4. Campos, E.P.; Sartor, J.M.; Hecht, M. & Franco, M.F. - Aspectos clínicos e evolutivos de 47 doentes tratados pela Anfotericina B. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 26, 212-216, 1984.
5. Campos, E.P.; Torchio, L.N.; Lima, P.R.L.; Gomes, F.C.B.; Feracin, A.C.M.; Schellini, R.C. & Bacchi, C.S. - Paracoccidioidomicose genital feminino. Descrição de um caso clínico. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 28, 56-60, 1986.
6. Campos, E.P.; Torchio, L.N.; Cataneo, A.J.M. & Perotti, L.A. - Paracoccidioidomicose pulmonar agressiva: endotraqueite estenosante e cor pulmonale subagudo. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 28, 185-189, 1986.
7. Campos, E.P. & Cataneo, A.J.M. - Função pulmonar na evolução clínica de 35 doentes com paracoccidioidomicose. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 28, 330-336, 1986.
8. Campos, E.P.; Curi, P.R. & Cataneo, A.J.M. - Pulmonary function in 58 Paracoccidioidomycosis patients. p-84:71, 1988, Barcelona - Espanha.
9. Cano, L.E.; Brummer, E.; Stevens, D.A. & Restrepo, A. - An evaluation of the enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) for quantitation of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 24 - 467-475, 1986.
10. Fava Neto, C. - The serology of Paracoccidioidomycosis: present and future trends. Proceedings of the First Pan American Symposium on Paracoccidioidomycosis; Medellin - Pan-American Health Organization Publication, 254, 209-213, 1972.
11. Fleiss, J.L. - Statistical Methods for Rates and Proportions - New York; John Wiley & Sons, 233 p. 1972.
12. Goodman, L.A. - Simultaneous confidence intervals for contrast among multinomial populations. *Annals of Mathematical Statistics* - 35:716 - 25, 1964.
13. Goodman, L.A. - On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. *Technometrics* 7:247-54, 1965.
14. Iwama de Matos, M.C.F. - Cell block preparation for cytodiagnosis of pulmonary paracoccidioidomycosis. *Chest*, 75, 212-15, 1979.
15. Londero, A.T. - Paracoccidioidomicose patogenia, formas clínicas: Manifestações pulmonares e diagnóstico. *Jornal de Pneumologia*, 12, 41-60, 1986.
16. Washburn, R.G. & Bennet, J.E. - Paracoccidioidomycosis case report: cure with Amphotericin B and triple sulfa. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 24, 235-237, 1985.
17. Wheat, J.L. - The role of the serologic Diagnostic Laboratory and the Diagnosis of Fungal Disease: in Fungal Disease of the Lung-Sarosi, G.A. & Davies, S.P. New-York; Grune & Stratton Inc. Cap. 3, 43-60, 1986.

Recebido para publicação em 7/7/89.



DISTRIBUIÇÃO DE LEVEDURAS E COLIFORMES EM UM LAGO DO KARST DO PLANALTO DE LAGOA SANTA - MG, BRASIL

Carlos Augusto Rosa¹
Maria Aparecida de Resende¹
Sara Piancastelli Franzot¹
Paula Benevides de Moraes¹
Francisco Antonio R. Barbosa²

RESUMO

Foi estudada a distribuição de leveduras e coliformes totais e fecais em cinco estações de coleta na Lagoa Olhos D'Água, um lago do karst do Planalto de Lagoa Santa, no Estado de Minas Gerais, Brasil, durante o período de março de 1986 a março de 1987. As leveduras foram isoladas em ágar Sabouraud modificado (glicose 2%, peptona 1%, extrato de levedura 0,5%, ágar 2%, cloranfenicol 20 mg% e pH 3,7-4,0 com HCl) e incubadas a 25°C. Os coliformes totais e fecais foram determinados pela técnica do número mais provável. Além disto, na zona limnética foram medidos os seguintes parâmetros físico-químicos: temperatura da coluna d'água, pH, condutividade elétrica, oxigênio dissolvido, fosfatos totais dissolvidos, sólidos em suspensão e matéria orgânica dissolvida. À 1% de penetração de luz, foram obtidas correlações significativas entre as contagens microbianas e os teores de oxigênio dissolvido e fosfatos totais dissolvidos, sugerindo que estes fatores sejam importantes na regulação das populações microbianas neste ponto de amostragem. Nas profundidades de 100% e 10% de penetração de luz não foi observado nenhum padrão definido nas análises de correlação. Em três estações de coleta, o número de leveduras foi superior ao de coliformes fecais, sugerindo que as leveduras poderiam ser melhores indicadores do estado trófico de ambientes aquáticos.

INTRODUÇÃO

O número de trabalhos sobre a distribuição de leveduras em ambientes aquáticos tem aumentado gradativamente nos últimos anos. A maioria desses trabalhos tem demonstrado uma correlação entre as populações de leveduras e os níveis de poluição orgânica (2, 7, 8, 18).

Entretanto, existem poucos dados sobre a ocorrência de leveduras em lagos de água doce e principalmente em lagos tropicais, sendo a maio-

ria dos trabalhos existentes, feitos em ambientes de clima temperado. Além disso, pouca atenção tem sido dada ao papel exercido pelos fatores físico-químicos e biológicos na distribuição das leveduras em habitats aquáticos (9, 10, 16, 20, 22, 29).

A determinação de coliformes fecais e coliformes totais tem sido tradicionalmente usada no monitoramento da qualidade das águas. Apesar da aplicação extensiva das contagens de coliformes como indicadores de poluição fecal, existem

1 Laboratório de Micologia, Depto. de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas UFMG, Caixa Postal 2486, 30161 Belo Horizonte MG, Brasil

2 Laboratório de Limnologia, Depto. de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas UFMG, Caixa Postal 2486, 30161 Belo Horizonte MG, Brasil

controvérsias a respeito do seu uso. Alguns estudos sugerem que as altas temperaturas tropicais, a elevada radiação solar, a presença de predadores e de substâncias tóxicas podem diminuir a sobrevivência destes microrganismos que deixam de exercer uma função de indicadores da presença de patógenos em tais condições (6, 11, 15, 27).

No presente estudo, objetivou-se caracterizar a influência de fatores físico-químicos e biológicos na distribuição de leveduras e coliformes totais e fecais na Lagoa Olhos D'Água.

Trata-se de um pequeno lago peri-urbano, localizado na borda do karst do planalto de Lagoa Santa, o qual vem sofrendo considerável impacto do processo de urbanização ali instalado e que apresenta como características gerais, a ocorrência de uma comunidade de macrófitas emergentes, relativamente bem desenvolvida no seu litoral, além de receber uma carga variável de esgotos domésticos e assoreamento constante.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo – A Lagoa Olhos D'Água está localizada no município de Lagoa Santa, entre os paralelos 19°44' e 19°33' latitude sul e os meridianos 44°05' e 43°50'. Trata-se de um lago pseudo-cárstico assentado sobre embasamento de filito arenoso da série Bambei, que tem sido objeto de estudos limnológicos comparativos, visando a caracterização do acelerado processo de eutrofização cultural a que vem sendo submetido na última década (3, 4).

Amostragem – As coletas foram feitas a intervalos mensais no período de março de 1986 a março de 1987, em cinco estações previamente escolhidas (Figura 1), com as seguintes características: estação 1, localizada na zona limnética, no ponto de maior profundidade (aproximadamente 3,4 m), onde foram realizadas coletas de amostras a 100%, 10% e 1% de penetração de luz, determinadas a partir do desaparecimento visual do disco de Secchi; estação 2, situada próximo a entrada de dejetos orgânicos provenientes de uma criação de animais domésticos; estação 3, localizada próximo a entrada de esgotos de origem doméstica e pluvial; estação 4, situada em uma região da zona litoral densamente povoadas por macrófitas aquáticas, principalmente pelos gêneros *Nymphaea*, *Eleocharis*, *Salvinia* e *Typha*; e estação 5, situada próximo a barragem construída para o controle do nível da água da lagoa.

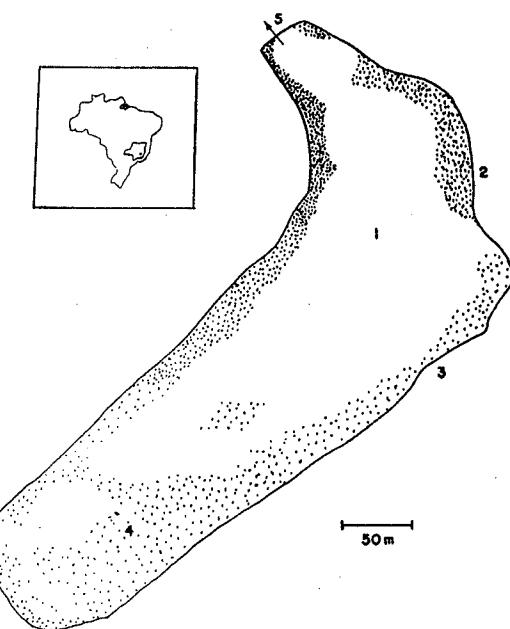


Figura 1 – Mapa da Lagoa Olhos D'Água mostrando a localização das estações de coleta e a distribuição das plantas aquáticas.

Em todas as estações foram feitas contagens de leveduras totais e coliformes totais e fecais. Além disso, na estação 1, nas profundidades amostradas, foram determinados os seguintes parâmetros: temperatura da coluna d'água, medida com um termômetro Toho Dentan (tipo ET-3) com precisão de 1/10; pH, medido em pHmetro B278 (Micronal); condutividade elétrica, medida com um condutivímetro Metrohm modelo E527; alcalinidade total, medida segundo Mackereth & col. (14), com uma microbureta Metrohm E457; oxigênio dissolvido, medido pela técnica de Winckler modificada por Pomeroy & Kirchman (19); fosfatos totais dissolvidos, medido segundo Mackereth & col. (14); e sólidos em suspensão e matéria orgânica dissolvida, medidos por gravimetria, segundo Tundisi (25).

Contagens microbianas – Na estação 1, as amostras foram coletadas com uma garrafa de van Dorn de 6 litros de capacidade, previamente esterilizada com álcool 70%, e transferidas para frascos esterilizados de 200 ml. Nas demais estações, as amostras foram coletadas com frascos esterilizados de 200 ml, diretamente na superfície, e transportadas, em gelo, para o laboratório onde

foram processadas em um intervalo máximo de 8 horas.

A determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e fecais foi feita utilizando-se a técnica de tubos múltiplos (1).

Para o isolamento das leveduras, alíquotas de 0.2 ml de cada amostra foram semeadas, por espalhamento, em quadruplicata, em placas contendo ágar Sabouraud modificado (glicose 2%, peptona 1%, extrato de levedura 0.5%, ágar 2% e cloransfenicol 20 mg%) sendo o pH ajustado para 3.7-4.0 com HCl 1 N. As placas foram incubadas à temperatura de 25°C e a leitura feita do terceiro ao décimo dia de incubação. As colônias foram descritas e os morfotipos diferentes de cada amostra foram mantidos em ágar malte. A identificação foi realizada segundo Kreger van-Rij (13). As análises de correlação foram feitas segundo o coeficiente de correlação de Pearson.

RESULTADOS

Uma análise dos perfis térmicos, obtidos a partir de avaliações na estação 1, evidencia uma tendência a estratificação durante o verão e a uma completa isotermia no inverno (Figura 2). Observou-se, durante os meses de estratificação, uma

queda nos teores de oxigênio dissolvido nas camadas mais profundas do lago, atingindo valores médios de 3.4 mg/L próximo ao sedimento.

Os valores médios para os parâmetros físico-químicos medidos ao longo do ano na estação 1, durante os períodos de isotermia e estratificação térmica, são apresentados na tabela 1.

Os resultados das contagens microbianas são apresentados na tabela 2. As maiores e as menores contagens foram observadas, respectivamente, nas estações 2 e 4. Nas estações 2, 3 e 4, o número de leveduras totais foi maior do que o número de coliformes fecais.

Tabela 1 – Médias dos parâmetros físico-químicos medidos na estação 1 a 100%, 10% e 1% de penetração de luz, nos períodos de isotermia^(a) e estratificação térmica^(b), na Lagoa Olhos D'Água, MG.

Símbolos: (a) – período de isotermia: abril/86 a agosto/86; (b) – período de estratificação térmica: setembro/86 a março/87.

		Estação 1		
	100%	10%	1%	
Temperatura (°C)	22.0 ^(a) 26.5 ^(b)	20.9 26.2	20.9 25.6	
pH	6.6 6.5	6.7 6.6	6.4 6.5	
Conduktividade elétrica (uS/cm)	54.7 49.1	47.2 50.6	62.6 57.7	
Alcalinidade (meq.CO ₂ /L)	0.330 0.464	0.335 0.452	0.314 0.457	
Oxigênio dissolvido (mg/L)	6.5 7.3	6.4 6.5	5.6 3.4	
Fosfatos totais (ug/L)	12.2 14.4	12.2 12.7	15.0 21.5	
Sólidos em suspensão (mg/L)	5.9 9.5	9.3 11.6	13.4 16.5	
Matéria orgânica (mg/L)	3.8 7.9	6.4 9.2	10.9 5.3	

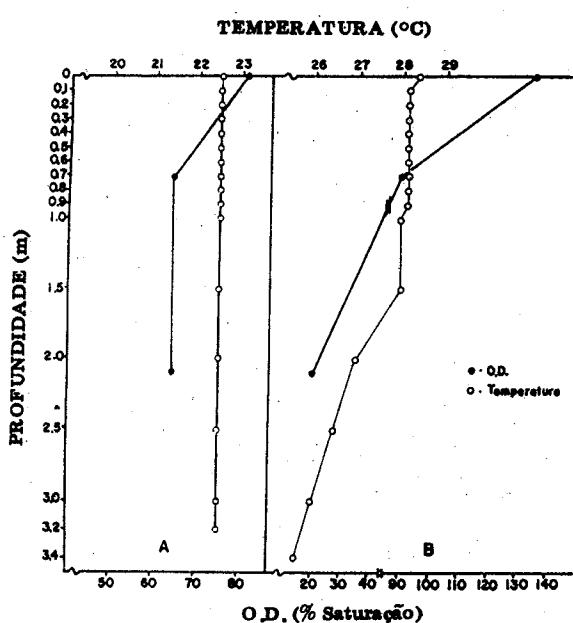


Figura 2 – Estrutura térmica da coluna d'água e dosagem de oxigênio dissolvido na Lagoa Olhos D'Água nos meses de agosto de 1986 (A) e dezembro de 1986 (B).

DISCUSSÃO

Segundo Coutinho & Barbosa (4), a queda nos teores de oxigênio dissolvido no hipolímnio,

Tabela 2 – Médias das contagens microbianas encontradas na Lagoa Olhos D'Água no período de março de 1986 a março de 1987.

Símbolos: CT = coliformes totais (NMP/100 mL); CF = coliformes fecais (NMP/100 mL); LT = leveduras totais (unidade formadora de colônia/100 mL).

	CT	CF
Estação 1 – 100%	4.4×10^3	2.2×10^3
Estação 1 – 10%	3.3×10^3	1.1×10^3
Estação 1 – 1%	5.6×10^3	1.7×10^3
Estação 2	8.6×10^3	3.2×10^3
Estação 3	4.8×10^3	9.7×10^2
Estação 4	4.5×10^2	1.8×10^2
Estação 5	3.0×10^3	1.3×10^3

durante os meses de estratificação térmica, ocorre em função da decomposição aeróbica da matéria orgânica. Nos meses de inverno, o resfriamento atmosférico e os ventos sãos as prováveis causas da homogeneização e consequente oxigenação da coluna d'água.

Na estação 1, na profundidade de 1% de penetração de luz, foram obtidas as correlações mais consistentes entre os teores de oxigênio dissolvido e as contagens microbianas (-0.799, $p < 0.01$ para coliformes totais; -0.762, $p < 0.05$ para coliformes fecais; -0.599, $p < 0.10$ para leveduras totais). Os valores negativos das correlações sugerem um aumento nas populações microbianas com a diminuição dos teores de oxigênio dissolvido. A influência deste parâmetro na distribuição dos grupos microbianos neste ponto de amostragem, poderia ser explicada pela ocorrência de metabolismo fermentativo entre estes microrganismos. A correlação obtida na profundidade de 1%, entre o número de leveduras totais e as concentrações de oxigênio dissolvido, apesar de ter sido marginalmente significativa (-0.599, $p < 0.10$), pode ser interpretada como uma tendência destes microrganismos de responderem às variações de oxigênio dissolvido, em locais onde os níveis deste parâmetro sofrem variações acentuadas.

Hagler & col. (8) observaram que de 34 a 59% das variações nas contagens microbianas, inclusive leveduras totais, poderia ser relacionada com as variações nos níveis de oxigênio dissolvido em águas poluídas de estuário na cidade do Rio

de Janeiro. Woollett & col. (30) observaram correlações positivas entre os teores de oxigênio dissolvido e leveduras do gênero *Cryptococcus* e algumas espécies, como por exemplo, *Candida ogonensis*, em diferentes tipos de ambientes de água doce poluído. Por outro lado, Meyers & col. (16) não obtiveram correlações entre estes parâmetros no Lago Champlain.

Em relação às concentrações de fosfatos dissolvidos, observadas na estação 1, foram obtidas correlações positivas com as contagens microbianas (0.742, $p < 0.05$ para coliformes totais; 0.900, $p < 0.01$ para coliformes fecais; 0.793, $p < 0.05$ para leveduras totais).

Segundo Wetzel (28), o fósforo é o principal elemento limitante da produtividade biológica em ambientes lacustres. Geralmente, nos lagos, o sedimento é o principal reservatório de fósforo e o maior responsável pela reciclagem deste elemento para a coluna d'água. Normalmente, na presença de estratificação térmica e da consequente redução dos teores de oxigênio dissolvido nas camadas mais profundas, existe uma tendência a uma maior liberação de fósforo do sedimento para a coluna d'água, com valores mais altos nas regiões mais profundas.

Os resultantes encontrados, no presente estudo, sugerem que na Lagoa Olhos D'Água, somente na profundidade de 1% de penetração de luz incidente, a quantidade de fosfatos totais dissolvidos, em conjunto com as variações dos teores de oxigênio dissolvido, são fatores importantes na regulação das flutuações das populações microbianas estudadas.

As quantidades de sólidos em suspensão e matéria orgânica dissolvida não mostraram correlações consistentes com as contagens microbianas. Entretanto, a presença de leveduras pode indiretamente indicar o nível de matéria orgânica no ambiente, possibilitando assim, a potencial utilização desses microrganismos como indicadores do nível trófico em águas (7).

Os demais parâmetros físico-químicos estudados na estação 1, não mostraram correlações consistentes, sendo em geral aleatórias e sem um padrão definido.

A estação 2 apresentou as contagens mais altas para coliformes totais e fecais e leveduras totais na maioria dos meses de coleta. Isto ocorreu, provavelmente, em função da entrada de detritos de origem fecal provenientes da criação de animais domésticos próxima a esta estação. Na estação 3, as contagens microbianas, relativamente altas, poderiam estar relacionadas com o maior

aporte de microrganismos devido a entrada de esgotos de origem doméstica e pluvial. Em ambientes similares ao da estação 3, vários autores têm verificado o aumento das contagens de leveduras em ambientes que recebem esgotos (2, 18, 21, 22, 26, 29).

A estação 4 foi a que apresentou as menores contagens microbianas, o que provavelmente se deveu à sua localização, em um região da lagoa completamente ocupada por macrófitas aquáticas flutuantes e/ou submersas, as quais funcionariam como um filtro biológico capaz de afetar a distribuição de microrganismos, por meio de uma ação mecânica, funcionando como uma barreira física a sua dispersão, ou como fontes de substâncias potencialmente tóxicas, liberadas durante sua decomposição. Segundo Klein & Alexander (11), a sobrevivência de um microrganismo em um ambiente no qual ele não seja autóctone é dependente da sua habilidade em tolerar uma série de estresses físicos e biológicos diferentes daqueles de seu ambiente natural. De acordo com estes autores, um fator que pode limitar a sobrevivência de organismos introduzidos em ecossistemas naturais é a presença de compostos tóxicos que podem acarretar a eliminação das espécies suscetíveis. Substâncias dissolvidas, liberadas durante a decomposição de macrófitas, podem conter compostos bacteriostáticos ou bactericidas, os quais podem inibir o crescimento de populações bacterianas naturais (16, 22). Su & col. (21) verificaram que folhas de *Nymphaea* em decomposição produzem vários tipos de metabólitos secundários bacteriostáticos, tais como, alcaloides, taninos e saponinas. Na estação 4, as populações microbianas podem ter sido afetadas pela ação de compostos inibitórios liberados de macrófitas em decomposição, ocasionando assim, a redução nas contagens de coliformes e leveduras. Outra possibilidade, seria aquela referente ao papel das plantas aquáticas como concentradoras de nutrientes (4). Neste caso, as macrófitas funcionariam como agentes de limpeza das águas atuando como filtros biológicos controladores do aporte de nutrientes.

Na estação 5, situada na vazante da lagoa, as contagens microbianas foram geralmente altas, provavelmente devido ao carreamento desses microrganismos pelas correntes de água e ao consequente acúmulo dos mesmos próximo a barragem.

Nas estações 2, 3 e 4, o número de leveduras

totais foi superior as contagens de coliformes fecais, sugerindo a possibilidade das leveduras serem utilizadas como melhores indicadores do estado trófico de ambientes aquáticos. A comprovação de tal hipótese, contudo, dependerá de outros estudos comparativos em diferentes locais.

SUMMARY

Yeasts and coliforms distribution in a palaeo-karstic lake of Lagoa Santa Plateau – MG, Brazil

The distribution of yeasts and coliforms was described for five stations in Lake Olhos D'Água, a palaeo-karstic lake of Lagoa Santa Plateau in the State of Minas Gerais, Brazil, from march 1986 until march 1987. Yeasts were isolated at 25°C on a medium composed by glucose 2%, peptona 1%, yeast extract 0.5%, chloramphenicol 10 mg%, agar 2% medium and pH adjusted to 3.7-4.0 with 1% Cl. Fecal and total coliforms were estimated by the APHA most probable number method. In the limnetic zone, the following physico-chemical parameters were measured: water temperature, pH, electrical conductivity, dissolved oxygen, total dissolved phosphate, suspended solids and dissolved organic matter. At the 1% level of light penetration, significant correlations between the microbial counts, dissolved oxygen levels and total dissolved phosphate were recorded. This suggested that such parameters can be important in regulation of the microbial populations at this depth. In a depth corresponding to 100% and 10% of light penetration no defined patterns were observed. Also, yeast densities were higher than those of fecal coliform in three of the five stations. Yeast counts may be a better indicator than fecal coliforms of trophic conditions in aquatic environments.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos Drs. Geraldo Eustáquio Torres e Allen N. Hagler, respectivamente, pelas sugestões e revisão do texto final. À FINEP, CNPq, FAPEMIG e CPq – UFMG pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. American Public Health Association (APIA). Standard Methods for the examination of water and wastewater. 14 ed. Washington, 1975.
2. Apolinário, M.E.S. – Levantamento de leveduras e leveduróides de corpos d'água da Região da Grande São Paulo. Rio Claro, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 1984. 189 p. (Tese-Mestrado)
3. Barbosa, F.A.R.; Coutinho, M.E.; Araújo, L.M.; Menendez, R.; Barbosa, P.M.; Figueira, J.E.C. & Esteves, F.A. – Estudos limnológicos na região cárstica central de Minas Gerais. I. Caracterização preliminar da Lagoa Santa. Seminário Regional de Ecologia, 4. Anais... São Paulo, UFSCar, p. 395-435, 1984.
4. Coutinho, M.E. & Barbosa, F.A.R. – Distribuição vertical de matéria orgânica, nitrogênio orgânico total, fósforo total e algumas formas iônicas nos sedimentos recentes de 3 lagos de Minas Gerais. Acta Limnol., 1:401-429, 1986.
5. Esteves, F.A. & Barbosa, F.A.R. – Eutrofização artificial: a doença dos lagos. Ciência Hoje, 27 (5): 56-61, 1986.
6. Fugioka, R.S.; Hashimoto, H.H.; Siwak, E.B. & Young, R.I.E. – Effect of sunlight on survival of indicator bacteria in seawater. Appl. Environ. Microbiol., 41:690-696, 1981.
7. Hagler, A.N. & Ahearn, D.G. – Ecology of aquatic yeasts. In: The Yeasts. A.H. Rose & J.S. Harrison. 2 ed., London, Academic Press, p. 181-205, 1987.
8. Hagler, A.N.; Mendonça-Hagler, L.C.; Santos, E.A.; Farage, S.; Silva Filho, J.B.; Schranck, A. & Oliveira, R.B. – Microbial pollution indicators in Brazilian Tropical and Subtropical Marine Surface Waters. Sci. Total Environ., 58:151-160, 1986.
9. Hedrick, L.R.; Cook, W. & Woollett, L. – Yeasts and molds in Lake Superior water and some of its tributaries. Proc. 11th Conf. Great Lakes Res.:538-543, 1968.
10. Hedrick, L.R.; Soyugenc, M.; DuPont, P. & Ambrosini, R. – Yeasts in Lake Michigan and Lake Erie. Proc. 7th Conf. Great Lakes Res.:77-83, 1964.
11. Kapuscinski, R.B. & Mitchell, R. – Solar radiation induce sublethal injury in *Escherichia coli* in seawater. Appl. Environ. Microbiol., 41:670-674, 1981.
12. Klein, T.M. & Alexander, M. – Bacterial inhibitors in lake water. Appl. Environ. Microbiol., 52(1):114-118, 1986.
13. Kreger-van Rij, N.J.W. – The Yeasts: a taxonomic study. Third and enlarged edition. Amsterdam, Elsevier Science Pub., 1984.
14. Mackereith, F.J.H.; Heron, J. & Talling, J.F. – Water analysis: some revised methods for limnologists. Freshwater Biological Association Publication n. 36. Titus Wilson & Son Ltd. Kendal, 1978.
15. McCambridge, J. & McMeekin, J.A. – Effect of solar radiation and predaceous microorganisms on survival of fecal and other bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 41:1083-1087, 1981.
16. Meyers, S.P.; Ahearn, D.G. & Cook, W.L. – Mycological studies of Lake Champlain. Mycologia, 62:504-515, 1970.
17. Murray, R.E. & Hodson, R.E. – Influence of macrophyte decomposition on growth rate and community structure of Okefenokee Swamp bacterioplankton. Appl. Environ. Microbiol., 51(2):293-301, 1986.
18. Paula, C.R.; Purchio, A. & Gambale, W. – Yeast from beaches in the Southern area of São Paulo State "Baixada Santista", Brazil. Rev. Microbiol., 14(2):136-143, 1983.
19. Pomeroy, R. & Kirschman, H.D. – Determination of dissolved oxygen: proposed modification of the Winkler method. Industr. Engng. Chem. (Anal.), 17(11):715-716, 1945.
20. Quinn, J.P. – Seasonal occurrence of yeasts and other fungi in a freshwater lake. Trans. Br. Mycol. Soc., 83(1):53-58, 1984.
21. Simard, R.R. & Blackwood, A.C. – Yeasts from the St. Lawrence River. Can. J. Microbiol., 17:197-203, 1971.
22. Spencer, J.F.T.; Gorin, P.A.J. & Gardner, N.R. – Yeasts isolated from some lakes and rivers of Saskatchewan. Can. J. Microbiol., 20:949-954, 1974.
23. Su, K.L. Abul-Hajj, Y. & Stabba, E. J. – Antimicrobial effects of aquatic plants from Minnesota. Lloydia, 36:80-87, 1973.
24. Su, K.L.; Stabba, E.J. & Abul-Hajj, Y. – Preliminary chemical studies of aquatic plants from Minnesota. Lloydia, 36:72-79, 1973.
25. Tundisi, J. – Produção primária, "standing-stock", fracionamento do fitoplâncton e fatores ecológicos em ecossistema lacustre artificial (Represa do Broa, São Carlos). USP-Ribeirão Preto, S.P. (Tese-Livre Docência), 1976.
26. Uden, N. vann & Ahearn, D.G. – Occurrence and population densities of yeast species in a fresh water lake. Antonie van Leeuwenhoek, 29:308-312, 1963.
27. Valentini, S.R.; Leite, C.Q.S.; Giannini, M.J.S.M. & Falcão, D.P. – Indicadores de contaminação fecal e enteropatogênicos em águas de recreação. Rev. Microbiol., 18(4):318-323, 1987.
28. Wetzel, R.G. – Limnology. 2 ed., New York, Saunders College Publishing, 1983.
29. Woollett, L.L. & Hedrick, L.R. – Ecology of yeasts in polluted water. Antonie van Leeuwenhoek, 36:427-435, 1970.
30. Woollett, L.L.; Hedrick, L.R. & Tarver, M. – A statistical evaluation of the ecology of yeasts in polluted water. Antonie van Leeuwenhoek, 36:437, 1970.

Recebido para publicação em 12/8/89.

EFEITOS DA ACRIFLAVINA EM DIFERENTES ESPÉCIES DE STREPTOMYCES PRODUTORES DE ACTINOMICINA.

Janete Magali de Araújo¹
João Lúcio de Azevedo²

RESUMO

O tratamento de três diferentes espécies de *Streptomyces* com acriflavina, resultou na perda da produção de actinomicina em 5-12% das colônias isoladas nestas linhagens. *S. felleus* e *S. regensis* mostraram mais instabilidade do que *S. parvulus*. A produção de pigmento amarelo característica destas linhagens produtoras de actinomicina foi totalmente eliminada. A instabilidade genética destas linhagens pode ser atribuída a elementos extracromossômicos.

INTRODUÇÃO

A instabilidade genética de características fenotípicas é comum em *Streptomyces* e, em geral, corantes intercalantes são usados para mostrar o envolvimento de plasmídios na biossíntese de metabólitos secundários. Espontaneamente ou após tratamento com acridinas, brometo de etídio, novobiocina ou temperatura, estreptomicetos freqüentemente perdem a capacidade de produzir antibióticos tais como kasugamicina (20), metilenuomicina (15), actinomicina (18), estreptomicina (24), kanamicina (12), entre outros. O mecanismo envolvido na regulação da produção de antibióticos pode ser atribuído à ocorrência de plasmídios (9, 15, 18, 12), à presença de um fator de regulação como observado na produção de estreptomicina por *S. griseus* (10, 11) ou, ainda, como foi sugerido para tilosina (5, 3, 25, 13) e carriomicina (19), ao aparecimento de seqüências repetidas de DNA. Em *S. coelicolor* A3(2) a instabilidade da arginina

também está associada a rearranjo cromossomal (6).

Outras características fenotípicas como fertilidade (27), formação de micélio aéreo e resistência a antibiótico (16, 2) nessas bactérias filamentosas também são atribuídas à presença de elementos extracromossômicos. Segundo Hunter & Eckhardt (13), somente para a produção de metilenomicina existe comprovação de que no plasmídeo SCP₁ de *S. coelicolor* (27) ocorrem genes responsáveis pela biossíntese de metilenomicina (15), enquanto que para o antibiótico tilosina (23) produzido por *S. fradiae* foi observado (3, 5, 25, 13) que unidades amplificadas de DNA são autotransmissíveis, contudo não foi detectado plasmídeo autônomo, nem mobilização de genes cromossomais. Para carriomicina, investigações realizadas por Ogura (19), mostram que o padrão de digestão do DNA total da mutante EB-32 e da linhagem selvagem de *S. hygroscopicus* apresenta seqüências amplificadas que podem estar relacio-

1 Depto. de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, 50739 Recife PE, Brasil
2 Instituto de Genética, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 13400 Piracicaba SP, Brasil

nadas com a produção desse antibiótico. Hünter enfatiza que a produção de antibióticos como kasugamicina (7) e espiramicina, entre outros, pode estar relacionada com a presença de plasmídios, entretanto estas observações são ainda inconclusivas. De qualquer maneira, o uso de agentes intercalantes tem se mostrado eficaz na eliminação de plasmídios em *Streptomyces*, como comprovado por Cramer et al (4). Estes autores comprovaram a eficiência do brometo de etídio na eliminação dos plasmídios pjj 161 e pjj 702 de *S. lividans* (26) e concluíram que brometo de etídio e provavelmente outros agentes são capazes de induzir "cura" de plasmídios.

No presente trabalho, diferentes espécies de *Streptomyces* produtores de actinomicina foram tratadas com acriflavina em uma tentativa de verificar uma associação da produção deste antibiótico e presença de plasmídios.

MATERIAL E MÉTODOS

Culturas – Foram utilizadas as linhagens de *Streptomyces regensis* IA-M3053, *S. felleus* IA-M3079 e *S. parvulus* IA-M3042 isoladas de amostras de solo, classificadas e caracterizadas quanto à produção de actinomicina no Instituto de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Todas as linhagens foram mantidas em meio ME (extrato de levedura 0,4%; extrato de malte 0,8%; glicose 0,4%; ágar 1,5%; pH 6,8-7,0).

Microrganismo-teste – *Bacillus subtilis* IZ utilizado nos ensaios antimicrobianos foi mantido em nutriente ágar (Disco).

Tratamento com acriflavina – Para determinação dos níveis de crescimento e concentração de acriflavina foi empregada a metodologia preconizada por Ogura et al (19) em cultivos das linhagens em meio Tryptic Soy Broth (Disco) com agitação por 3-4 dias, 28-30°C.

Ensaio antimicrobiano – Cada colônia obtida após o tratamento com acriflavina foi cultivada por sete dias em placas com meio de esporulação (ME) e o ensaio realizado pelo método do bloco de ágar (14) modificado. Discos de cada colônia foram retirados utilizando um furador de rolha de 5 mm de diâmetro. Cada disco foi transferido para placa de ágar nutritivo na qual foi espalhada uma

suspensão de *B. subtilis* IZ. As placas foram incubadas a 37°C e os halos (em mm) medidos após 24 horas.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Visando determinar como a acriflavina afeta a produção do antibiótico nas diferentes espécies de *Streptomyces* em estudo, várias concentrações desse corante foram ensaiadas.

Em *S. parvulus* IA-M3042 e *S. regensis* IA-M3053, a adição de 5,0 mg/ml de acriflavina em meio TSB promoveu inibição de cerca de 95% do crescimento, enquanto que para *S. felleus* IA-M3079, foram necessários 37,5 mg/ml para atingir os mesmos níveis de inibição. Este tratamento resultou em progêneres que não apresentavam pigmento amarelo-laranja característico das linhagens selvagens produtoras de actinomicina e, consequentemente, não exibiam halo de inibição para *B. subtilis* IZ. Na Tabela 1 observa-se que entre as espécies ensaiadas, *S. felleus* foi a mais instável, apresentando perda espontânea de 3,37% e, após o tratamento, 11,73% das progêneres não produziam actinomicina (act⁻) (Fig. 1). Em *S. regensis* e *S. parvulus*, 5,26% e 6,41%, respectivamente, das variantes eram act⁻. Em estudo similar, Ochi e

Tabela 1 – Freqüência de ocorrência de progêneres não produtoras de actinomicina nas diferentes espécies de *Streptomyces*, após tratamento com acriflavina

Linhagens	Freqüência de progêneres não produtoras de actinomicina	
	Perda espontânea	Tratamento com acriflavina
<i>Str. felleus</i> IA-M3079	3,37%	11,73%
<i>Str. parvulus</i> IA-M3042	5/148*	23/196
<i>Str. regensis</i> IA-M3053	0,0	6,41%
	0,0/52	6/92
	1,86%	5,26%
	2/107	10/190

* Número de colônias não produtoras/número de colônias ensaiadas.

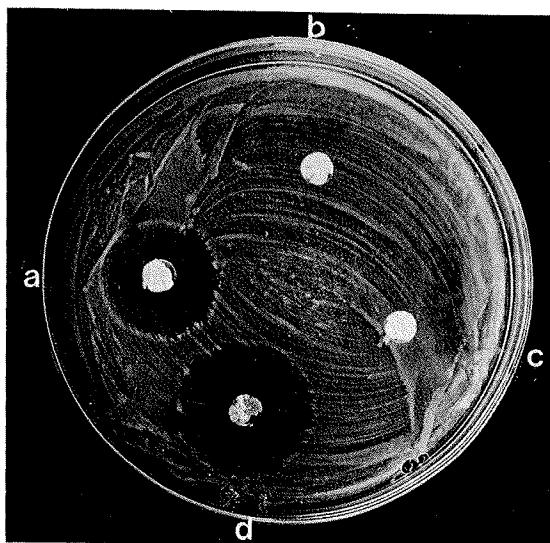


Figura 1 – Halo de inibição para *B. subtilis* IZ da linhagem selvagem de *Sta. felleus* e de suas variantes

- a) *Streptomyces felleus* IA-M3079
- b) AF-3079(90/57)
- c) AF-3079(80/50)
- d) AF-3079(194)

Katz (18), trabalhando com *S. parvulus* ATCC 12434, encontraram que 5,1% das colônias obtidas após o tratamento com acriflavina eram act⁺. Com a linhagem de *S. antibioticus* 3720, os mesmos autores observaram que 20,8% das progênies isoladas não produziam actinomicina. Vale ressaltar que aqueles autores, além do tratamento com acriflavina, submeteram a massa micelial obtida do tratamento com acriflavina a formação e regeneração de protoplastos. Esta técnica tem mostrado promover eliminação de elementos extracromossômicos (1,8) e ocasionar alterações fenotípicas como aumento de resistência a antibiótico (28), aumento de produtividade (17) e deficiências nutricionais (7).

A análise morfológica das progênies obtidas após o tratamento com acriflavina mostra que as variantes act⁺ de *S. felleus* IA-M3079 apresentam um único tipo morfológico – micélio aéreo branco sem formação de pigmento – enquanto que as variantes act⁻ de *S. regensis* mostram formação de micélio aéreo com diferentes nuances de cores, o que não foi observado em *S. parvulus*, cujas variantes não formavam micélio aéreo, nem pigmento (Tabela 2.). Foi observado que as variantes não produtoras de actinomicina eram 100% estáveis para este caráter. Contudo, os dados contidos na Tabela 3 mostram que 8,67% das variantes de *S. felleus* produtoras de actinomicina exibem elevada instabilidade na formação de micélio aéreo e de pigmento amarelo intenso, se estendendo esta

Tabela 2 – Características culturais das linhagens selvagens e das variantes não produtoras de actinomicina

Linhagens	Frequência	Micélio aéreo*		Pigmento	
		Formação	Cor	Formação	Cor
<i>Stm. parvulus</i> (selvagem)		Presente	Cinza	Presente	Amarelo claro
Variantes	6,41%	Ausente		Ausente	
<i>Stm. felleus</i> (selvagem)		Presente	Cinza amarelado	Presente	Amarelo claro
Variantes	11,73%	Presente	Branco	Ausente	Incolor
<i>Stm. regensis</i> (selvagem)		Presente	Cinza escuro	Presente	Amarelo limão
Variantes	5,26%				
134(8)a		Presente	Cinza escuro	Presente	Marrom claro
105(4)		Presente	Amarcelo claro	Ausente	Incolor
53(5)		Presente	Cinza claro	Presente	Marrom claro
141(2)		Presente	Branco	Presente	Marrom claro

* Características culturais observadas em meio de esporulação (ME), V. Material e Método.

TABELA 3 – Efeito da acriflavina sobre a formação de micélio aéreo, pigmento e produção de actinomicina em *Sta. felleus* IA-M3079 e *Sta. regensis* IA-M3053

Linhagens	Micélio aéreo		Pigmentação			Actinomicina			
	Presente	Ausente	Presente	Variável	Ausente	Act ⁻	Act ^v	Act ⁺	Act ⁺⁺
<i>Sta. felleus</i>	91,32%	8,67%	79,59%	8,67%	11,73%	11,73%	8,67%	78,57%	1,02%
IA-M3079	179/196*	17/196	156/196	17/196	23/196	23/196	17/196	154/196	2/196
<i>Sta. regensis</i>	91,0%	8,94%	94,7%	—	5,26%	5,26%	—	91,0%	3,68%
IA-M3053	173/190	17/190	180/190	—	10/190	10/190	—	173/190	7/190

Act⁻ = ausência de halo de inibição; Act⁺ = halo de inibição igual à selvagem (26,68 mm); Act⁺⁺ = halo de inibição maior que a selvagem (29,92 mm); Act^v = halo de inibição variável

* Número de colônias variantes/número de colônias ensaiadas.

variação ao halo de inibição, desde ausência, até halos em torno de 29 mm para *B. subtilis* em todas as variantes ensaiadas. Apesar desta instabilidade, a acriflavina promoveu o aparecimento de variantes (1,02%) com formação de micélio aéreo amarelado e pigmento amarelo-laranja intenso, estável. Em *S. regensis* foram observadas também (Tabela 3) variantes (3,68%) com forte formação de pigmento, demonstrando uma maior produção de actinomicina; no entanto, não foi detectada

qualquer variação na produção do pigmento. Este efeito não foi detectado em *S. parvulus*.

Uma comparação da estabilidade da linhagem selvagem de *S. felleus* com sua variante AF-3079(183) quanto à produção de actinomicina está apresentada na Tabela 4. Observa-se que 98% dos clones da variante AF-3079(183) produzem halo de inibição em torno de 29 mm, enquanto que na linhagem selvagem apenas 23,63% das colônias exibem inibição similar.

O melhoramento de *Streptomyces* por tratamento com acriflavina foi relatado por Ramos et al (21) para *S. rimosus* QB53, cuja produção de oxitetraciclina aumentou cerca de 3 vezes. Estes autores também observaram mudanças na produção do pigmento e do micélio aéreo.

A ação do agente intercalante sobre a produção de antibiótico em *Streptomyces* ainda é especulativa e, segundo Ramos et al (21), a natureza dos genes afetados pela acriflavina permanece incerta.

A elevada perda na produção de actinomicina e a instabilidade morfológica em *S. felleus* e *S. regensis* após o tratamento com acriflavina sugerem o envolvimento de elementos extracromossômicos ou, possivelmente, rearranjo genômico causado por amplificação de segmentos de DNA, como observado em *S. reticuli* (22), cuja perda de plasmídio ocasiona grandes alterações cromossômicas.

Ensaios preliminares em gel agarose (dados não mostrados) de CCCDNA destas linhagens

Tabela 4 – Teste de estabilidade para produção de actinomicina da linhagem selvagem de *Sta. felleus* IA-M3079 e da variante AF-3079(183)

Linhagem	Porcentagem de colônias estáveis*	Halo de inibição (em mm) ± 5
<i>Sta. felleus</i> IA-M3079	23,63%	29,92 ± 0,6
	73,73%	26,68 ± 1,20
	3,64%	0,0
AF-3079(183)	98,0%	28,88 ± 1,03
	2,0%	0,0

* 50 colônias ensaiadas (para *B. subtilis* IZ).

mostram bandas eletroforéticas características do DNA plasmidial apenas em *S. selleus* e *S. regensis*. Em vista destes resultados, uma análise genética mais detalhada está sendo realizada, visando determinar peso molecular, mapa de restrição e se estes plasmídios são conjugativos.

SUMMARY

Effects of acriflavine on three actinomycin producer species of *Streptomyces*

Treatment of three actinomycin producing species of *Streptomyces* with acriflavine resulted in loss of antibiotic production in 5-12% of the colonies tested. *Streptomyces selleus* and *Streptomyces regensis* were more unstable when compared to *Streptomyces parvulus*. Yellow pigment production which is a general characteristic of actinomycin producer strains was totally abolished. The loss of pigmentation and antibiotic production may be related to extrachromosomal elements.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguilar, A. & Hopwood, D.A. - Determination of methylenomycin A synthesis by the pSV1 plasmid from *Streptomyces violaceus-ruber* SANK-95570. *J. Gen. Microbiol.*, 128:1893-1902, 1982.
2. Akagawa, H.; Okanishi, M. & Umezawa, H. - A plasmid involved in chloramphenicol production in *Streptomyces venezuelae*: evidence from genetic mapping. *J. Gen. Microbiol.*, 90:336-346, 1975.
3. Baltz, R.H. - Mutation in *Streptomyces*. In "Antibiotic-producing *Streptomyces*". Eds. S.W. Queener and Day. Academic Press. 1986.
4. Crameri, R.; Davies, J.E. & Hünter, R. - Plasmid curing and generation of mutations induced with ethidium bromide in *Streptomycetes*. *J. Gen. Microbiol.*, 132:819-824, 1986.
5. Fishman, S.E.; Rosteck, Pr., Jr. & Hershberger, C.L. - A 2.2-kilobase repeated DNA segment is associated with DNA amplification in *Streptomyces fradiae*. *J. Bacteriol.*, 161:199-206, 1985.
6. Flett, F.; Platt, J. & Cullum, J. - DNA rearrangements associated with instability of an arginine gene in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Basic Microbiology*, 27:3-10, 1987.
7. Furumai, T.; Takeda, K. & Okanishi, M. - Function of plasmids in the production of aureothrinic. I. Elimination of plasmids and alteration of phenotypes caused by protoplast regeneration in *Streptomyces kasugaensis*. *J. Antibiotics* 35:1367-1373, 1982.
8. Hopwood, D.A. - Genetic studies with bacterial protoplasts. *Ann. Rev. Microbiol.* 35:237-272, 1981.
9. Hopwood, D.A.; Kieser, T.; Lydiate, D; Bibb, M.J. - *Streptomyces* plasmid: their biology and use as cloning vectors. In: Queener, S.W. & Day, L.E. eds. *Antibiotic producing Streptomyces*. London. Academic Press. p. 159-230. 1986.
10. Horinouchi, S.; Hara, O. & Beppu, T. - Cloning of a phiootropic gene that positively controls biosynthesis of A-factor, actinorhodin, and prodigiosin in *Streptomyces coelicolor* A 3(2) and *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* 155:1238-1248, 1983.
11. Horinouchi, S.; Kumada, Y. & Beppu, T. - Unstable genetic determinant of A-factor biosynthesis in streptomycin-producing organisms: cloning and characterization. *J. Bacteriol.* 158:481-487, 1984.
12. Hotta, K.; Okami, Y. & Umezawa, H. - Elimination of the ability of a kanamycin-producing strain to biosynthesize deoxystreptamine moiety by acriflavine. *J. Antibiotics* 30:1146-1149, 1977.
13. Hünter, R. & Eckardt, T. - Genetic manipulation. In "Actinomycetes in Biotechnology". Academic Press. London. pp. 99-183, 1988.
14. Ichikawa, T.; Ishikura, T. & Ozaki, A. - Improvement of kasugamycin-producing strain by the agar piece method and the prototroph method. *Folia Microbiol.* 16:218-224, 1971.
15. Kirby, R. & Hopwood, D.A. - Genetic Determination of methylenomycin synthesis by the SCP plasmid of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Gen. Microbiol.* 98:239-252, 1977.
16. Kirby, R.; Wright, L.F. & Hopwood, D.A. - Plasmid determined antibiotic synthesis and resistance in *Streptomyces coelicolor*. *Nature* 254:265-267, 1975.
17. Malina, H.; Tempete, C. & Robert-Gero, M. - Enhanced sinesfungin production by medium improvement, mutagenesis and protoplast regeneration of *Streptomyces incarnatus* NRRL-8089. *J. Antibiotics* 38:1204-1210, 1985.
18. Ochi, K. & Katz, E. - The possible involvement of a plasmid(s) in actinomycin synthesis by *Streptomyces parvulus* and *Streptomyces antibioticus*. *J. Antibiotics* 29:1143-1148, 1976.
19. Ogura, M.; Tanaka, T.; Furihata, K.; Shimazu, A. & Otake, N. - Induction of antibiotic production with ethidium bromide in *Streptomyces hygroscopicus*. *J. Antibiotics* 39:1443-1449, 1986.
20. Okanishi, M.; Ohta, T. & Umezawa, H. - Possible control of formation of aerial mycelium and antibiotic in *Streptomyces* by episomic factors. *J. Antibiotics* 23:45-47, 1970.
21. Ramos, A.; Valin, C.; Joseph, N.; Visozo, A.; Perez, D.; Alonso, E.; Villanueva, S. & Rodrigues, R. - Enhancement of tetracycline production in a *Streptomyces rimosus* strain after treatment with acriflavine. *Biotech. Lett.* 8(3):161-162, 1986.
22. Schrempf, H. - Plasmid loss and changes within the chromosomal DNA of *Streptomyces reticuli*. *J. Bacteriol.* 151:701-707, 1982.
23. Seno, E.T. & Hudchinson, C.R. - The biosynthesis of tylosin and erythromycin: Model system for studies of the genetics and biochemistry of antibiotic formation. In "Antibiotic-producing *Streptomyces*". Eds. S.W. Queener and L.E. Day) Academic Press. 1986.
24. Shaw, P.D. & Piwowarski, J. - Effect of ethidium

- bromide and acriflavine on streptomycin production by *Streptomyces bikiniensis*. *J. Antibiotics* 30:404-408, 1977.
25. Stonesifer, J.; Matsushima, P. & Baltz, R.H. - High frequency conjugal transfer of tylisin genes and amplifiable DNA in *Streptomyces fradiae*. *Mol. Gen. Genet.* 202:348-355, 1986.
26. Thompson, C.; Kieser, T.J.; Ward, J.M. & Hopwood, D.A. - Physical analysis of antibiotic resistance genes from *Streptomyces* and their use in vector construction. *Gene*. 2051-62, 1982.
27. Vivian, A. - Genetic control of fertility in *Streptomyces* *coelicolor* A3(2): Plasmid involvement in the interconversion of IF and JF strains. *J. Gen. Microbiol.* 69:353-364, 1971.
28. Yamashita, F.; Hotta, K.; Okami, Y. & Umezawa, H. - The generation of additional antibiotic resistance by protoplast regeneration of a *Streptomyces griseus* strain. *J. Antibiotics* 38:126-127, 1985.

Recebido para publicação em 15/6/89.

INCIDÊNCIA DE *VIBRIO CHOLERAЕ* NÃO 01 EM AFLUENTES DE ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ESGOTOS DA CIDADE DO RIO DE JANEIRO, RJ

Ernesto Hofer¹
Djair Hernandez¹

RESUMO

No período de junho de 1976 a dezembro de 1977 avaliou-se a incidência de *Vibrio cholerae* não 01 em 60 espécimes de afluentes de duas estações de tratamento de esgotos da cidade do Rio de Janeiro, RJ. Das 644 amostras isoladas, pertencentes ao gênero *Vibrio*, foram selecionadas 290 do grupo I de Heiberg, nas quais, realizaram-se estudos sobre o comportamento dos meios empregados no isolamento, nas características bioquímicas e antigênicas, assim como, na distribuição sazonal. Os resultados mais satisfatórios no processo de cultivo, derivaram do enriquecimento do material em água peptonada alcalina (pH-8.5). A identificação sorológica realizada pelo sistema de Sakazaki e col. reconheceu 28 sorotipos/sorovares que apresentaram certa similaridade nas áreas, principalmente pela predominância dos sorotipos 046 (53), 051 e das amostras não tipáveis, sorologicamente (NT). A caracterização de 15 biotipos, verificada através das susceptibilidade à polimixina B (50 U) e novobiocina (10ug/ml), hemólise e teste de VP, evidenciaram nas áreas a prevalência dos tipos 1, 13, 5, 9. Não foi possível estabelecer uma nítida associação entre biotipos e sorotipos. A sazonalidade foi muito acentuada nas duas áreas, principalmente tomado por base os vibrios do grupo I de Heiberg. Os resultados demonstraram que os afluentes das estações funcionaram como nichos ecológicos naturais de *V. cholerae* não 01.

INTRODUÇÃO

No conceito taxonômico atual, a espécie *Vibrio cholerae* engloba uma série de sorotipos (sorovars), diferenciados através de fatores antigênicos somáticos. Assim, o agente da cólera, pertence ao sorotipo (sorovar) 01 e os demais, outrora rotulados como "vibrios não coléricos" (VCN) ou "não aglutináveis" (NAG), enquadraram-se atualmente, com *V. cholerae* não 01 (9, 20).

Nos dois últimos decênios, avolumaram-se acentuadamente as referências sobre esses mi-

croorganismos em diferentes condições ambientais, ressaltando-se nos ecossistemas aquáticos, tanto dulcícola como marinho (3, 4, 12-16, 18, 24). Paradoxalmente, raras foram as análises que procuraram retratar a ocorrência de *V. cholerae* 01 ou não 01 em afluentes ou esfuentes de estações de tratamento de esgotos (5, 10, 17, 19).

Em nosso meio os estudos disponíveis sobre membros do gênero *Vibrio*, ainda são extremamente incipientes, razão pela qual, objetivou-se a apresentação desse trabalho. Assim, através de um estudo longitudinal foram efetuadas análises

1 Depto. de Bacteriologia, Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Av. Brasil, 4365 - Manguinhos, 21040 Rio de Janeiro RJ, Brasil

bacteriológicas em pontos de duas estações de tratamento de esgoto da cidade do Rio de Janeiro, RJ., visando precípuamente, observar a freqüência e distribuição de *V. cholerae* não 01.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem – Foram analisados no período de junho de 1976 a dezembro de 1977, trinta espécimes de afluentes de cada uma das estações de tratamento de esgotos da Ilha do Governador e da Penha, localizadas na Zona Norte do município do Rio de Janeiro, RJ.

As amostras foram coletadas em volumes de 100 ml, acondicionadas em frascos esterilizados e encaminhadas ao laboratório dentro de um prazo máximo de 45 minutos.

Isolamento e identificação – Como primeira etapa, os afluentes foram centrifugados a 3.000 rpm por 20 minutos, desprezando-se, parcialmente o sobrenadante, de forma a reter 5 ml do líquido original, utilizado como veículo para ressuspensão do depósito centrifugado. Da suspensão, alíquotas de 1 ml foram semeadas nos seguintes meios de enriquecimento, distribuídos em tubos com volumes de 20 ml:

- Água peptonada alcalina, com 1g% de NaCl, pH-8.5;
- Fórmula 1, acrescida de 160mg% de amarelo de metacromo (E. Gurr, England);
- Fórmula 1 mais 200mg% de eosina amarela (Difco).

Após incubação de 37°C por 18 horas, uma alça de 3 mm de diâmetro de cada um dos crescimentos foi transferida para agar TCBS (Difco). Este meio também foi semeado com 0,1 ml da suspensão, na fase de plantio primário. Em sequência a incubação a 37°C durante 24 horas, cinco colônias sacarose positivas preferentemente, foram transferidas do agar TCBS para meio de triagem (Agar Kligler-Difco), incubado por 24 horas a 37°C.

Para a caracterização bioquímica foram adotadas as recomendações apresentadas por Hofer (6).

Biotipificação – Na classificação em biotipos, foram utilizados os testes de susceptibilidade das amostras à polimixina B e novobiocina; atividade hemolítica e o teste de VP a 37°C (7).

A ação dos antibióticos foi observada em agar Mueller-Hinton, empregando-se discos de 50 U de polimixina B (Difco) e incorporando-se 10 ug/ml de novobiocina sódica (Upjohn) ao meio. No caso da polimixina, após a deposição dos discos, as placas foram mantidas em refrigerador (5°C) por 2 horas e, posteriormente, incubadas a 37°C por 18 horas. Idêntico procedimento foi adotado para aquelas com novobiocina. A leitura se baseou na presença ou ausência de halo (polimixina) e do crescimento (novobiocina).

Atividade hemolítica – Recorreu-se ao processo em tubos segundo Barua & Gomes (2), utilizando caldo infuso de coração - Difco com 1% de glicerol e 1% de suspensão de hemácias de carneiro.

Sorologia – Todas as amostras de *Vibrio* pertencentes ao Grupo I de Heiberg e capazes de crescer em meio isento de NaCl (Agar nutriente - Difco), foram analisadas através de soro-aglutinação rápida com os antissoros somáticos 01 e R de *V.cholerae*. A caracterização dos vibrios não 01 foi efetuada pelo esquema sorológico de Sakazaki & col. (21, 22) e Shimada & Sakazaki (23), no National Institute of Health, Tokyo, Japan.

Tabela 1 – Distribuição de *Vibrio* segundo a classificação dos tipos fermentativos de Heiberg, isolados de afluentes das estações de tratamento de esgotos da Ilha do Governador e Penha, RJ.

Testes bioquímicos	Ilha do Governador		Penha		Nº	%
	1976	1977	1976	1977		
I (M+;S+;A-)*	37	90	46	117	290	45,03
II (M-;S+;A-)	54	82	48	121	305	47,35
III (M+;S+;A+)	13	5	6	17	41	6,36
IV (M-;S+;A+)	1	2	4	1	8	1,24
Total	105	179	104	256	644	99,98

* Manose (M); Sacarose (S); Arabinose (A)

+: formação de ácidos em 24h

-: ausência de ácidos em 24h

Tabela 2 – Distribuição e freqüência dos sorotipos de *Vibrio cholerae* não 01 segundo a origem (Ilha do Governador e Penha) e ano de isolamento (1976 e 1977).

Sorotipos	Ilha do Governador		Penha		Total	
	1976	1977	1976	1977	Nº	%
46 53	11	20	3	42	76	26,20
N.T.*	4	26	11	22	63	21,72
51	5	10	8	15	38	13,10
37	—	7	—	7	14	4,82
R	1	8	1	3	13	4,48
64	1	4	4	3	12	4,13
31	—	—	5	4	9	3,10
34	6	1	2	—	9	3,10
6	—	—	6	1	7	2,41
19	—	2	—	5	7	2,41
14	1	—	1	4	6	2,06
65	2	—	2	—	4	1,37
78	3	1	—	—	4	1,37
36	—	2	1	—	3	1,03
40	1	1	—	1	3	1,03
50	1	1	—	1	3	1,03
7	—	1	—	1	2	0,68
9	—	2	—	—	2	0,68
20	—	—	1	1	2	0,68
38	—	—	—	2	2	0,68
45	—	2	—	—	2	0,68
2	—	1	—	—	1	0,34
5	1	—	—	—	1	0,34
13	—	—	—	1	1	0,34
17	—	—	—	1	1	0,34
32	—	—	—	1	1	0,34
43	—	—	—	1	1	0,34
56	—	1	—	—	1	0,34
61	—	—	1	—	1	0,34
68	—	—	—	1	1	0,34
Total	37(12,75)	90 (31,03)	46(15,86)	117(40,34)	290	99,98

*NT – Não Tipável

() – Percentagem

RESULTADOS

A análise dos 60 espécimes resultou no isolamento e identificação de 644 amostras pertencentes ao gênero *Vibrio*, cuja distribuição segundo a classificação de Heiberg consta na Tabela 1.

Como a prioridade da investigação se concentrou nas culturas do grupo I de Heiberg, assi-

nala-se que nas 290 amostras capazes de crescer em meio isento de NaCl, não foi detectado, soro-logicamente, *V. cholerae* 01.

A variação sazonal referente aos isolamentos de *Vibrio cholerae* não 01 do grupo I de Heiberg, apresentada na figura 1, demonstrou uma acentuada coincidência na distribuição da freqüência do microorganismo nas duas áreas.

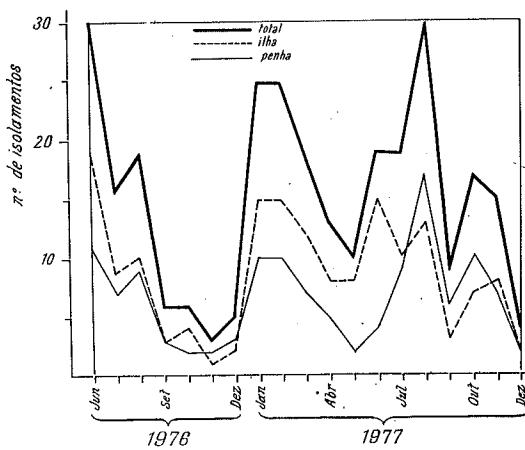


Figura 1 – Distribuição sazonal de *Vibrio cholerae* não 01 grupo I de Heiberg nas duas estações de tratamento de esgotos – Ilha do Governador e Penha, R.J.

Em relação aos sorotipos de *V. cholerae* não 01 (Tabela 2), é necessário esclarecer previamente, que foi elaborado um critério quantitativo de classificação das formas de ocorrência dos tipos sorológicos. Assim, estão representados sob a sigla de sorotipos “muito freqüentes”, aqueles cuja soma dos percentuais totaliza 65,5 com uma variação permissível de $\pm 2\%$. Os escalões subsequentes foram designados como “freqüentes”, para aqueles cuja percentagem somada ao dos sorotipos “muito freqüentes”, atinge a 85,5 com $\pm 1\%$ de variação e os sorotipos “raros”, que somados aos anteriores perfazem 100% (Tabela 3).

No cômputo geral, os sorotipos “muito freqüentes”, estiveram representados por 046 (53); 051; 037 e os não tipáveis (NT), sendo que os dois primeiros e o último ocuparam a mesma posição nas duas áreas. As maiores diversidades de sorotipos de acordo com a origem, se localizaram nas classes “freqüente e rara”, considerando a extraordinária heterogeneidade de tipos antigênicos reconhecidos (Tabelas 2 e 3). Salienta-se ainda, que dos 30 sorotipos, incluindo as formas não tipáveis (NT) e R 20 (66,6%) foram detectadas na Ilha e 24 (80,0%) na Penha, reconhecendo-se em cada área, tipos autóctones, como os 10 sorotipos

Tabela 3 – Freqüência dos sorotipos de *Vibrio cholerae* não 01 distribuídos segundo a origem (Ilha do Governador e Penha, R.J.)

Classe de freqüência	Ilha do Governador	%	Penha	%
	Sorotipos		Sorotipos	
I – Muito freqüentes (65,5 $\pm 2\%$)*	46 53 NT 51 R	24,1 23,6 11,8 7,0	46 53 NT 51 31	27,6 20,2 14,1 5,5
II – Freqüentes (85,5 $\pm 1\%$)*	34 37 64 78	5,5 5,5 3,9 3,1	6 37 64 14 19	4,3 4,3 4,3 3,0 3,0
III – Pouco freqüentes (100%)*	9;19;36 40;45;50;65 2;5;7;14;56	(1,5)10,5 (0,7)3,5	R 20;34;38;65 7;13;17;32;36; 40;43;50;51;68	2,0 (1,2)4,8 (0,6)6,0

() – percentagem individual

* – somas das percentagens individuais distribuídas por ordem de freqüência dos sorotipos.

da estação de tratamento da Penha (031; 06; 020; 038; 013; 017; 032; 043; 061 e 068), sendo os dois primeiros pertencentes às classes "muito freqüente e freqüente". Nos seis sorotipos exclusivos da estação da Ilha (078, 09; 045; 02; 05 e 056), também observou-se a presença de um tipo freqüente, 078.

Um aspecto de extremo interesse no estudo

ecológico, destacou-se na distribuição sazonal dos sorotipos de *V. cholerae*, retratada na Figura 2. A análise do gráfico permitiu identificar a ausência de uma justaposição de sorotipos em praticamente todas as etapas de investigação, assim como, as oscilações dos tipos sorológicos que se reproduziram com acentuada constância.

Tabela 4 – Comportamento dos diferentes sorotipos de *V.cholerae* não 01 em relação aos meios de cultura utilizados.

Sorotipos	Meios de enriquecimento				
	APA	AMC	AEA	TCBS***	TOTAL
46 53	35	22	17	2	76
NT*	32	16	13	2	63
51	14	12	10	2	38
37	5	7	2	—	14
R	3	4	5	1	13
64	8	1	3	—	12
31	6	2	1	—	9
34	4	—	—	5	9
6	2	—	1	4	7
19	3	2	2	—	7
14	3	3	—	—	6
65	4	—	—	—	4
78	1	1	—	2	4
36	1	—	1	1	3
40	3	—	—	—	3
50	3	—	—	—	3
7	1	1	—	—	2
9	—	2	—	—	2
20	1	1	—	—	2
58	—	1	1	—	2
45	1	1	—	—	2
2	1	—	—	—	1
5	—	1	—	—	1
13	1	—	—	—	1
17	1	—	—	—	1
32	1	—	—	—	1
43	—	1	—	—	1
56	1	—	—	—	1
61	1	—	—	—	1
68	—	1	—	—	1
Total	136(46,8)	79(27,2)	56(19,03)	19(6,5)	290

*NT – Não tipável

**APA – Água peptonada alcalina

AMC – Água peptonada alcalina com amarelo de metacromo

AEA – Água peptonada alcalina com eosina amarela

***TCBS – Semeadura direta em Agar tiosulfato citrato bile sacarose

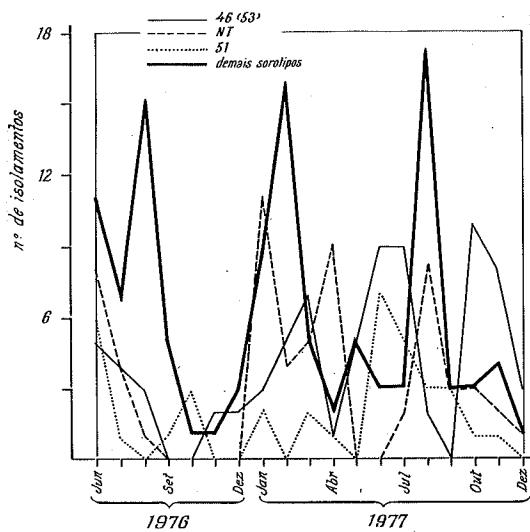


Figura 2 – Incidência dos sorotipos de *V. Cholerae* não 01 isolados dos afluentes das duas estações de tratamento de esgotos, no período de junho de 1976 a dezembro de 1977.

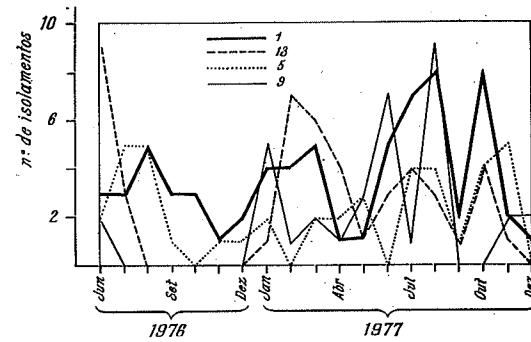


Figura 3 – Distribuição sazonal dos biotipos mais freqüentes (1-13-5 e 9) de *V. cholerae* não 01 nas duas estações de tratamento de esgotos.

Quanto à eficiência dos meios de enriquecimento em relação aos sorotipos, ficou patente a nítida superioridade da clássica fórmula da água peptonada alcalina (APA) sobre as demais, tanto qualitativa como quantitativamente (Tabela 4). A

Tabela 5 – Distribuição e freqüência dos biotipos de *V. cholerae* não 01 de acordo com a origem e ano de isolamento

Biotipos	Perfil	Ilha do Governador		Penha		Total	%
		P N II VP*	1976	1977	1976	1977	
1	SS + +**	12	22	8	26	68	23,44
2	SS + -	3	5	5	9	22	7,58
3	S S--	-	-	-	3	3	1,03
4	SS - +	-	3	-	1	4	1,37
5	S R + +	5	15	10	12	42	14,48
6	S R - +	1	1	-	2	4	1,37
7	S R + -	2	6	2	-	10	3,44
8	S R --	2	-	1	1	4	1,37
9	R R + +	-	12	2	18	32	11,03
10	R R + -	2	8	10	5	25	8,62
11	R R - +	1	3	-	1	5	1,72
12	R S + +	3	5	1	3	12	4,13
13	R S + -	5	7	7	29	48	16,55
14	R S - +	-	1	2	3	6	2,06
15	R S --	-	2	-	3	5	1,72
Total		36	90	48	116	290	99,99

*P – polimixina B; N – novobiocina; II – hemolisina; VP – Voges-Proskauer

**S – sensível; R – resistente; + presença/positivo; - ausência/negativo

APA possibilitou o crescimento de 25 sorotipos (83,3%), em contraposição aos 18 (60,0%) de AMC, aos 11 (36,6%) da AEA e dos 8 (26,6%) obtidos da semeadura direta em Agar TCBS. Aliás, ressalta-se o baixo índice de isolamentos representados pelo plantio primário neste meio seletivo (6,5%). Curiosamente, os cinco sorotipos (05; 09; 043; 058 e 068) que não cresceram em APA, foram detectados através do enriquecimento em AMC, mostrando que a associação dos dois meios resultou em 100% de isolamentos dos sorotipos reconhecidos na investigação.

As amostras analisadas bioquimicamente, permitiram a caracterização de 15 biotipos (Tabela 5), que foram distribuídos segundo a mesma fórmula adotada para os sorotipos. Na classificação geral, os biotipos 1; 13; 5 e 9 incidiram na classe dos "muito freqüentes" enquanto que 10; 2 e 12, se situaram como "freqüentes" e os restantes, 7; 14; 11; 15; 4; 6; 8 e 3, como "raros". A distribuição sazonal entre os biotipos "muito freqüentes" foi representada graficamente (Figura 3), evidenciando uma semelhança acentuada com aquela refletida nos sorotipos, principalmente quando se considera as oscilações sazonais individualizadas.

Na análise efetuada em cada área, observou-se na classe dos sorotipos "muito freqüentes", variações mais nítidas do que nos sorotipos quanto a ordem de seqüência ou ocorrência dos biotipos. Assim, na Ilha, obteve-se a seguinte sucessão: 1; 5; 9; 13 e 10, e na Penha, a séria estava constituída dos biotipos 13; 1; 5 e 9.

Outro aspecto relacionado à biotificação, refere-se ao comportamento do tipo ou forma R que poderia mascarar a presença de *V. cholerae* 01 na amostragem. Neste caso, verificou-se que das 13 amostras R, apenas 3 apresentaram um perfil compatível da variedade El Tor (biotipos 9 e 12), oriundas da estação de tratamento da Ilha.

De um modo geral, não houve um vínculo estreito entre os sorotipos e biotipos enquadrados como "muito freqüentes", excetuando-se talvez o fato que no sorotipo 046 (53), 23 (74,1%) das 31 amostras isoladas na Ilha, foram caracterizadas nos biotipos 1 e 5, enquanto na Penha obteve-se resultados semelhantes, embora em nível bem inferior (44,4%). Também o sorotipo 051, apresentou certa relação com os biotipos 1 e 5 na Ilha (66,6%) e 1 e 13, na Penha (60,8%). Ainda nessa tentativa, enfatiza-se que o biotipo 1 sempre predominou entre os sorotipos mais freqüentes isolados da Ilha.

DISCUSSÃO

As análises realizadas no período de 1 ano e meio em afluentes de duas estações de tratamento de esgotos da cidade do Rio de Janeiro, revelaram vários aspectos extremamente interessantes e aplicáveis ao estudo ecológico de *Vibrio cholerae* não 01 em regiões tropicais. Como elementos para tal prospecção, procurou-se utilizar diversos processos bacteriológicos, compreendidos desde a fase de isolamento até a diferenciação da espécie em biotipos e sorotipos/sorovares.

Como primeira etapa, lançou-se mão da análise mais elementar, representada pela classificação bioquímica de Heiberg (Tabela 1). O resultado evidenciou uma predominância do tipo II nas duas áreas, embora com discreta diferença para o tipo I. Esta situação revelou uma identidade com algumas investigações realizadas em certas partes do mundo (13, 16, 17), bem como, discordando de outras (18, 22). Todavia o ponto de maior interesse, residiu na preponderância de vibrios do grupo I nos períodos mais extremos da temperatura ambiental na cidade do Rio de Janeiro, isto é, nas fases de dezembro a fevereiro e de junho a agosto. Curiosamente, os vibrios pertencentes ao grupo II, predominaram apenas na época de temperatura média mais baixa (abril até outubro). Por sinal esse aspecto só foi mencionado por Müller (17), em região de clima frio.

Dentre os outros aspectos da classificação de Heiberg, observa-se a ocorrência dos tipos III e IV, predominantemente no período de abril a julho, nas duas áreas. Segundo Kaper & col. (12), tais biotipos deveriam ser enquadrados no gênero de *Aeromonas*, embora no presente ensaio, o perfil bioquímico se caracterizou como pertencente a *Vibrio*. Aliás, esta situação reforça o ponto de vista de Barua (1), afirmando que os vibrios não coléricos, podem pertencer a qualquer dos oito tipos da classificação de Heiberg. Igualmente é oportuno destacar as opiniões de Barua (1) e Kaper & col. (12), sobre a incapacidade do esquema de Heiberg propiciar uma biotipificação mais específica de *V. cholerae* não 01, embora seja válida para o sorotipo 01. Associa-se ainda ao problema da discreta discriminação do processo, o fato que os tipos I e II são praticamente indistingüíveis na taxonomia numérica, inclusive podendo ser considerados uma única entidade (12).

Ao se confrontar os resultados da distribuição do tipo I de Heiberg com a sazonalidade (Figura 1) identifica-se que nas duas áreas pesquisadas, houve uma extraordinária coincidência na freqüência de isolamentos, em determinados pe-

ríodos. Enfatiza-se a impossibilidade de responsabilizar a temperatura, como o fator abiótico mais crítico no fenômeno, considerando que as predominâncias ocorreram nos limites mais extremos de temperatura da cidade do Rio de Janeiro, isto é, dezembro a fevereiro (acima de 30°C), e junho a agosto (abaixo de 25°C). Esta variação também foi observada por Khan & col. (13) através da análise de águas de superfície da cidade de Dhaka, mas sem ter tido a preocupação de incriminar ou relacionar a ação de qualquer fator.

Quanto a caracterização de sorotipos (sorovares), salienta-se a multiplicidade de tipos sorológicos reconhecidos, a semelhança daquelas observações realizadas por Lee & col. (15); Roberts & col. (19) e West & Lee (24). Todavia, o ponto mais interessante residiu no isolamento constante dos sorotipos considerados muito freqüentes nos dois locais durante o período de estudo (Tabela 2). Depreende-se do fato, que tais sorotipos de *V. cholerae* são residentes permanentes e não transitórios nos afluentes das estações de tratamento de esgotos, como foi sugerido por West & Lee (24). Contudo, a caracterização desses locais como nichos de *V. cholerae* não 01, não permite indicar que a sua proveniência decorra de portadores humanos, considerando a ausência de isolamentos desses microrganismos nos vários levantamentos realizados na população do Rio de Janeiro, através de coproculturas (Hofer, E. - dados não publicados). Entretanto, admite-se que a poluição fecal é um fator de grande importância para a manutenção das bactérias neste ecossistema, pois propicia as condições abióticas, químicas e/ou físico-químicas idênticas, representadas pelos níveis constantes de Na^+ , Cl^- , pH e condutividade elétrica da água, associadas às temperaturas ambiental e da água, sempre superior a 15°C. A hipótese formulada corrobora com as análises realizadas em diferentes sistemas aquáticos, poluídos ou não, e localizados em várias partes do mundo (3, 5, 12, 14, 15, 18, 19, 24).

Além de fatores abióticos, provavelmente está envolvido no problema, a ação de um elemento biótico que, no caso, determinaria uma concorrência vital entre os sorotipos, fenômeno bem visualizado na distribuição da freqüência de isolamentos dos tipos antigenicos, representada na Figura 2. Aliás, enfatiza-se a necessidade do desenvolvimento de ensaios futuros para o melhor esclarecimento dessa faceta, concentrando-se principalmente na cinética de bacteriófagos em esgotos (Hofer, E. - Dados não publicados), assim como, verificando a influência exercida pela pre-

sença de *V. cholerae* não 01, produtores de bactiocinas (11).

Em relação aos sorotipos detectados nos afluentes das duas áreas (Tabela 2), observa-se que o resultado é muito semelhante àqueles referidos por Lee & col. (15), Robert & col. (19) e West & Lee (24), ou seja, a ocorrência de um contingente numeroso e variado de tipos sorológicos. Sem dúvida que este aspecto não possibilita maiores cotejos, qualquer que sejam os parâmetros considerados, como por exemplo, bacteriológico e/ou epidemiológico. Também é oportuno frisar que tal premissa decorre em grande parte da carência de dados oferecidos na literatura, associando-se ainda o ponto de vista advogado por Sakazaki & Shimada (22) e Shimada & Sakazaki (23) sobre as discretas diferenças geográficas encontradas na incidência e distribuição de *V. cholerae* não 01 nas diversas fontes de isolamento. Como medida prospectiva e também alternativa para tal problema, instituiu-se o critério de classificação dos sorotipos de acordo com certas faixas de freqüências, como está referida na Tabela 3. A adoção deste sistema possibilitou, nos afluentes das duas estações de tratamento localizadas na mesma região geográfica, distinguir nitidamente nas classes, a distribuição heterogênea de sorotipos e, em particular, naqueles enquadrados como freqüentes.

A análise do processo de isolamento em relação aos sorotipos (Tabela 4), evidenciou que o enriquecimento do material por 18 horas na água peptonada alcalina (APA), possibilitou o crescimento de 25 (83,3%), secundado pelo meio AMC, 18 (60,0%), dos sorotipos e das duas variedades (R e NT). A introdução de corantes como o amarelo de metacromo e a eosina amarela nos meios de enriquecimento, decorre de observação anterior (8), revelando que alguns representantes do gênero *Vibrio*, como *V. cholerae* 01 e não 01 e *V. parahaemolyticus*, são menos suscetíveis à inibição.

No entanto, as modificações introduzidas no meio básico (APA), particularmente naquele contendo eosina (AEA), apresentou um índice de isolamentos bem inferior a fórmula clássica (APA), nos espécimes naturalmente contaminados. Outro ponto de menção, situa-se no discreto resultado obtido através da semeadura direta do material em agar TCBS, evidenciando desta maneira que a população de vibrios não coléricos em água de esgoto não é pronunciada, como já foi referido, principalmente por Lee & col (15) e West & Lee (24).

Tendo em vista as limitações do esquema de Heiberg para as análises epidemiológicas e ecológicas, procurou-se instituir um outro critério de classificação bioquímica mais amplo. Assim, tomando por base certas provas empregadas na diferenciação dos biotipos de *V. cholerae* 01 e associando-se a determinados resultados dos estudos taxonômicos realizados (4, 12, 20), possibilitou a seleção de alguns testes e que posteriormente, foram aplicados na diferenciação de biotipos de *V. cholerae* não 01, pertencentes ao grupo I de Heiberg (7).

Adotando-se a mesma fórmula de distribuição da freqüência como nos sorotipos, observou-se que também os biotipos apresentaram uma perfeita identidade na classe dos "muito freqüentes" nas duas origens, com discretas variações quantitativas, por área (Tabela 5). É interessante ressaltar a forma de ocorrência do biotipo 1 numericamente predominante, mas em poucas oportunidades ocupou o primeiro plano na representação gráfica da sazonalidade (Figura 3). Con quanto não tenha sido detectada uma relação estreita de biotipos com sorotipos, nota-se que a distribuição sazonal do sorotipo 46, (53) se coaduna com a do biotipo 1.

Em conclusão, diante dos resultados expostos, ficou evidente que os afluentes de estações de tratamento de esgotos em zonas tropicais, funcionam também como nichos ecológicos naturais de *V. cholerae* não 01. Entretanto, ainda paira a grande incógnita do problema, isto é, o reconhecimento da fonte primária da origem do microrganismo, embora com base na presente investigação reforce o ponto de vista da autoctonia.

SUMMARY

Incidence of non-01 *Vibrio cholerae* in influents of sewage treatment plants in Rio de Janeiro city, RJ, Brazil.

From June 1976 to December 1977, the incidence of non-01 *V. cholerae* was studied in 60 samples of influents of two biological sewage treatment stations, located in the north of Rio de Janeiro city. Out of 644 *Vibrio* strains 290 belonging to group I of Heiberg classification were selected and tested for efficiency of enrichment media, analysis of some biochemical properties, identification of serovars and seasonal distribution in isolation rates of bioserogroups. The alkaline peptone water pH- 8.5 (APW) and the same

base plus 160 mg/100ml of metachrome yellow II RD (APW-MY) and 200 mg/100ml of eosin Y (APW-EY) respectively, were used for enrichment and TCBS Agar as the selective medium. After incubation at 37°C for 18 hours a loopful of each enrichment media growing was spread onto TCBS Agar and the plates incubated at 37°C for 18 h. Five to ten suspected colonies, (sucrose positive) were subcultured on Kligler iron agar. Among the culture media, APW (46.8%) was found more effective than APW-MY (27.2%) and APW-EY (19.0%) for the isolation of non-01 *V. cholerae*. The characterization of 15 biovars was obtained by susceptibility to polymyxin B-50 U (P) and novobiocin - 10 ug/ml (N), hemolytic activity in BHI with 1% glycerol and 1% red sheep blood cells (H) and Voges-Proskauer test (VP). The serological identification was based on the antigenic scheme established by Sakazaki & col. that allowed the recognition of 28 serovars and two forms - R and not typable. *V. cholerae* 01 was never detected in any of the sampling sites. The similarity of the antigenic types was found in both studies areas mainly in the group of very frequent serovars, representing 65.5% of the total. In this situation the serovars 0 46, [53] (26.2%) and 0 51 (13.1%) together with the non typable strains (21.7%) are the most frequent. Based on these results it should be stressed that these serovars are resident and not transitory in the influents of the sewage treatment stations. It was not possible to establish a close correlation between the biovars and serovars although the seasonal distribution of the serovar 0 46, [53] and biovar 1 (P sensitive, N sensitive, H⁺, VP⁺) seems to be the same. However seasonality was very marked in both sites, particularly when the analysis was concentrated on the group I of Heiberg. It was concluded that influents of sewage plants worked as natural ecological niches for non-01 *V. cholerae*, although the primary source of the microrganism was not so far identified.

AGRADECIMENTOS

Aos Drs. R. Sakazaki e T. Shimada do National Institute of Health, Tokyo, Japan, pelo apoio na caracterização sorológica das amostras. Aos Técnicos de Pesquisa, Evaldo Soares da Silva e Junair Ribeiro, pela colaboração técnica prestada e ao Sr. Vicente de Paulo Mello e Oliveira pelo serviço datilográfico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barua, D. - Laboratory diagnosis of cholera. In: Barua, D. & Burrows, W., ed. Cholera. W.B. Saunders Comp. Philadelphia. 1974. p. 85-126.
2. Barua, D. & Gomez, C.Z. - Observations on some tests commonly employed for the characterization of El tor vibrios. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 37:800:803, 1967.
3. Bockemühl, J.; Roch, K.; Wohters, B.; Aleksic, V.; Aleksic, S. & Wokatsch, R. - Seasonal distribution of facultatively enteropathogenic vibrios (*Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio parahaemolyticus*) in the freshwater of the Elbe River at Hamburg. *J. Appl. Bacteriol.*, 60:435-442, 1986.
4. Colwell, R.R. - Vibrios in the environment. In: Colwell, R.R., ed. Vibrios in the Environment. John Wiley & Sons, Inc. 1984. p. 1-12.
5. Daniel, R.R. & Lloyd, B.J. - A note on the fate of El Tor Cholera and other Vibrios in percolating filters. *J. Appl. Bacteriol.*, 48:207-210, 1980.
6. Hofer, E. - Métodos utilizados para o isolamento e identificação de *Vibrio cholerae*. *Informe de Patologia Clínica*, 1:5-18, 1975.
7. Hofer, E.; Hernandez, D.; Pereira, L.A.; Alves, F.C. & Alves, V.S. - Sobre o possível valor epidemiológico da caracterização de biotipos de "Vibrio não colérico". In: Resumos do VIII Congresso Brasileiro de Microbiologia. 1977. Rio de Janeiro, RJ. p. 91-92.
8. Hofer, E. & Silva, C.H.D. - An evaluation of the efficiency of enrichment media in the isolation process for *Vibrio parahaemolyticus*. *Zbl. Bakt. Hyg. A* 256:456-465, 1984.
9. Hugh, R. & Feeley, J.C. - Report (1966-1970) of the subcommittee on taxonomy of vibrios to the International Committee on Nomenclature of Bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 22:123, 1972.
10. Isaäeson, M.; Clarke, K.R.; Ellacombe, G.H.; Smit, W.A.; Smit, P.; Koornhof, H.J.; Smith, L.S. & Kriel, L.J. - The recent cholera outbreak in the South American gold mining industry - A preliminary report. *S.A. Med. J.*, 48:2557-2560, 1974.
11. Israel, Am.; Nacescu, N.; Ciufecu, C. & Stefanescu, C. - Studies on bacteriocin production by NAG-strains of *Vibrio cholerae* as a possible epidemiological marker. *Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. Orig. A* 255:285-293, 1983.
12. Kaper, J.B.; Lockman, H.; Remmers, E.F.; Kristensen, K. & Colwell, R.R. - Numerical taxonomy of Vibrios isolated from estuarine environment. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 33:229-255, 1983.
13. Khan, M.U.; Shahidullah, M.D.; Haque, M.S. & Ahmed, W.U. - Presence of Vibrios in surface water and their relation with cholera in a community. *Trop. geogr. Med.*, 36:335-340, 1984.
14. Kodama, H.; Gyobu, Y.; Tokuman, N.; Okada, I.; Ueda, H.; Shimada, T. & Sakazaki, R. - Ecology of Non-01 *Vibrio cholerae* in Toyama Prefecture. *Microbiol. Immunol.* 28:311-325, 1984.
15. Lee, J.V.; Bashford, D.J.; Donovan, T.J.; Furniss, A.L. & West, P.A. - The incidence of *Vibrio cholerae* in water, animals and birds in Kent, England. *J. Appl. Bacteriol.*, 52:281-291, 1982.
16. Müller, G. - Befunde an nicht-agglutinierenden, cholera-ähnlichen Vibrionen (NAG's) in Abwasser, Flusswasser und Meerwasser. *Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. Orig. B*, 165:487-497, 1977.
17. Müller, H.E. - Vorkommen und Ökologie von NAG-Vibrionen in Oberflächengewässern. *Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. Orig. B*, 167:272-284, 1978.
18. Rhodes, J.B.; Smith Jr., H.L. & Ogg, J.E. - Isolation of non-01 *Vibrio cholerae* serovars from surface waters in Western Colorado. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51:1216-1219, 1986.
19. Roberts, N.C.; Siebeling, R.J.; Kaper, J.B. & Bradford Jr., H.B. - Vibrios in the Louisiana Gulf coast environment. *Microbiol. Ecol.* 8:299-312, 1982.
20. Sakazaki, R.; Gomes, C.Z. & Sebald, M. - Taxonomic studies of the socalled NAG vibrios. *Japan. J. Med. Sci. Biol.*, 20:265-280, 1967.
21. Sakazaki, R.; Tamura, K.; Gomez, C.Z. & Sen, R. - Serological studies on the cholera group of vibrios. *Japan. J. Med. Sci. Biol.* 23:13-20, 1970.
22. Sakazaki, R. & Shimada, T. - Serovars of *Vibrio cholerae* identified during 1970-1975. *Japan. J. Med. Sci. Biol.*, 30:279-282, 1977.
23. Shimada, T. & Sakazaki, R. - Additional serovars and inter-O antigenic relationships of *Vibrio cholerae*. *Japan. J. Med. Sci. Biol.*, 30:275-277, 1977.
24. West, P.A. & Lee, J.V. - Ecology of *Vibrio* species, including *Vibrio cholerae*, in natural waters of Kent, England. *J. Appl. Bacteriol.*, 52:435-448, 1982.

Recebido para publicação em 18/8/89.

ANTICORPOS MONOCLONIAIS PARA A TOXINA DIFTÉRICA: PRODUÇÃO E ANÁLISE ATRAVÉS DE TÉCNICAS IMUNOENZIMÁTICAS

Maria das Graças Miranda Danelli¹

José Mauro Peralta²

Lúcia Martins Teixeira³

Luiz Carlos Duarte Formiga³

RESUMO

Anticorpos monoclonais (Acs.Mns.) foram produzidos pela fusão de células de mieloma SP2/0 e células esplênicas de camundongos BALB/c imunizados com toxóide e/ou toxina diftérica clivada em fragmentos A e B. Entre seis híbridos produtores de Acs.Mns. para a toxina diftérica, 3 (IIIHB5, IIIHB4, IIIHD4) foram clonados. Os sobrenadantes das culturas foram analisados, quanto a presença de anticorpos, através de ensaio imunoenzimático (ELISA), empregando toxóide diftérico como antígeno. Dos 138 clones obtidos, apenas 69 produziram Acs.Mns. para a toxina diftérica. Quinze desses clones foram selecionados para análise mais detalhada, pela técnica de Western blot, com a toxina diftérica íntegra e seus fragmentos A e B. Foi verificado que a maioria (14) dos Acs.Mns. reagiu com o fragmento A, sendo que 6 foram específicos para esse fragmento. Entretanto, dos 8 Acs.Mns. que reagiram com o fragmento B, somente 1 foi específico para esse fragmento. A ocorrência de Acs.Mns. que reagiram com ambos os fragmentos reforça a teoria da existência de epitópos imunodominantes repetitivos em diferentes regiões da molécula.

INTRODUÇÃO

A toxina diftérica é uma proteína de elevada capacidade citotóxica, produzida pelo *Corynebacterium diphtheriae*, responsável direta pelo alto índice de êxito letal observado entre casos de difteria. Essa proteína é formada por 2 fragmentos funcionalmente distintos: fragmento B, responsável pela ligação da toxina diftérica à receptores de membrana de células alvo, e fragmento A, enzimaticamente ativo, responsável pela morte celular, a partir da inibição da síntese proteica de

células eucarióticas.

O emprego da toxina diftérica em estudos de biologia celular e na imunoterapia de tumores, conferiu primordial importância a análise dessa molécula, sendo, no entanto, poucas as contribuições sobre o conhecimento de sua estrutura molecular, na última década (1, 3, 10, 11). Contudo, com o desenvolvimento da tecnologia de híbridos foi possível obter anticorpos monoclonais (Acs.Mns.), especificamente direcionados para diferentes regiões da toxina diftérica, os quais têm sido utilizados para a identificação de domínios

1 Depto. de Imunologia, Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21944 Rio de Janeiro RJ, Brasil

2 Depto. de Desenvolvimento Tecnológico/Bio-Manguinhos, Instituto Oswaldo Cruz, 21040 Rio de Janeiro RJ, Brasil

3 Depto. de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21944 Rio de Janeiro RJ, Brasil

que podem estar envolvidos no processo de entrada da toxina na célula alvo, na sua atividade enzimática e na indução de imunidade protetora (6, 14, 15, 16, 17). A produção de novos Acs.Mns. para a toxina distérica poderá trazer informações adicionais sobre a constituição antigênica desta molécula e contribuir para o desenvolvimento de testes imunodiagnósticos e de vacinas.

Neste trabalho, é relatada a produção e a análise de Acs.Mns. para diferentes regiões da toxina distérica, conforme demonstrado através de técnicas imunoenzimáticas.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e purificação da toxina distérica – A toxina foi obtida a partir do sobrenadante de cultura, em meio C-Y, da amostra padrão *Corynebacterium diphtheriae* PW8, conforme descrito anteriormente (5). Aproximadamente, dois litros de sobrenadante de cultura foram concentrados pelo processos de liofilização. Para a purificação, esse material foi dissolvido em tampão fosfato (TF) 0,01M, pH 7,6 e submetido a precipitação com sulfato de amônio entre 40 e 70%, cromatografia de troca iônica, empregando resina DE-52 e cromatografia de partição, utilizando Sephadex G-100 superfino (7). O material obtido foi analisado através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), seguindo-se a metodologia descrita por Laemmli (8), e de testes de toxigenicidade em cobaias.

Preparo do toxóide distérico – O toxóide distérico foi preparado a partir da toxina distérica purificada, através de tratamento com formaldeído a 0,2%, de acordo com as recomendações de Pappenheimer & col. (10).

Produção de anticorpos monoclonais – Foram empregados camundongos BALB/c com aproximadamente 8 semanas de idade. Para as duas primeiras hibridizações (TD1 e TD2), os animais foram inoculados, intraperitonealmente (i.p.), nos 1º, 14º e 28º dias, com 100 µg de toxóide distérico diluído em TF, pH 7,4, adicionado de gelatina a 0,02%, sendo que, na primeira e segunda inoculações, o antígeno foi preparado em adjuvante completo e incompleto de Freund (v/v), respectivamente. Para a terceira hibridização (TD3), foi empregado um esquema idêntico ao anteriormente referido, exceto que, no 28º dia, foram inoculados 100 µg, i.p., de toxina tratada

com tripsina e 2-mercaptopetanol (4). A pesquisa de anticorpos para a toxina distérica, no soro desses animais, foi feita através de testes de ELISA, empregando-se o toxóide distérico com antígeno.

Os Acs.Mns. foram obtidos pela fusão entre células esplênicas de camundongos imunizados e células de mieloma SP2/0, empregando-se as técnicas de hibridização e clonagem como descritas por Hayakawa & col. (6). Os sobrenadantes de cultura dos híbridos e clones foram testados, quanto à presença de anticorpos contra a toxina distérica, pela técnica de ELISA.

Os sobrenadantes de culturas dos clones ou líquidos ascíticos de camundongos inoculados com os clones foram, portanto, usados como fontes de Acs.Mns.. Para a obtenção de líquido ascítico, camundongos BALB/c adultos foram inoculados, i.p., com 0,5 ml de pristane. Após 10 dias, foram inoculadas, em cada animal, i.p., 10⁶ células, de um dos clones, contidas em 0,5 ml de meio RPMI incompleto. Os líquidos ascíticos dos tumores, que se formaram em 2 a 4 semanas, foram coletados e mantidos a -20°C.

A partir dos líquidos ascíticos, os Acs.Mns. foram purificados por precipitação com sulfato de amônio, em concentração final de 50%. O material precipitado foi dialisado contra TF, pH 6,9, por 24 horas e centrifugado a 5.000 g/30 min. O sobrenadante foi aplicado em coluna (1,0 x 7,0 cm) contendo DE-52, sendo o material deslocado da coluna com uma solução 0,1M de NaCl em TF.

Ensaios imunoenzimáticos – Os ensaios imunoenzimáticos (testes de ELISA) foram realizados em placas de poliestireno, sensibilizadas com 3 mg/ml de toxóide distérico. Para tal, 50 µl do antígeno, diluído em tampão carbonato de sódio 0,06 M, pH 9,6, foram distribuídos em cada cavidade de uma placa de microtitulação, a qual foi incubada a 37°C por 3 horas. As placas sensibilizadas foram mantidas a 4°C, até o uso, por um período máximo de 1 semana. Para a realização dos testes, o antígeno não adsorvido à placa foi removido através de 3 lavagens, de 3 minutos cada, com solução salina tamponada (SST) 0,01 M, pH 7,2, contendo 0,3% de Tween 20 (SSTT). Posteriormente, adicionou-se 50 µl de SSTT com albumina bovina a 1% (SSTTA) por 30 min. a 37°C. Após a lavagem da placa, 3 vezes por 3 min. cada, com SSTT, foram adicionados 50 µl de sobrenadante de cultura ou de líquido ascítico diluído em SSTT. Após um período de incubação a 37°C por 30 minutos, foram realizadas novas la-

vagens, adicionando-se, em seguida, 50 μ l de conjugado anti-imunoglobulina G de camundongo, marcada com peroxidase, diluído a 1/3.000 em SSTT e as placas foram incubadas por mais 30 min. a 37°C. Após as lavagens, foram adicionados 50 μ l da solução reveladora, contendo o substrato enzimático (H_2O_2) e a substância cromógena (trimetilbenzidina - TMB), preparada segundo as recomendações do fabricante (Kirkgaard & Perry Labs.). Após 5 min. à temperatura ambiente, no escuro, a reação foi interrompida pela adição de H_2SO_4 8N e as densidades óticas foram determinadas a 450 nm cím espectrofotômetro para placas de microtitulação (Titertek Multiskan, Flow Labs.).

Reações imunoenzimáticas sobre membrana de nitrocelulose contendo抗ígenos transferidos a partir de gel de poliacrilamida (Western blot) – Para a execução dos testes de Western blot, alíquotas contendo toxina diftérica íntegra ou tratada com tripsina e 2-mercaptopropano (4) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida e, posteriormente, transferidas eletroforeticamente, para membranas de nitrocelulose, conforme descrito por Tsang & Col. (13). Após a transferência, as membranas foram incubadas a 37°C por 1 h em presença de SSTT contendo leite desnatado a 10%. A seguir, as membranas foram cortadas em tiras e incubadas com sobrenadantes de cultura ou líquido ascítico, por 2 h à temperatura ambiente,

sob agitação constante e, posteriormente, durante a noite à 4°C. Após 3 lavagens de 3 min. cada, com SSTT, foi adicionada anti-imunoglobulina G de camundongo conjugada à peroxidase e diluída a 1:1000 em SSTT contendo 5% de leite desnatado. As tiras foram, então, incubadas por 1 h à temperatura ambiente, com agitação constante. Após novas lavagens, foi procedida a revelação, imergindo-se as tiras na solução reveladora (composta de 50 mg de diaminobenzidina e 20 μ l de H_2O_2 a 30%, dissolvidos em 100 ml de SST 0,01M, pH 7,2) por 5 min. As membranas foram, então, lavadas em água destilada e deixadas secar à temperatura ambiente, no escuro.

RESULTADOS

O rendimento do processo de purificação da toxina está apresentado na Tabela 1. A análise, através de SDS-PAGE evidenciou a presença de uma larga barra com PM semelhante ao da toxina diftérica (62.000 Da). A avaliação da atividade biológica desse material, através de testes de toxicidade em cobaias, revelou efeitos característicos da toxina diftérica (tais como: erição de pêlos, dispneia, inapetência e hemorragia, com morte dos animais em 96h, após a inoculação), os quais foram neutralizados pela anti-toxina diftéria.

Foram realizadas 3 fusões celulares, obten-

Tabela 1 – Concentração proteica das frações obtidas nas diferentes etapas do processo de purificação da toxina diftérica^a.

Etapas ^b	Volume Empregado (ml)	Volume Recuperado (ml)	Concentração Proteica Obtida ^c (mg/ml)	Concentração Proteica Recuperada mg/vol.total)
1	2000	600	128	$7,68 \times 10^4$
2	600	30	100	$3,0 \times 10^3$
3	30	27	1,2	32,4
4	27	16	1,15	18,4

a Produzida pela amostra de *Corynebacterium diphtheriae* PW8.

b Etapas: 1, sobrenadante bruto de cultura concentrado por liofilização. 2, sobrenadante de cultura precipitado com sulfato de amônio entre 40-70%. 3, material obtido na etapa 2 e aplicado em coluna contendo DE-52. 4, material obtido na etapa 3 e aplicado em coluna contendo Sephadex G-100.

c O cálculo da concentração proteica foi feito levando-se em consideração o coeficiente de extinção da toxina diftérica a 280 nm ($E_{1cm}^{1\%} = 10$).

Tabela 2 – Anticorpos monoclonais contra a toxina diftérica, obtidos pela clonagem de células de mieloma SP2/O e células esplênicas de camundongos BALB/c imunizados com toxóide diftérico e/ou toxina diftérica fragmentada.

Híbridos	Número de cavidades cultivadas	Número e percentual de cavidades com crescimento	Número e percentual de cavidades com crescimento de um clone	Número e percentual de sobrenadantes com Acs. Mns. específicos para toxina
IIIHB4 ^b	192	106 (55,2)	37 (35,0)	3 (8,1)
IIHB5 ^a	384	165 (43,0)	55 (33,3)	55 (100,0)
IIIHD4 ^b	192	107 (55,7)	46 (43,0)	11 (24,0)
Total	768	378 (49,2)	138 (36,5)	69 (50,0)

^a Híbrido resultante da fusão TD1^b Híbrido resultante da fusão TD3

do-se, a partir de 2 (TD1 e TD3), três híbridos, denominados de IIIHB5 (TD1), IIIHB4 e IIIHD4 (TD3), que apresentaram um bom crescimento celular. Estes foram submetidos a clonagem, utilizando-se a técnica de diluição limitante. Foram obtidos 69 clones produtores de Acs.Mns. para a toxina diftérica (Tabela 2), conforme verificado através de testes de ELISA. Desses, 15 foram classificados de acordo com o isótipo e analisados pelas técnicas de ELISA, empregando-se o toxóide diftérico como antígeno, e de Western-blot, quanto a sua reatividade com a toxina diftérica e seus fragmentos A e B.

A determinação de isótipos, por meio de reações de imuno-precipitação em gel, permitiu constatar que todos os Acs.Mns. estudados possuíam cadeia pesada IgG_{2b} e cadeia leve K (Kappa).

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados dos testes imunoenzimáticos empregados para a caracterização dos 15 Acs.Mns. estudados. As diferenças nos títulos apresentados pelos Acs.Mns. frente o toxóide diftérico, através de testes de ELISA, não pareceram estar relacionadas à intensidade da ligação desses anticorpos com a toxina diftérica, uma vez que, pela técnica de Western blot, todos apresentaram o mesmo padrão de reatividade com a toxina diftérica independente do título obtido nos testes de ELISA. Todavia, embora o sobrenadante de cultura do clone IIB6(B5) reagisse com o toxóide diftérico,

Tabela 3 – Resultados da análise dos anticorpos monoclonais, através de teste de ELISA, empregando toxóide diftérico como antígeno e, de Western Blot, utilizando a toxina diftérica (TD) e seus fragmentos A (FA) e B (FB).

Clones ^a	Título no Teste de Elisa	Reatividade pelo Western Blot ^c		
		TD	FA	FB
IIB6 (B5) ^b	≥80	-	-	-
IB3 (B4)	40	+	(+)	+
IE3 (B4)	10	+	+	+
IIE5 (B4)	40	+	+	-
IIB8 (D4)	10	+	+	(+)
IID2 (D4)	40	+	+	(+)
ID5 (D4)	10	+	+	-
ID7 (D4)	40	+	+	-
IID7 (D4)	≥80	+	+	-
IID8 (D4)	10	+	+	(+)
IIE5 (D4)	40	+	+	(+)
IE9 (D4)	10	+	(+)	-
IE10 (D4)	≥80	+	+	(+)
IIG6 (D4)	10	+	+	-
IG8 (D4)	≥80	+	+	(+)

a Os testes foram realizados com os Acs.Mns. contidos em sobrenadantes de cultura

b Quando este Ac.Mn. foi obtido a partir de líquido ascítico, houve reação com a toxina diftérica e, fraca-mente, com o fragmento B

c -, negativo, +, positivo, (+), fracamente positivo

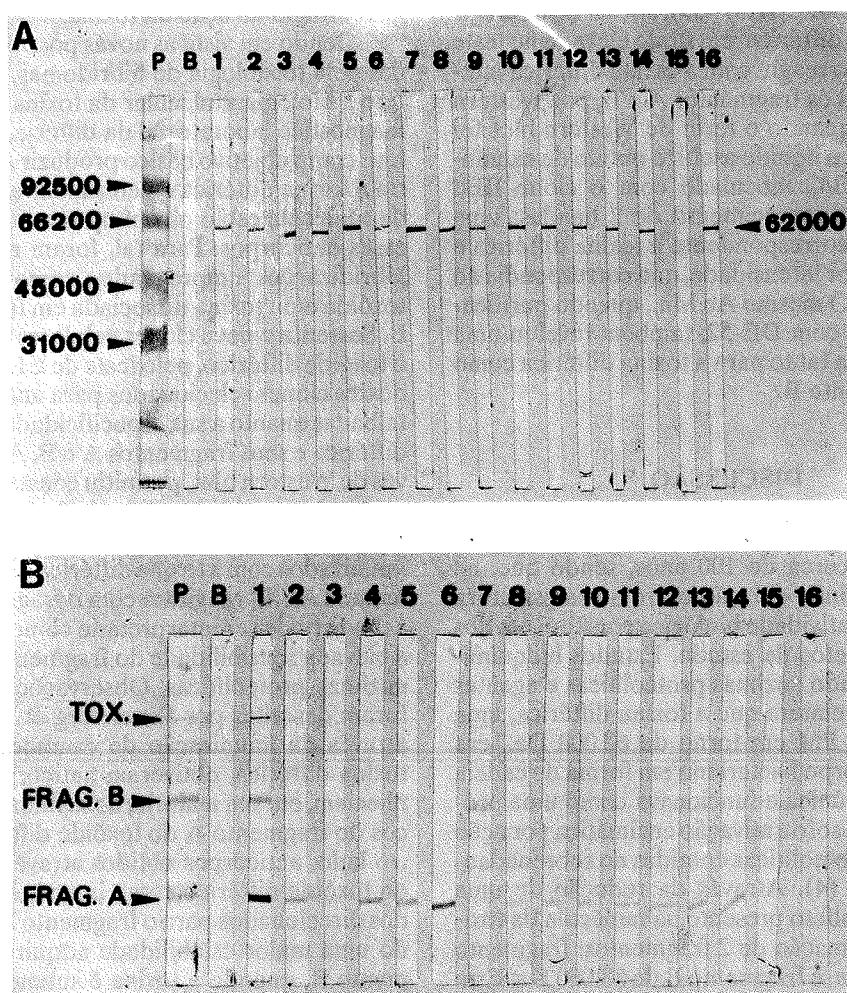


Figura 1 – Análise, através de Western blot, da reatividade dos Acs.Mns. com a toxina diftérica intacta (A) e com a toxina tratada com tripsina e 2ME, dando origem aos fragmentos A e B (B).

P(A) – padrão de baixo peso molecular.

P(B) – toxina diftérica tratada com tripsina e 2ME.

B(A e B) – controle; membrana de nitrocelulose contendo antígeno e incubada na ausência de Acs.Mns.

Sobrenadantes de culturas dos clones:

1) IID2(D4); 2) IID8(D4); 3) IE3(B4); 4) IG8(D4); 5) IIB8(D4); 6) IE10(D4); 7) IB3(B4); 8) IE9(D4); 9) ID5(D4); 10) ID7(D4); 11) IID7(D4); 12) IIG6(D4); 13) IIE5(D4); 14) IIE5(B4); 16) IIB6(B5), purificado em DE-52.

não apresentou reatividade com a toxina diftérica intacta. O estudo da afinidade dos 15 Acs.Mns. com os fragmentos A e B da toxina diftérica (Figura 1) revelou que 7 reagiram especificamente com um ou outro fragmento, sendo que 6 clones produziram Acs.Mns. para o fragmento A (31000 Da) e apenas 1 secretava Acs.Mns. para o fragmento B (45000 Da). Por outro lado, 8 clones

produziram Acs.Mns. que reagiam com ambos os fragmentos, embora, em sua maioria, apresentassem diferentes intensidades de reação. Seis desses anticorpos reagiram em maior intensidade com o fragmento A, um com o fragmento B e outro reagiu igualmente com ambos os fragmentos.

O Ac.Mn. produzido pelo clone IIB6 (B5) apresentou um tipo de comportamento muito pe-

cular. Este anticorpo, contido no sobrenadante de cultura do clone IIB6 (B5), apesar de interagir com o toxóide diftérico, em títulos elevados no teste de ELISA, não reagiu com a toxina diftérica integrada e nem com os fragmentos A e B, por Western blot. Porém, quando o teste de Western blot foi realizado com o líquido ascítico obtido de camundongos BALB/C inoculado com o clone IIB6 (B5), houve o aparecimento de 2 bandas: uma mais intensa, correspondente à toxina diftérica e outra, de menor intensidade, que correspondia ao fragmento B. O mesmo Ac.Mn., quando purificado em coluna com DE-52, também revelou uma reação positiva tanto para a toxina diftérica como para o fragmento B.

DISCUSSÃO

As investigações sobre a toxina diftérica começaram há cerca de 100 anos, sendo que, na atualidade, a inter-relação entre a sua estrutura molecular e a atividade biológica constitui um dos principais objetos de estudo. Estudos bioquímicos, empregando enzimas proteolíticas e agentes redutores, revelaram que a toxina diftérica, uma proteína com PM em torno de 62.000 Da, era liberada do corpo bacteriano em forma de cadeia polipeptídica única e funcionava como uma pró-enzima, a qual sofria ativação enzimática por ação de enzimas proteolíticas contidas no sobrenadante de cultura (4). Através da redução de uma ponte de dissulfeto presente na molécula da toxina havia a formação de 2 fragmentos: fragmento A de 24.000 Da. e fragmento B de 38.000 Da. Este último, isoladamente, apresentava-se atóxico para células sensíveis, apesar do fragmento A possuir atividade enzimática capaz de inibir a síntese proteica em sistemas livres de células.

O emprego de anticorpos policlonais, como instrumento analítico para o estudo da relação entre a estrutura e a função da toxina, permitiu a obtenção de informações importantes (3, 10, 11). Entretanto, a ocorrência de resultados conflitantes, atribuídos à heterogeneidade desses anticorpos, limitavam o valor desse tipo de análise.

Por outro lado, o recente desenvolvimento de anticorpos monoclonais resultou em progresso que, até então, não havia sido possível com o emprego de anticorpos convencionais. Assim, sendo, informações sobre a relação entre um certo domínio molecular e uma determinada função, podem ser obtidas pela comparação da estrutura

reconhecida pelo Ac.Mn. e seus efeitos sobre algum estágio da ação da toxina.

Tendo em vista as novas possibilidades geradas pela tecnologia de hibridomas, no que se refere à biologia molecular da toxina diftérica e ao diagnóstico laboratorial da difteria, este trabalho teve como objetivo básico produzir Acs.Mns. contra a toxina diftérica e determinar em que porção da molécula estão os epítopos reconhecidos por esses anticorpos. Para tal, foram realizadas três hibridizações empregando, como imunógenos, toxóide e/ou toxina dissociada em fragmentos A e B. Sessenta e nove clones celulares reagiram com o toxóide diftérico, pelo teste de ELISA, sendo 15 desses clones selecionados para análises mais detalhadas quanto a sua especificidade para a toxina diftérica e seus fragmentos A e B. A análise, através de Western blot, permitiu constatar que todos os Acs.Mns., obtidos à partir da fusão de células neoplásicas e células esplênicas de camundongos imunizados com a toxina diftérica clivada em fragmentos A e B, reagiram com o fragmento A. Este achado pode ser interpretado como sendo devido a elevada sensibilidade do fragmento B à ação de enzimas proteolíticas. Observações semelhantes foram descritas por Rittenberg & Col. (11) que, através da imunização de camundongos com a toxina diftérica, obtiveram anticorpos que reconheceriam, em sua maioria, determinantes antigenicos do fragmento A do toxóide diftérico. Por outro lado, anticorpos obtidos através do emprego do toxóide diftérico como imunógeno, foram todos direcionados para o fragmento B, evidenciando uma maior estabilidade adquirida pelo fragmento B, quando a toxina é submetida ao tratamento com formaldeído. Assim sendo, o fato de encontrarmos diversos Acs.Mns. para o fragmento A, ao contrário dos achados de outros autores (6, 16, 17) poderia ter sido devido ao emprego da toxina diftérica fragmentada como imunógeno.

Apesar dos fragmentos A e B da toxina diftérica serem imunologicamente distintos (10) foram, por nós, obtidos alguns clones que produziram Acs.Mns. capazes de reconhecer ambos os fragmentos. Esses resultados podem ser explicados pela existência de epítopos imunodominantes repetitivos em diferentes domínios da molécula da toxina, conforme apontado por Triebel & col. (12). Estes autores, estudando a resposta celular e humoral de indivíduos recém imunizados com toxóide diftérico, verificaram que um único clone de linfócitos T, estimulado com toxina diftérica, era capaz de reconhecer um determinante antígenico presente em diversos peptídios do fragmento

B e que alguns dos sítios de ligação da molécula com os anticorpos eram divididos entre o fragmento A e alguns peptídios do fragmento B. Os Acs.Mns. específicos para o fragmento A da toxina diftérica, que apresentaram uma baixa afinidade para toxóide diftérico (título de 1:10), provavelmente reconhecem epítopos expostos nesse fragmento isolado, mas que teriam uma conformação de difícil acesso ao Ac.Mn. no toxóide não fragmentado. Os anticorpos que reagiram com fragmento A e que apresentaram reatividade mais acentuada (título de 1:40 e 1:80) possivelmente reconhecem epítopos que estão mais expostos tanto no toxóide diftérico como no fragmento enzimaticamente ativo.

Um outro aspecto que merece ser comentado relaciona-se à afinidade dos Acs.Mns.. O Ac.Mn. produzido pelo clone II B6 (B5) o qual apresentou título igual ou superior a 80, para o toxóide diftérico, através do teste de ELISA, sómente revelou afinidade com a toxina diftérica e seu fragmento B, através do teste de Western blot, após ter sido concentrado. A maior afinidade desse anticorpo pelo toxóide diftérico talvez possa ser explicada, pelo menos em parte, por alterações de conformação da molécula conforme já evidenciado na literatura (2). Diferenças de afinidade foram também observadas por Nielsen & col. (9), com Acs.Mns. produzidos contra o toxóide ou toxina diftérica que apresentavam uma reatividade maior, em teste de ELISA, com respectivo antígeno que lhes dera origem. A especificidade do Ac.Mn. produzido pelo clone IIB6 (B5) pode ser avaliada através de testes de neutralização "in vivo", no qual, cobaias inoculadas i.p., com Ac.Mn foram desafiadas, por via subcutânea, com toxina diftérica (manuscrito em preparo). Observou-se que animais tratados anteriormente com o Ac.Mn. não apresentaram qualquer sinal ou sintoma do efeito tóxico da toxina diftérica.

As características dos Ac.Mn. descritos neste trabalho encorajam seu uso como instrumentos para investigações da toxina diftérica, a nível molecular, visando o estudo da sua ligação e entrada em células eucarióticas íntegras. Além disso, tais Acs.Mns. poderiam ser úteis na detecção da toxina diftérica em culturas ou materiais clínicos, de forma rápida e específica, especialmente em áreas onde a difteria é endêmica ou epidêmica e as infecções respiratórias do trato superior apresentam elevada prevalência, principalmente em crianças. Experimentos estão sendo realizados para avaliação dessas possibilidades.

SUMMARY

Monoclonal antibodies to diphtheria toxin: production and analysis by immunoenzymatic techniques

Monoclonal antibodies (MAbs) were produced by the fusion of murine myeloma cells SP2/0 and spleen cells of BALB/c mice immunized with toxoid only or toxoid and diphtheria toxin nicked in fragments A and B. Diphtheria toxoid was prepared by formaldehyde treatment of purified diphtheria toxin obtained from culture supernatants of *Corynebacterium diphtheriae* PW8 strain, which was grown on C-Y medium for 5 days at 37°C under shaking conditions. Purified toxin was obtained from supernatants by precipitation with 40-70% ammonium sulfate and chromatography on DE-52 and Sephadex G-100 columns. Six hybridomas (IIHB5, IIHD2, IVHD4, IVHB6, IIIHB4 and IIIHD4), which secreted antibodies to diphtheria toxin, were obtained from three fusion's procedures. Three of them (IIHB5, IIIHB4 and IIIHD4) were cloned by the limiting dilution method. The culture supernatants were analysed for MAbs production by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using diphtheria toxoid as antigen. This screening test demonstrated that, among 138 clones obtained, only 69 secreted MAbs to diphtheria toxin. Fifteen clones [IIB6(B5), IB3(B4), IE3(B4), IIE5(B4), IIB8(D4), IID2(D4), ID5(D4), ID7(D4), IID7(D4), IID8(D4), IIE5(D4), IE9(D4), IE10(D4), IIG6(D4) and IG8(D4)] were selected to be further analysed. These clones were inoculated into BALB/c's peritoneal cavity for production of ascitic fluid. Some of those MAbs were purified from ascitic fluid by precipitation with 50% ammonium sulfate and ion exchange chromatography on DE-52. Isotypes were determined by immunodiffusion with class and sub-class specific antisera. All of them were shown to belong to the IgG2b K isotype. Reactivities of the MAbs were also assayed by Western blot using diphtheria toxin and its fragments A and B as antigens. For that, purified intact and nicked diphtheria toxin were electrophoresed in a 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE) under reducing conditions or not. The separated components were then transferred to nitrocellulose membranes and analysed. All MAbs were shown to be specific to diphtheria toxin and the majority (14) was directed to fragment A. Six of them were specific to this fragment. Although

eight of the MAbs reacted with fragment B, only one clone reacted with this fragment specifically. The finding of MAbs reacting with both diphtheria toxin fragments reinforces the idea of the existence of repetitive immunodominant epitopes in different regions of the molecule.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho recebeu apoio financeiro da CAPES e CNPq. Os autores agradecem à Carlos Ausberto B. Souza pela excelente assistência técnica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bazal, M.; Goscinski, P.J. & Hamburger, R.N. – Characteristics on human antibody to diphtheria toxin. *Infect. Immun.*, 7:130-136, 1973.
2. Bigio, M.; Rossi, R.; Nucci, D.; Antoni, G.; Rappuoli, R. & Ratti, G. – Conformational changes in diphtheria toxoids. Analysis with monoclonal antibodies. *FEBS Lett.*, 218:271-276, 1987.
3. Crys, S.J., Jr.; Welkos, S.L. & Holmes, R.K. – Immunochemical studies of diphtheria toxin and related nontoxic mutant proteins. *Infect. Immun.*, 30:835-846, 1980.
4. Drazin, R.J.; Kandel, J. & Collier, R.J. – Structure and activity of diphtheria toxin. II. Attack by trypsin at a specific site within the intact molecule. *J. Biol. Chem.*, 246:1504-1510, 1971.
5. Gill, D.M.; Uchida, T. & Singer, R.A. – Expression of diphtheria toxin genes carried by integrated and no integrated phage beta. *Virol.*, 50:664-668, 1972.
6. Hayakawa, S.; Uchida, T.; Mekada, E.; Moynihan, M.R. & Okada, Y. – Monoclonal antibody against diphtheria toxin-effect on toxin binding and entry into cells. *J. Biol. Chem.*, 258:4311-4317, 1983.
7. Holmes, R.K. & Perlow, R.B. – Quantitative assay of diphtherial toxin and of immunologically cross-reacting protein by reversed passive hemagglutination. *Infect. Immun.*, 12:1392-1400, 1975.
8. Laemmli, U.K. – Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685, 1970.
9. Nielsen, P.B.; Koch, C.; Heron, I.; Prag, J. & Schmidt, J. – Double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of toxin-producing *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Clin. Microbiol.*, 25:1280-1284, 1987.
10. Pappenheimer, A.M., Jr.; Uchida, T. & Harper, A.A. – An immunological study of the diphtheria toxin molecule. *Immunochem.*, 9:901-906, 1972.
11. Rittenberg, M.B.; Prinney, C.T., Jr. & Iglesias, B.H. – Antigenic relationships on the diphtheria toxin molecule: antitoxin versus antitoxoid. *Infect. Immun.*, 14:122-128, 1976.
12. Triebel, F.; Autran, B.; De Roquebenet, S.; Falmagne, P. & Debry, P. – Immune response to diphtheria toxin and to different CNBr fragments: evidence for different B and T cell reactivities. *Eur. J. Immunol.*, 16:47-53, 1986.
13. Tsang, V.C.W.; Peralta, J.M. & Simmons, R.A. – The enzyme-linked immuno-electrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Methods Enzymol.*, 92:(E):377-391, 1983.
14. Yoshimori, T. & Uchida, T. – Monoclonal antibodies against diphtheria toxin: their use in analysis of the function and structure of the toxin and their application to cell biology. In: Macario, A.J.L. & Macario, E.C. (eds). *Monoclonal antibodies against bacteria*. Vol. III. Academic Press, Inc., Orlando, Fl. p. 229-248, 1986.
15. Yoshimori, T.; Yamada, M.; Sugawa, H.; Mekada, E.; Uchida, T. & Okada, Y. – Monoclonal antibodies against diphtheria toxin fragment A: characterization and introduction into living cells. *Exp. Cell. Res.*, 151:344-353, 1984.
16. Zucker, D.R. & Murphy, J.R. – Monoclonal antibody analysis of diphtheria toxin. I. Localization of epitopes and neutralization of cytotoxicity. *Mol. Immunol.*, 21:785-793, 1984.
17. Zucker, D.R.; Murphy, J.R. & Pappenheimer, A.M., Jr. – Monoclonal antibody analysis of diphtheria toxin. II. Inhibition of ADN-ribosyltransferase activity. *Mol. Immunol.*, 21:795-800, 1984.

Recebido para publicação em 21/10/89.

COMPARAÇÃO DE DOIS MEIOS DE CULTURA E VALOR DO EXAME DIRETO NO DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO INTESTINAL POR *CAMPYLOBACTER JEJUNI/COLI*.

Heriberto Fernández¹
Luiz Rachid Trabulsi²

RESUMO

Foram avaliados os meio de Butzler (BU) e de Skirrow modificado (SKM) para o isolamento de *Campylobacter jejuni/coli*, bem como, o exame a fresco (microscopia de contraste de fase), visando selecionar uma metodologia simples e de baixo custo para o diagnóstico rotineiro da gastroenterite produzida por estas bactérias. Das 706 amostras de fezes semeadas em BU e SKM foi possível isolar 54 amostras de *Campylobacter* (7,6%). Quarenta e sete cresceram no meio BU e 43 no meio SKM e 36 em ambos os meios, simultaneamente. A proporção de concordância foi de 97,4%. O exame a fresco permitiu o diagnóstico presuntivo destes microrganismos em todos os casos com cultura positiva. Não foram encontrados falsos negativos apresentando-se, somente, 9 casos falsos positivos (1,4%). O valor preditivo deste exame foi de 85,7%.

INTRODUÇÃO

As espécies termotolerantes do gênero *Campylobacter* (*C. jejuni* e *C. coli*) são reconhecidas como agentes de diarréia humana em todos os continentes (2, 12).

Vários meios de cultura foram desenvolvidos para o isolamento destas bactérias (4). Embora as técnicas de diagnóstico estejam bem estabelecidas, a obtenção da microaerofilia estrita, necessária ao seu desenvolvimento, exige a utilização de métodos custosos que dificultam uma maior difusão destas técnicas. A adição de metabissulfito de sódio, piruvato de sódio e sulfato ferroso ao meio de Skirrow (13), além de aumentar a aerotolerância de *Campylobacter* em torno de dez vezes (10), permite a incubação do meio em jarra com vela. Nessas condições, a pesquisa de *Campylobacter*, quando acompanhada do exame direto das fezes, pode ser amplamente facilitada em laboratórios com menos recursos materiais.

Neste trabalho, são avaliados dois meios de cultura para o isolamento de *C. jejuni/coli*, bem como o exame direto a fresco, visando proporcionar uma metodologia simples e de baixo custo para o diagnóstico rotineiro da gastroenterite produzida por estas bactérias.

MATERIAL E MÉTODOS

Meios de cultura – Para o isolamento foram empregados os meio de Butzler (3) e de Skirrow modificado (13).

Composição e preparo dos meios:

Meio de Butzler (BU), fórmula g/l

Base: Caldo tioglicolato 135C (BBL) 30g
Agar bacteriológico (BBL) 20g
Mistura antibiótica (Oxoid): bacitracina 2500UI

1 Instituto de Microbiología Clínica, Facultad de Medicina, Casilla 567, Valdivia, Chile

2 Disciplina de Microbiología, Escola Paulista de Medicina, Rua Botucatu, 862 - Vila Clementino, São Paulo SP, Brasil

novobiocina	5mg
colistina	10000UI
cefazolina	15mg
cicloheximida	5mg
Sangue desfibrinado (cavalo ou carnciro)	50ml
Meio de Skirrow modificado (SKM), fórmula g/l	
Base: Agar Brucella (BBL)	43g
Mistura antibiótica (Oxoid): vancomicina	10mg
trimetoprima	5mg
polimixina B	2500UI
cefalotina (Lilly)	10mg
Suplemento FBP (Merck):	
piruvato de sódio	0,5g
metabissulfito de sódio	0,5g
sulfato ferroso	0,5g
Sangue desfibrinado (cavalo ou carneiro)	50ml

Cada meio base foi esterilizado em autoclave (121°C por 15min), resfriado a 50°C e, a seguir, adicionado do sangue e das misturas antibióticas e suplemento. Posteriormente, foram distribuidos em placas de Petri.

Amostragem – Foram analisadas 706 amostras de fezes de crianças de 0-6 anos de idade, correspondendo a 204 crianças normais e a 502 com diarréia.

Métodos microbiológicos – As amostras foram semeadas, paralelamente, nos meios BU e SKM e incubadas a 43°C por 48hs numa atmosfera reduzida. Para o meio BU foi obtida mediante o sistema GasPak sem catalizador e para o meio SKM, pelo método da jarra com vela.

As amostras de *Campylobacter* isoladas foram identificadas utilizando os testes propostos por Skirrow e Benjamin (16).

De cada amostra de fezes foi feito exame direto a fresco com microscopia de contraste de fase.

Métodos estatísticos – O teste de McNemar para se estudar a possível concordância entre o crescimento bacteriano observado nos meios BU e SKM, com $\alpha = 5\%$. No caso do exame direto, foram calculados a sensibilidade, especificidade e valor preditivo (15).

RESULTADOS

Os resultados obtidos em relação ao rendimento dos meios BU e SKM estão apresentados na Tabela 1. Verificou-se que dos 54 (100%) casos positivos, 47 (87,0%) foram isolados no meio BU e 43 (79,6%) no meio SKM. O isolamento simultâneo em ambos os meios ocorreu em 36 casos. Em 11, estas bactérias foram isoladas somente do meio BU e em 7, o isolamento foi obtido apenas do meio SKM. A análise estatística revelou que não existe diferença significante entre o rendimento dos dois meios, cuja proporção de concordância foi de 97,4%.

Na Tabclá 2 estão apresentados os resultados obtidos no exame a fresco com microscopia de contraste de fase. Das 706 amostras de fezes ana-

Tabela 1 – Eficiência dos meios de Butzler e Skirrow modificado no isolamento de *Campylobacter* em 706 amostras de fezes humanas.

Meios	Amostras positivas		% casos positivas
	Nº	%	
Butzler	47	6,6	87,0
Skirrow modificado	43	6,1	79,6
Butzler + Skirrow modificado	54	7,6	100,0

Proporção de concordância: 97,4%

Tabela 2 – Comparação dos resultados do exame direto a fresco por microscopia de contraste de fase e das coproculturas na pesquisa de *Campylobacter* em 706 amostras de fezes humanas.

Copro cultura	Exame a fresco	
	positivo	negativo
Positiva (n=54)	54 (100,0%)	0 (0,0%)
Negativa (n=652)	9 (1,4%)	643 (98,6%)

Valor preditivo = 85,7%

lisadas, 54 (7,6%) apresentaram cultura positiva para *Campylobacter*. O exame direto permitiu o diagnóstico presuntivo do microrganismos em todos os casos confirmados pela cultura. Não foi diagnosticado casos falsos negativos mas, em 9 amostras de fezes (1,4%) com cultura negativa, observaram-se formas bacterianas com morfologia e motilidade em "saca-rolha", compatíveis com *Campylobacter* (casos falsos positivos).

Campylobacter foi isolado em 6,9% das crianças normais e em 9% das crianças com diarréia, não existindo diferenças significantes entre os grupos (Tabela 3).

C. jejuni foi a espécie mais frequentemente isolada, com proporções semelhantes nos dois grupos de crianças. *C. coli* foi isolado em 28,6% e 27,5% das crianças normais e com diarréia, res-

pectivamente (Tabela 4).

DISCUSSÃO

A utilização da jarra com vela para o isolamento de *Campylobacter* a partir de fezes humanas, no meio Campy-Bap sem suplemento FBP, e de fezes de animais, no mesmo meio com suplemento, foi avaliada por Wang e col. (18) e por Luechtfeld e col. (9), respectivamente. Ambos concluíram que a atmosfera composta de 5% de O₂, 8% de CO₂ e 87% de N₂ oferece melhor condição para o isolamento destas bactérias.

Da mesma forma que Megraud e Latrille (10) e Wang e col. (18), encontramos que a detecção de *Campylobacter* a partir de fezes de portadores normais, incubadas em jarra com vela, era inferior àquela obtida quando uma atmosfera de microaerofilia estrita é utilizada. Dos 11 casos positivos que não foram diagnosticados com o meio SKM, 8 correspondiam a portadores normais; isto explicaria as diferenças observadas nos meios. Considerando a elevada concordância encontrada (97,4%) e que não houve diferença significante entre os meios, concluímos que o meio SKM incubado em jarra com vela pode ser utilizado na pesquisa de *Campylobacter* em pacientes com diarréia, nos quais estes microrganismos são excretados em grande quantidade (10^6 - 10^9 bactérias/g de fezes) (10).

O exame direto das fezes, como elemento inicial no diagnóstico das infecções intestinais foi recomendado por Koch em 1883 (11) e vários autores utilizaram-no em pacientes com diarréia por *Campylobacter* (6, 7, 11, 14). De fato, no presente trabalho, o exame direto a fresco permitiu o diagnóstico presuntivo do microrganismo em todos os casos confirmados pela cultura (sensibilidade de 100%); entretanto, formas bacterianas semelhantes a *Campylobacter* foram observadas em 9 (1,4%) das 652 culturas negativas (especificidade de 98,6%). Karmali e Fleming (7) também obtiveram uma sensibilidade de 100% no exame direto por microscopia de contraste de fase. Por outro lado, Paisley e col. (11), Sazie e Titus (14) e Ho e col. (6), verificaram que o exame direto utilizando a microscopia de campo escuro e a coloração de Gram forneciam sensibilidades mais baixas (36; 65,5 e 43,5%, respectivamente). Quanto à especificidade, alguns desses autores (6, 14) obtiveram resultados semelhantes aos nossos (95 e 99,4%, respectivamente).

O valor preditivo do exame direto obtido em

Tabela 3 – Freqüência de isolamento de espécies termotolerantes de *Campylobacter* em 706 coproculturas de crianças normais e com diarréia.

Crianças	isolamento (nº)			% de positividade
	positivo	negativo	total	
Normais	14	190	204	6,9*
Com diarréia	40	462	442	9,0*
Total	54	652	706	7,6

* p > 0,01

Tabela 4 – Freqüência de isolamento de *C. jejuni* e *C. coli* em 54 crianças com coprocultura positiva para *Campylobacter*.

Crianças	Coprocultura positiva	Isolamento		Nº	%
		<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>		
Normais	14	10	71,4	4	28,6
Com diarréia	40	29	72,5	11	27,5
Total:	54	39	72,2	15	27,8

nossa casuística (85,7%) foi superior aos encontrados por Ho & col. (80%) (6) e Paisley & col. (62%) (11).

Paisley & col. (11) também encontraram casos falsos positivos e concordando com eles, acreditamos que a presença de microrganismos de morfologia e motilidade semelhante às das espécies termotolerantes de *Campylobacter*, tenham originado este resultado. Este seria o caso de outras espécies de *Campylobacter*, que mesmo sendo visualizadas no exame direto não poderiam ser recuperadas nas culturas pela incapacidade de se desenvolverem à temperatura de incubação empregada para a cultura das espécies termotolerantes (42°C-43°C) ou por serem inibidas pela cefalotina contida no meio SKM (12).

Não houve diferença significante entre as freqüências de isolamento de *Campylobacter* das crianças normais (6,9%) e com diarréia (9%). Este é um fenômeno comumente observado nos países em desenvolvimento e que parece estar estreitamente relacionado com os mecanismos de defesa do hospedeiro (1, 4).

C. jejuni foi isolado em 71,4% e em 72,5% das crianças normais e diarréicas, respectivamente. Nos países desenvolvidos *C. coli* é isolado em não mais de 5% dos casos de diarréia por estes agentes (8). No nosso trabalho, bem como naqueles realizados em outros países em desenvolvimento (5), este microrganismo foi isolado em mais de 20% das crianças estudadas. Este fenômeno poderia estar condicionado à existência de um maior contato com animais, possíveis reservatórios naturais desta bactéria (17).

Dos resultados obtidos, podemos concluir que as espécies termotolerantes de *Campylobacter* são bactérias freqüentes no nosso meio, sendo o exame direto das fezes um método fácil e útil para estabelecer um diagnóstico presuntivo, enquanto que a pesquisa pode ser facilitada incorporando à rotina da coprocultura a utilização do meio SKM incubado em jarra com vela.

SUMMARY

Comparison of two culture media and value of direct microscopic examination for the diagnosis of the intestinal infection due to *Campylobacter jejuni/coli*

Having in mind the selection of a simple and inexpensive methodology we evaluated the performance of Butzler (BU) and Modified Skirrow

Media (SKM), as well as direct microscopic examination, for the diagnosis of the intestinal infection due to *C. jejuni/coli*.

From 706 fecal samples seeded on BU and SKM we isolated 54 (7,6%) strains of *Campylobacter*.

Forty seven were isolated on BU, 43 on SKM and 36 on both media simultaneously with 97,4% of concordance.

Direct microscopic examination (phase contrast microscopy) allowed a presumptive diagnosis in all the cases with positive culture. No false negative cases were found but 9 (1,4%) false positive cases were observed. The predictive value of this examination procedure was 85,7%.

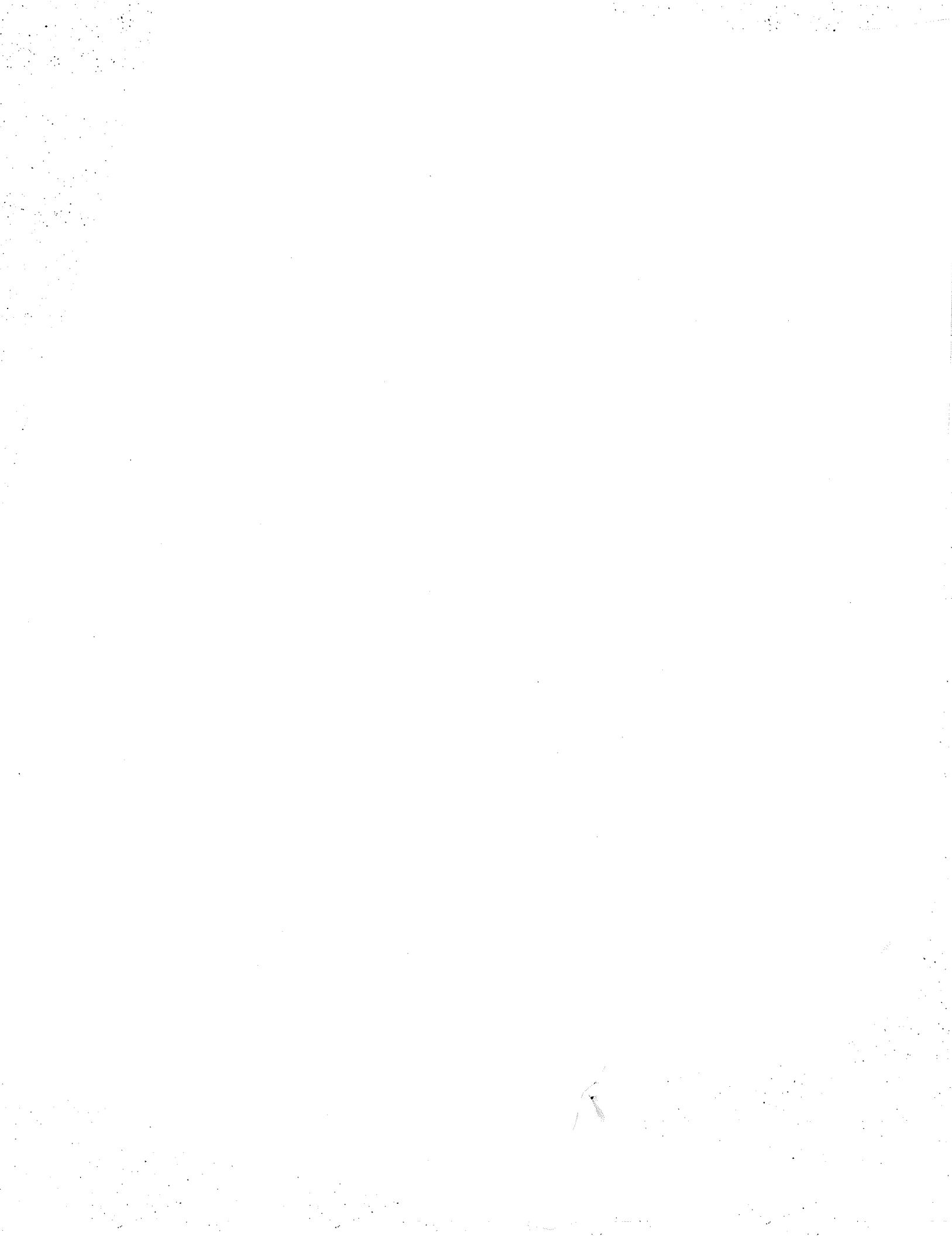
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Blaser, M.J. - Immunity to *Campylobacter jejuni*. Clin.Immunol.News. 8:145-147, 1987.
- Blaser, M.J.; Taylor, D.N. & Feldman, R.A. - Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections. Epidemiol. Rev., 5:157-176, 1983.
- Butzler, J.P. & Skirrow, M.B. - *Campylobacter enteritis*. Clin.Gastroenterol. 8:737-765, 1979.
- Fernández, H. & Pigueroa, G. - *Campylobacter* gastroenteríticos: bacteriología, epidemiología y patogenia. Adel. Microbiol. Enf. Infect. 6:1-26, 1987.
- Georges-Corbout, M.C.; Baya, C.; Beraud, A.M.; Meunier, D.M.Y. & Georges, A.J. - Distribution and serotypes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in enteric *Campylobacter* strains isolated from children in the Central African Republic. J. Clin. Microbiol., 23:592-594, 1986.
- Ho, D.D.; Ault, M.J., Ault, M.A. & Murata, G.H. - *Campylobacter* enteritis. Early diagnosis with gram's stain. Arch.Intern.Med., 142:1858-1860, 1982.
- Karmali, M.A. & Fleming, P.C. - *Campylobacter enteritis* in children. J. Pediatr., 94:527-533, 1979.
- Karmali, M.A.; Penner, J.L.; Fleming, P.C.; Williams, A. & Hennessy, J.N. - The serotype and biotype distribution of clinical isolates of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* over a three-year period. J. Infect. Dis., 147:243-246, 1983.
- Luechtefeld, N.W.; Reller, L.B.; Blaser, M.J. & Wang, W.L. - Comparisson of atmospheres of incubation for primary isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* from animal species: 5% oxygen versus candle jar. J. Clin. Microbiol. 15:53-57, 1982.
- Mcgraud, F. & Latrille, J. *Campylobacter jejuni* em patologie humaine. II. Diagnostic biologique et épidemiologie. Path. Biol. 29:305-314, 1981.
- Paisley, J.W.; Mirret, S.; Lauer, B.A.; Roe, M. & Reller, L.B. - Darkfield microscopy of human feces for presumptive diagnosis of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* enteritis. J. Clin. Microbiol. 15:61-63, 1982.
- Penner, J.L. - The genus *Campylobacter*: a decade of

- progress. Clin. Microbiol. Rev. 1:157-172, 1988.
- 13. Sack, R.B.; Tilton, R.C. & Weissfeld, A.S. – Laboratory diagnosis of bacterial diarrhea. In: Rubin, S.J. ed. CUMITECH 12. American Society for Microbiology, Washington, D.C., p. 1-12, 1980.
 - 14. Sazie, E.S.M. & Titus, A.E. – Rapid diagnosis of *Campylobacter enteritis*. Ann. Int. Med., 96:62-63, 1982.
 - 15. Siegel, S. – Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta. México, Trillas, p. 346, 1975.
 - 16. Skirrow, M.B. & Benjamin, J. – Differentiation of enteropathogenic *Campylobacter*. J. Clin. Pathol. 33:122, 1980.
 - 17. Skirrow, M.B. & Benjamin, J. "1001" Campylobacters:

18. Cultural characteristics of intestinal campylobacters from man and animals. J. Hyg. (Lond.) 85:427-442, 1980.
Wang, W.L.L.; Luechtfeld, N.W.; Blaser, M.J. & Reiler, L.B. – Comparisson of Campypak II with standard 5% oxygen and candle jars for growth of *Campylobacter jejuni* from human feces. J. Clin. Microbiol. 16: 291-294, 1982.

Recebido para publicação em 12/6/89.



SOBREVIVÊNCIA DE *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* BV *PHASEOLI* EM SEMENTES TRATADAS COM FUNGICIDAS

Regina Teresa Rosim Monteiro¹

Amália Baraibar¹

Siu Mui Tsai¹

RESUMO

A sobrevivência de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* em sementes de feijão, tratadas com benomil, PCNB e thiram foi determinada em laboratório, utilizando-se de técnica de contagem por diluição e plaqueamento e da atividade da nitrogenase em plantas de feijoeiro cultivadas em vasos de Leonard. Verificou-se também o efeito do uso de concentrações mais elevadas de *Rhizobium* na semente (5×10^6 e 5×10^8 células x semente⁻¹), além da recomendada de 5×10^4 células x semente⁻¹, como alternativa para garantir uma nodulação adequada. As duas estirpes utilizadas (CM-01 e CM-34) diferiam entre si na resposta à toxicidade dos fungicidas, sendo o período de armazenamento do inóculo em contato com o fungicida importante para a resposta a essa toxicidade. A concentração de 5×10^8 céls x semente⁻¹ permitiu que as estirpes superassesem a toxicidade dos produtos quanto à sobrevivência, número de nódulos e atividade da nitrogenase, com exceção de thiram que inibiu a atividade dos nódulos formados pela estirpe CM-34.

INTRODUÇÃO

Algumas das principais moléstias do feijoeiro são disseminadas pela semente. A semente escolhida e tratada com biocida representa um papel importante no sucesso da cultura (4). Estudos sobre a biota fúngica de sementes de feijão dos cultivares mais plantados no Estado de São Paulo, Paraná e Goiás foram feitos por Lasca (10) e recomendações do tratamento com fungicidas das sementes de feijoeiro são citadas por Mendes (14). Singh et al. (18), em trabalho para avaliação de pré-tratamento de sementes de soja com fungicidas observaram que todas as combinações de tratamentos com fungicidas aumentaram significamente a germinação de sementes e diminuíram também a taxa de mortalidade de plântulas.

As recomendações de tratamento com fungicidas em sementes de leguminosas enfrentam uma série problemática, quando se pretende inocular sementes com *Rhizobium* (bactéria fixadora de nitrogênio). Graham et al. (6) estudaram a sobrevivência de oito estirpes de *R. phaseoli* na presença de captan, PCNB e thiram, observando que todos os produtos provocaram uma diminuição do número de células viáveis por semente.

A utilização de fungicidas pode afetar também a nodulação e a fixação de nitrogênio em leguminosas, como mostra os estudos de Curley & Burton (3), Graham et al. (6) e Rennie (17). A influência, no crescimento e na atividade respiratória de quatro diferentes estirpes de rizóbio, dos fungicidas PCNB, metalaxil/mamcozeb e do herbicida trifluralina, foi estudada por Ortiz et al. (15).

¹ Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Av. Centenário, 303 – Caixa Postal 96, 13400 Piracicaba SP, Brasil

Uma revisão recente e mais completa sobre o efeito de fungicidas, inseticidas e herbicidas sobre a simbiose rizóbio-leguminosas pode ser encontrada em De-Polli (5) e Lal (9).

Em vista do exposto, o presente trabalho teve como objetivo principal avaliar a sobrevivência na semente e a capacidade simbótica de duas estípites de *Rhizobium leguminosarum* by *phaseoli* em planta de feijoeiro, na presença dos fungicidas, benomil, PCNB e thiram, utilizando taxas de inoculação de *Rhizobium* acima da recomendada para essa cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Tratamento de sementes – Sementes de feijão cultivar Carioca-80, previamente esterilizadas com sublimado corrosivo ($Hg Cl_2$ a 0,05% p/v), foram tratadas a seco com os fungicidas benomil (benomil 50%) PCNB (pentaclorinitrobenzeno 75%) e thiram (thiram 75%), a uma concentração de 0,2% p/p, do produto ativo por kg da semente. As sementes foram tratadas em sacos plásticos individuais, onde foram adicionadas quantidades apropriadas de cada fungicida e misturadas por agitação manual vigorosa. Após o tratamento as sementes foram estocadas à temperatura ambiente por uma semana.

Preparo do inoculante – Foram utilizadas duas estípites de *Rhizobium leguminosarum* by *phaseoli*, CM-01 e CM-34 do laboratório de Microbiologia do Solo do CENA, as quais são normalmente utilizadas em inoculantes comerciais para feijão. As estípites foram cultivadas em meio líquido contendo extrato de levedura e manitol (YMB), com agitação constante à 28-30°C, durante quatro dias. As contagens por plaqueamento mostraram que o número de células para as duas estípites eram semelhantes ($5,5 \times 10^9$ células $\times ml^{-1}$ para CM-01 e $5,6 \times 10^9$ células $\times ml^{-1}$ para CM-34) partindo desta suspensão foram feitas diluições para 5×10^6 e 5×10^4 células $\times ml^{-1}$. Foi utilizado com suporte turfa comercial seca, moída, neutralizada a pH 6,8 e acondicionada em saco plástico de 200g, irradiada a 5 Mrad em, fonte de Cobalto-60. Cada suspensão de bactérias foi injetada asepticamente, dentro dos sacos plásticos, através de seringas em proporção de 40% v/v, misturadas depois manualmente.

Inoculação das sementes – Sementes tratadas com os fungicidas e sementes não tratadas

(controle) foram inoculadas com uma pasta homogênea de turfa e inoculante nas concentrações de 5×10^4 , 5×10^6 e 5×10^8 x semente $^{-1}$. A dose de inoculação foi a recomendada de 5g de inoculante por kg de semente, umidecida com solução adesiva de sacarose a 10%, p/v.

Avaliação da sobrevivência – A sobrevivência das estípites nas sementes tratadas foi primeiramente avaliada em placa contendo meio sólido de YMA, pela técnica de diluição e plaqueamento. Duas réplicas para cada tratamento (fungicida) e para cada concentração do inóculo 5×10^4 , 5×10^6 e 5×10^8 células x semente $^{-1}$ foram plaqueadas imediatamente (tempo zero) e 24 horas após a inoculação das sementes. Uma subamostra de 100 sementes foi tirada de cada lote de 200 g de sementes tratadas, diluídas em 100 ml de salina (0,85% g NaCl x v $^{-1}$), fortemente agitada por 20 min e posteriormente diluídas em série de 9 ml de salina, plaqueando-se 0,1 ml do inóculo de cada diluição. A contagem das colônias foi realizada após incubação a 28°C por 5 dias.

Avaliação da atividade da nitrogenase – A eficiência das duas estípites na presença do fungicida foi avaliada em casa de vegetação, plantando as sementes tratadas e inoculadas nas três concentrações empregadas. Quatro sementes de cada tratamento, após 24 horas de contato do inoculante com o fungicida, foram semeadas em vaso de Leonard; após a germinação, foi feito o desbaste deixando somente duas plantas por vaso. Sementes não tratadas, porém inoculadas, serviram como controle. Foram feitas seis repetições para cada tratamento. Os vasos foram mantidos úmidos com solução nutritiva de McKnight modificada (1). A colheita foi feita aos 45 dias após sementeira, separando-se a parte aérea das raízes ao nível do colo da planta. O sistema total de raiz com seus nódulos, foi colocado em frascos de 250 ml de capacidade para determinação da atividade da nitrogenase pela técnica de redução do acetileno (7).

Análise estatística – Os dados foram analisados através de análise de variância fatorial e Teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sobrevivência de ambas estípites inoculadas, foi afetada por benomil e thiram, mas não por

Quadro 1 – Sobrevida de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* em sementes de feijão em função do tratamento com fungicidas e tempo de contacto Médias de 12 leituras em placas.

Semente	Sobrevida 0 h	(LOG nº cels. x semente ⁻¹) 24 h	média
controle	5,45 a	4,47 a	4,96 A
benomil	4,36 b	3,18 b	3,37 C
PCNB	5,05 a	4,45 a	4,75 A
thiram	5,20 a	3,50 b	4,35 B
Média	5,02 X	3,90 Y	
C. V. 9,9%			

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo Teste de Tukey.

PCNB, que não diferiu significativamente do controle no tempo zero ou após 24 horas de contato fo inoculante com o fungicida (Quadro 1). Benomil mostrou ser o fungicida de maior toxidez sobre estas estirpes, sendo tóxico no contato imediato com a bactéria (tempo zero), enquanto que thiram mostrou toxidez após 24 horas e PCNB não teve efeito a zero ou após 24 horas. Após 24 horas a taxa de sobrevida do *Rhizobium*, de um modo geral, diminui em um fator de 10; portanto, o armazenamento de sementes, tratadas com fungicidas, exceto para PCNB, pode acarretar uma baixa viabilidade do inóculo.

A Figura 1, mostra a média de sobrevida nas sementes tratadas com fungicidas, nas três concentrações do inoculante, no tempo zero e 24 horas, das estirpes CM-01 e CM-34. Tomando como base a sobrevida do inóculo no controle, na dose recomendada para inoculação de sementes ($C_1 = 5 \times 10^4$ células x semente⁻¹); nota-se que benomil e thiram diminuíram a sobrevida de ambas estirpes. PCNB diminui de certa forma a sobrevida da estirpe CM-34. Com relação às diferentes concentrações do inóculo a estirpe CM-34 sofreu maior efeito dos fungicidas. Elevando-se a concentração de 5×10^4 para 5×10^6 células x semente⁻¹, nota-se um melhoria na sobrevida de ambas estirpes. Na concentração máxima (5×10^8 células x semente⁻¹) as duas estirpes apresen-

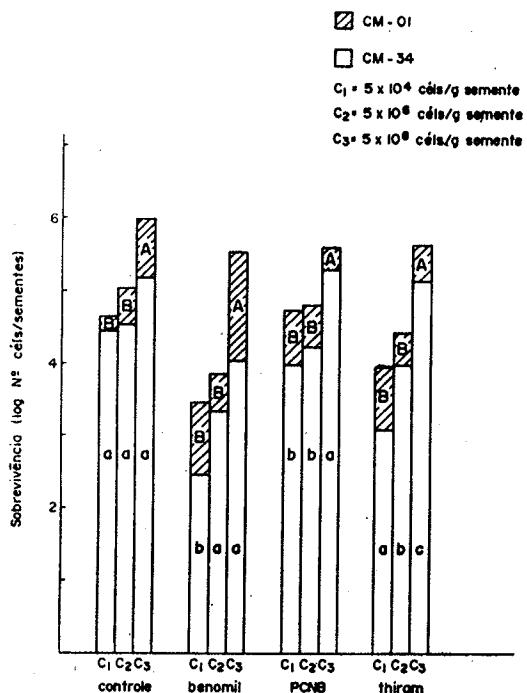


Figura 1 - Efeito da concentração do inóculo na sobrevida das estirpes CM-01 e CM-34 em sementes tratadas com fungicidas. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste de Tukey, dentro de cada tratamento. Letras minúsculas referem-se a estirpe CM-34 e maiúsculas a estirpe CM-01.

taram maior número de células x semente⁻¹ a uma taxa acima das recomendadas para inoculante comerciais.

O efeito dos fungicidas na nodulação das plantas de feijoeiro (Quadro 2), apresentou um contraste marcante entre as duas estirpes. A formação de nódulos e consequentemente, a atividade de nitrogenase da estirpe CM-34, nas concentrações de 5×10^4 e 5×10^6 células x semente⁻¹, foi completamente inibida na presença dos fungicidas, enquanto que CM-01 foi fracamente inibida por Benomil e thiram. A concentração de 5×10^8 células x semente⁻¹ permitiu a recuperação das duas estirpes, alcançando respostas semelhantes ao controle na concentração recomendada, com exceção para thiram que se mostrou altamente tóxico para CM-34 e medianamente tóxico para CM-01.

Quadro 2– Nodulação e atividade de nitrogenase de estripes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* em sementes tratadas com fungicidas, em função da concentração do inóculo inicial, avaliadas em plantas de feijociro aos 45 dias (médias de 6 repetições).

Tratamento concentração	Nodulação					
	Nº nódulos x pl ⁻¹		ARA (nmol. C ₂ H ₄ x pl ⁻¹)			
	CM-34	CM-01	CM-34	% inib.	CM-01	% inib.
controle	C ₁	4,8	18,6	152	0,0	150
	C ₂	4,0	19,0	164	0,0	529
	C ₃	39,6	67,3	646	0,0	2677
benomil	C ₁	0,0	4,3	0	100,0	114
	C ₂	0,0	25,3	0	100,0	381
	C ₃	12,7	31,8	590	8,7	950
PCNB	C ₁	0,0	4,8	0	100,0	129
	C ₂	0,0	34,8	0	100,0	623
	C ₃	20,3	53,8	501	22,4	2364
THIRAM	C ₁	0,0	0,0	0	100,0	0
	C ₂	0,0	0,9	0	100,0	128
	C ₃	4,6	33,8	0	100,0	464

C. V. = 68,5%

Abreviações: C₁ = 5 x 10⁴ células x semente⁻¹

C₂ = 5 x 10⁶ células x semente⁻¹

C₃ = 5 x 10⁸ células x semente⁻¹

pl = planta;

Ara = Atividade da redução do acetileno

Inib. = Inibição em relação ao controle.

Diferenças no comportamento entre diferentes estripes e espécies de *Rhizobium* podem ser observadas em trabalhos de literatura. Graham et al. (6) encontraram que PCNB, thiram e captan reduziram a sobrevivência de *R. phaseoli* na contagem em placas e em plantas de feijão no campo, quando o plantio foi feito após 24 horas da inoculação, mas não sofreram redução quando foram imediatamente semeadas.

PCNB mostrou ser inóculo para *R. japonicum* nos trabalhos de Chamber & Montes (2), Mallik & Tesfai (12) e Ostiz et al. (15). Entretanto, esse fungicida mostrou-se tóxico para *R. japonicum* tanto na sobrevivência quanto nodulação (3). Esses desacordos entre resultados são principalmente devidos à variação considerável que existe entre as estripes e espécies de *Rhizobium* (12).

A estirpe CM-01 mostrou-se superior a CM-34 em todos os tratamentos estudados, quanto à sobrevivência, nodulação e atividade da nitrogenase. Esta superioridade pode ser explicada pela característica da alta resistência (14) e de CM-01 aos fungicidas thiram (200ppm) e benomil (> 1000ppm), quando comparada com CM-34, que possui baixa resistência à thiram (30ppm) e benomil (1000ppm) (1). Lennox & Alexander (11) e Ramirez & Alexander (16), demonstraram que a resistência a thiram introduzida em *R. phaseoli* inoculadas em semente de feijão, causou um aumento substancial do peso e nitrogênio total do feijoeiro. A mesma espécie, resistente a captam, foi estudada e sua superioridade na fixação de N₂, comprovada por Rennie (17) e Kucey & Bonetti (8).

SUMMARY

Survival of *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* on fungicide treated seed

The survival of *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* on bean seeds treat with benomyl, PCNB or thiram was measured under laboratory using standard serial dilution and plate count techniques and greenhouse conditions, using bean plants, grown in Leonard jars. Three concentration rates of rhizobia (recommended) rate 5×10^4 and two superior rates of 5×10^6 and 5×10^8 cells x seed $^{-1}$ were applied to the seeds, as an alternative way to secure a proper nodulation in the presence of the biocides. The contact with benomyl or thiram on seeds reduced *Rhizobium* survival, while PCNB had little effect. The fungicide toxicity level was different for both strains utilized in the present study, and the time of contact (zero or 24 hours), after application of the fungicides showed to be very important. With 5×10^4 and 5×10^6 cells x seed $^{-1}$, strain CM-34 had its nodulation completely inhibited by all fungicides, while strains CM-01 had a marked reduction nodulation in the presence of benomyl and thiram. The concentration of 5×10^8 cells x seed $^{-1}$, allowed the strains to overcome the fungicide effects on survival, nodule number and nitrogenase activity, except for strain CM-34 which showed no-active nodules in contact with thiram.

AGRADECIMENTOS

As autoras agradecem ao Dr. Roberto Bonetti pela colaboração na análise estatística e composição dos gráficos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Baraibar, A. - Caracterização e seleção de *Rhizobium phaseoli* para a produção de inoculantes comerciais. Piracicaba, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1986, 169p. (Tese de Mestrado).
2. Chamber, M.A. & Montes, F.J. - Effects of some seed disinfectants and methods of rhizobial inoculation on soybeans (*Glycine max* (L.) Merr.). *Plant Soil*, 65:353-360, 1982.
3. Curley, R.L. & Burton, J.C. - Compatibility of *Rhizobium japonicum* with chemical protectants. *Agron. J.*, 67:807-808, 1975.
4. Defesa do feijão deve começar pela Desinfecção da Semente. *Agricultura e Pecuária* (R.J.) 53:34-40, 1968.
5. De-Polli, H.; Souto, S.M. & Franco, A.A. - Compatibilidade de Agrotóxicos com *Rhizobium* spp. e a Simbiose das Leguminosas. EMBRAPA - UAPNPBS (Seropédica - RJ), 1986. 75p.
6. Graham, P.H.; Ocampo, G.; Ruiz, L.D. & Duque, A. - Survival of *Rhizobium phaseoli* in contact with chemical seed protectants. *Agron. J.*, 72:625-627, 1980.
7. Hardy, R.W.F.; Holsten, R.D.; Jackson, E.K. & Burns, R.C. - acetylene-ethylene assay for N₂-fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.*, 43:1183-1207, 1968.
8. Kucey, R.M.M. & Bonetti, R. - Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and captan on growth and N₂-fixation by *Rhizobium* inoculated field beans. *Can. J. Soil Sci.*, 68:143-149, 1988.
9. Lal, S. - Effects of pesticides on Rhizobium-Legume symbiosis. In: Lal, R. & Lal, S. ed. *Pesticide and Nitrogen Cycle*. Flórida, CRC Press, 1988. Vol. III, p.47-128.
10. Lasca, C.C. - Estudos sobre a flora fúngica de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). *O Biológico*, 44:125-134, 1978.
11. Lenox, L.B. & Alexander, M. - Fungicide enhancement of nitrogen fixation and colonization of *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium phaseoli*. *Appl. Env. Microbiol.*, 41:404-441, 1981.
12. Mallik, A.B. & Tesfai, K. - Compatibility of *Rhizobium japonicum* with commercial pesticides in vitro. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 31:432-437, 1983.
13. Mendes, J.E.S. - Manual Técnico: Cultura do feijão. EMBRATER (Brasília), 1979. 55p.
14. Odeyemi, O. & Alexander, M. - Use of fungicide resistant rhizobia for legume inoculation. *Soil Biol. Biochem.*, 9:247-251, 1977.
15. Ostiz, S.B.; Musumeci, M.R. & Tsai, S.M. - Efeito de alguns agrotóxicos na sobrevivência e na atividade respiratória de *Rhizobium leguminosarum* e *Bradyrhizobium japonicum*. *Pesq. agropec. bras.*, 24:663-667, 1989.
16. Ramirez, C. & Alexander, M. - Evidence suggesting protozoan predation on Rhizobium associated with germinating seeds and in the rhizosphere of beans *Phaseolus vulgaris* L. *Appl. Env. Microbiol.*, 40:492-499, 1980.
17. Rennie, J.R. - Selection for captan tolerance in the *Rhizobium phaseoli* - *Phaseolus vulgaris* L. N-fixing symbiosis. *Can. J. Soil. Sci.*, 66:143-150, 1986.
18. Singh, S.D.N.; Srivastava, S.K. & Agarwal, S.C. - Viability and germination of soybean seeds in relation to pretreatment with fungicides, period of storage and type of storage container. *Trop. Agric.*, 65:106-108, 1988.

Recebido para publicação em 2/8/89



SUCESSÃO FÚNGICA EM FOLHAS DE *QUERCUS ROBUR* L. (CARVALHO)
SUBMERSAS EM UM LAGO SITUADO NO MUNICÍPIO DE ITAPECERICA DA
SERRA, SP

Iracema Helena Schoenlein-Crusius¹
Carmen Lidia Amorim Pires¹
Adauto Ivo Milanez¹

RESUMO

A finalidade deste estudo preliminar foi comparar a micota autóctone em folhas de *Quercus robur* imersas em condições de clima tropical com a de clima temperado; verificar a presença de fungos zoospóricos na sucessão fúngica e comparar esse tipo de micota encontrada nas folhas e na água. Folhas recém-caídas de *Quercus robur* L. foram colocadas em sacos de tela de náilon (20x10cm x1mm) e submersas em um lago situado no município de Itapecerica da Serra, SP. Mensalmente, de janeiro a junho de 1988, foram coletadas amostras de folhas e de água para o isolamento dos fungos utilizando-se: lavagem de discos de folhas e plaqueamento das mesmas em meio de batata-dextrose-ágar e meio de maltose pentosada; observação direta de folhas incubadas em água destilada esterilizada; iscagem com palha de milho, celofane, ecdise de cobra, exoesqueleto de camarão, grãos de pólen, fios de cabelos, sementes de cânhamo e de sorgo. As placas de Petri foram mantidas em temperatura ambiente (25-30°C) e após sete dias realizou-se a contagem do número de unidades formadoras de colônias. Os fungos presentes nas amostras de água foram isolados com as mesmas técnicas utilizadas para os discos de folhas. Foram isolados 36 táxons, sendo 8 fungos zoospóricos, 8 Hyphomycetes aquáticos, 17 Hyphomycetes terrestres e 3 Zygomycetes. Fungos considerados terrestres diferentes dos autóctones foram isolados nas folhas mesmo após meses de submersão. Hyphomycetes aquáticos colonizaram o substrato após o segundo mês de submersão, enquanto os fungos zoospóricos foram observados principalmente após o terceiro mês de decomposição. A maioria dos fungos zoospóricos isolados nos discos de folhas também foi observada nas amostras de água.

INTRODUÇÃO

As folhas representam a maior fração de matéria orgânica alóctone incorporada nos ambientes aquáticos (17). Quando são colonizadas por fungos decompisitores podem ter a sua palatabilidade aumentada, facilitando a ação dos detritívoros. Além disto, se constituem em impor-

tante fonte de inóculo e alimento para o ecossistema (3). No Brasil, o primeiro estudo de sucessão fúngica na água foi realizado em folhas submersas de *Ficus microcarpa* em um lago situado no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga em São Paulo. A micota autóctone presente nas folhas recém-caídas resistiram durante muito tempo na água. Fungos considerados típicos de solo e de folhas

¹ Instituto de Botânica, Seção de Micologia e Lichenologia, Caixa Postal 4005, 01051 São Paulo SP, Brasil

foram isolados no substrato, meses após a submersão (22). Estes resultados corroboraram as afirmações de que os corpos d'água possuem um grande potencial de inóculo necessário para a decomposição de matéria orgânica alóctone (7, 35), podendo até conter fungos terrestres incorporados ao ambiente aquático por meio de chuvas e substratos vegetais (19).

As folhas de *Quercus* spp., geralmente muito abundantes em regiões de clima temperado, têm sido comumente empregadas em estudos relativos à ciclagem de nutrientes e composição química (30); em ensaios sobre a capacidade enzimática de fungos que as decompõem (29); quanto à influência da sua colonização por fungos sobre a atividade detritívora de determinados animais (1, 2, 3) e em levantamentos de fungos de filoplano em regiões mediterrâneas (33).

Os objetivos deste estudo foram:

- comparar a micota autóctone presente em folhas de espécie exótica imersas em condições de clima tropical com aquela em clima temperado;
- verificar a presença de fungos zoospóricos na sucessão fúngica;
- comparar as micotas de fungos zoospóricos do substrato com a da água.

MATERIAIS E MÉTODOS

O local de estudo foi um lago artificial com uma área de aproximadamente 7.000m² e 2 a 5m de profundidade, temperatura da água de 17 a 24°C e pH médio de 6 a 7, situado em uma reserva particular localizada no município de Itapecerica da Serra, SP. As folhas provieram de um exemplar de *Quercus robur* L. com aproximadamente 25 anos, 25 a 30m de altura e diâmetro do tronco de 40 a 50cm na altura do peito. Em janeiro de 1988 foram coletadas em torno de 100 folhas de carvalho recém-caídas em coletores de plástico sob a árvore. Quinze amostras com 5 folhas secas ao ar livre foram colocadas em sacos de tela de náilon de 10x20cm e 1mm de diâmetro.

No lago foram escolhidos 3 pontos de coleta, sendo que cada um recebeu 5 sacos de tela de náilon contendo folhas de *Quercus robur* L., amarrados com fio de náilon e dispostos a uma profundidade mínima de 20cm.

Mensalmente, coletaram-se três sacos de folhas, um de cada ponto de coleta. No laboratório, as folhas foram retiradas dos sacos, sendo que

algumas foram submetidas à técnica de lavagem de discos de folhas (20), que elimina os propágulos aderidos à lâmina foliar, seguida de incubação em meios de cultura comumente utilizados para os fungos terrestres como batata-dextrose-ágar (8, 11) e maltose pentosada (6) utilizada para alguns fungos zoospóricos. Aproximadamente 20 discos de folhas lavados foram incubados em água destilada esterilizada com diversas iscas como palha de milho, celofane, ecdise de cobra, exoesqueleto de camarão, grãos de pólen, fios de cabos, sementes de cânhamo (*Cannabis sativa* L.), (18) e de sorgo (*Sorghum*), substratos comumente utilizadas para o isolamento de fungos zoospóricos. Três a quatro folhas inteiras, não lavadas, também foram incubadas em água destilada esterilizada com os mesmos substratos para o isolamento dos fungos zoospóricos e utilizadas para a observação direta do desenvolvimento de Hyphomycetes aquáticos na superfície foliar. Fungos zoospóricos presentes nas amostras de água de todos os pontos de coleta foram isolados com os mesmos substratos que os discos de folhas de carvalho e as folhas inteiras. As colônias foram isoladas em meio de batata-dextrose-ágar e de maltose pentosada e identificadas, sempre que possível, à nível de espécie com auxílio de literatura pertinente (4, 5, 9, 15, 16, 23, 26). O número total de colônias observadas nos discos de folhas foi estabelecido mensalmente para cada ponto de coleta.

RESULTADOS

O experimento foi conduzido durante 6 meses, de janeiro a junho de 1988, quando então as folhas já se encontravam em avançado grau de decomposição.

Não foram verificadas grandes diferenças entre a quantidade e variabilidade dos fungos isolados de folhas submersas nos três locais de coleta. Deste modo os fungos isolados naqueles locais foram estudados em conjunto.

Foram isolados 36 táxons, sendo que 8 foram fungos zoospóricos, 8 Hyphomycetes aquáticos, 17 Hyphomycetes terrestres e 3 Zygomycetes. Na Tabela 1 foram ordenados os fungos isolados neste experimento, que constituíram a sucessão fúngica.

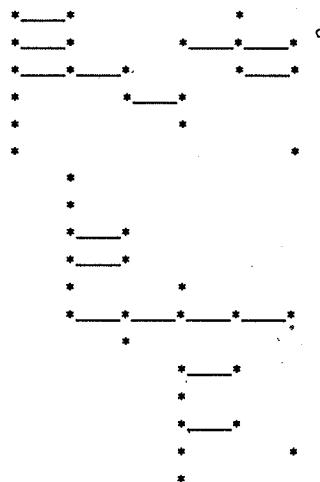
Nas folhas recém coletadas, antes da submersão foram isolados *Epicoccum nigrum*, *Fusarium semitectum*, *Trichoderma viride*, *Penicillium frequentans*, *Mucor hiemalis*, *Aspergillus flavus* e

Tabela 1 – Distribuição mensal dos táxons na sucessão de fungos em folhas de *Quercus robur* L. submersas em um lago no município de Itapecerica da Serra, SP, no período de janeiro a junho de 1988.

Símbolo: * ocorrência do táxon.

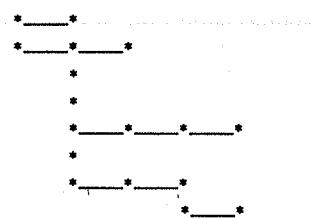
Hymenomycetes terrestres

- Epicoccum nigrum* Link
- Fusarium semitectum* Berk & Rov
- Trichoderma viride* Pers: Gray
- Penicillium* sp.
- Aspergillus flavus* Link
- Alternaria alternata* (Fr)Keissl
- Diplococcum* sp.
- Paecilomyces coleopterum* Samson & Evans
- Aspergillus niger* v.Tieghem
- Fusarium uduim* Butler
- Pestalotia* sp.
- Verticillium* sp.
- Cephalosporium* sp.
- Cladosporium olivaceum* (Pers) Link
- Monocillium* sp.
- Penicillium frequentans* Westling
- Tilachlidium* sp.
- Curvularia* sp.



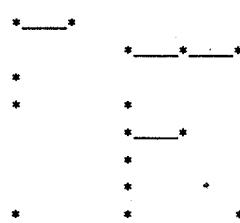
Hymenomycetes aquáticos

- Lemonniera aquatica* Wild
- Tetrachaetum elegans* Ingold
- Isthmotrichia cladia* sp.
- Lunulospora curvula* Ingold
- Trichodochium* sp.
- Triscelophorus magnificus* Petersen
- Triscelophorus monosporus* Ingold
- Camposporium pellucidum* Ingold



Oomycetes, Chytridiomycetes e Hypochytridiomycetes

- Achlya* sp.
- Achlya prolifera* C.G.Nees
- Diplophlyctis sarcoptoides* (H.E.Petersen) Dogma
- Cladochytrium replicatum* Karling
- Nowakowskia elegans* (Nowak) Schroeter
- Rhizoplyctis* sp. (?)
- Rhizidiomyces* sp.
- Pythium* sp.



Zygomycetes

- Mucor hiemalis* Wehmeyer
- Zygorrhynchus moelleri* Vuillemin
- Mucor circinelloides* v.Tieghem

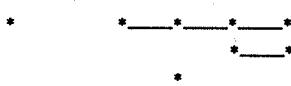


Tabela 2 – Número de colônias em 15 placas de petri contendo discos de folhas de *Quercus robur* L. submersas, de janeiro a junho de 1988.

Símbolos: BDA = meio de batata-dextrose-ágar; MP-5 = meio de maltose pentosada.

meses 1988	número total de colônias	
	BDA	MP-5
fevereiro	87	78
março	104	78
abril	27	24
maio	36	37
junho	5	5

Alternaria alternata, perfazendo 7 táxons. Os quatro primeiros foram isolados durante vários meses de decomposição e os três últimos ocorreram apenas esporadicamente no substrato submerso.

Em fevereiro, o número de táxons isolados passou de 7 para 15, já sendo observada a colonização do substrato por fungos tipicamente aquáticos como *Achlya* sp., *Diplophlyctis sarcoptoides*, *Cladocytrium replicatum*, *Pythium* sp., *Lemon-*

niera aquatica e *Tetrachaetum elegans* ao lado de fungos tipicamente terrestres como *Diplococcum* sp., *Paecilomyces coleopterum*, *Aspergillus niger*, *Fusarium udum*, *Pestalotia* sp. e *Verticillium* sp.

Após um mês o número de táxons isolados permaneceu o mesmo, no entanto foi isolado um maior número de Hyphomycetes aquáticos, dentre os quais *Lemonnieria aquatica*, *Tetrachaetum elegans*, *Isthmotrichidia* sp., *Lunulospora curvula*, *Trichodochium* sp., *Triscelophorus monosporus* e *T. magnificus*.

O maior número de táxons -21- foi isolado em abril, terceiro mês de submersão das folhas. A partir deste mês surgiram *Achlya prolifera*, *Nowakowskella elegans*, *Rhyzoplyctis* sp., *Rhizidiomyces* sp., ao lado de fungos terrestres como *Cladosporium olivaceum*, *Monocillium* sp., *Penicillium frequentans*, *Tilachlidium* sp., *Curvularia* sp. e *Micor circinelloides*.

No quarto mês de decomposição foliar, foram isolados 13 táxons dentre os quais *Camposporium pellucidum* e *Zygorrhynchus moelleri* surgiram pela primeira vez.

No último mês do experimento foram isolados 12 táxons, não ocorrendo algum táxon exclusivo daquele mês.

Na Tabela 2 estão os valores da contagem do número de colônias que se desenvolveram nos discos plaqueados em meio de batata-dextrose-ágar e maltose pentosada. Verificou-se uma tendência de diminuição do número de colônias nas últimas coletas.

Tabela 3 – Distribuição mensal dos fungos zoospóricos em amostras de água coletadas em um lago no município de Itapecerica da Serra, SP, no período de janeiro a junho de 1988.

Símbolo: * ocorrência do táxon.

- Catenophlyctis variabilis* (Karling) Karling *
- Achlya* sp. *
- Achlya proliferoides* Coker *
- Achlya prolifera* C.G.Nees *
- Pythium* sp. *
- Nowakowskella elegans* (Nowak) Schroester *
- Cladocytrium replicatum* Karling *
- Diplophlyctis sarcoptoides* (H.E.Petersen) Dogma *
- Rhizidiomyces* sp. *
- Saprolegnia parasitica* Coker *

1988

Fev Mar Abr Mai Jun

Achlya sp., *Achlya prolifera*, *Diplophlyctis sarcoptoides*, *Cladochytrium replicatum*, *Nowakowskia elegans*, *Rhizidiomyces* sp. e *Pythium* foram encontrados tanto nos discos de folhas de *Quercus robur*, Tabela 1, como nas amostras de água coletadas próximas às bolsas de tela de náilon, Tabela 3. Por outro lado, *Rhizophlyctis* sp. foi observado apenas nos discos de folhas enquanto *Saprolegnia parasitica*, *Achlya proliferoides* e *Catenophlyctis variabilis* apareceram somente nas amostras de água.

DISCUSSÃO

Em regiões de clima temperado, as folhas de carvalho geralmente se decomponem totalmente ao redor de 32 semanas (30), no entanto, no presente estudo, a esqueletização da lâmina foliar foi detectada após 23 semanas.

A micota autóctone das folhas de *Quercus robur* possui representantes considerados cosmopolitas tais como, *Trichoderma viride*, *Mucor hiemalis* e *Alternaria alternata* (5). Estas espécies, juntamente com *Epicoccum*, *Fusarium* e *Penicillium* também foram encontradas em folhas coletadas em clima temperado (10, 29) e em folhas de outras espécies nos trópicos, como em *Ficus microcarpa* submersas no lago do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (22). *Monocillium* sp. e *Tilachlidium* sp. são gêneros pouco conhecidos no Brasil e merecem estudos mais aprofundados para a identificação a nível de espécie.

A micota autóctone foi considerada específica para cada tipo de folha (10, 13). Segundo Petersen & Cummins (21), isto decorre em função das diferenças bioquímicas peculiares de cada substrato; há os que discordam, afirmando que existe uma micota saprófita nas folhas, presente antes mesmo da senescência e que pode englobar espécies cosmopolitas (3, 27, 28). O sucesso da colonização das folhas antes de sua queda, oferece vantagens iniciais aos fungos pioneiros diante dos invasores oriundos do ambiente (12). Os resultados obtidos no presente estudo confirmam esta última afirmação.

Lemonniera aquatica, *Lunulospora curvula* e *Tetrachaetum elegans* foram isolados nas folhas de *Quercus robur* L. e nas de *Ficus microcarpa* em estudos anteriores (22). Em folheto coletado na Cachoeira do Altarújo e no Horto Florestal "Navarro de Andrade" no município de Rio Claro, no Recanto dos Nefelibatas na cidade de Águas de Lindóia e na Reserva Biológica no Alto da Serra

em Paranapiacaba foram observadas as mesmas espécies de Hyphomycetes aquáticos encontradas nas folhas de *Quercus robur* no presente estudo (comunicação pessoal). A partir destes resultados concluiu-se que os Hyphomycetes aquáticos observados até o presente momento no Brasil não apresentaram especificidade quanto ao substrato, concordando com as afirmações de outros autores (3, 24, 31) de que a especificidade destes fungos é baixa, apesar de sua quantidade variar conforme a velocidade de decomposição do substrato (7, 32). Na Tabela 1 observou-se que os fungos considerados típicos de solo e folha constituíram aproximadamente 50% da micota observada no substrato, tendo sido intensivamente isolados nas folhas submersas durante todo o experimento. Tal resultado pode indicar que estes representantes adaptam-se bem ao ambiente aquático, tal como foi visto anteriormente em folhas de *Ficus microcarpa* (22). Apesar do estabelecimento e resistência dos fungos considerados terrestres, cuja maioria foi isolada pela primeira vez nas folhas já submersas, os Hyphomycetes aquáticos conseguiram fixar-se no substrato a partir do segundo e terceiro mês na sucessão. O fato das folhas em decomposição não terem sido completamente colonizadas no início pelos fungos aquáticos foi concordante com os resultados obtidos por outros autores (3, 25, 35).

A técnica de lavagem de discos de folhas empregadas neste estudo foi considerada tão eficiente quanto outras técnicas seletivas que evitam o isolamento de propágulos e esporos inativos (3, 17, 30). No entanto, as técnicas culturais favorecem o isolamento dos fungos considerados terrestres, como ocorreu em folhas de *Quercus alba* e *Carya glabra* apesar do predomínio dos Hyphomycetes aquáticos nestes substratos (29).

Os fungos zoospóricos têm sido pouco reportados em estudos sobre sucessão fúngica, apesar de Newton (35) ter comprovado a sua habilidade saprofítica. A vantagem dos fungos zoospóricos em relação aos outros é a possibilidade de escolherem o substrato favorável pela mobilidade das suas unidades de dispersão (14). No presente estudo aproximadamente 25% da micota foi constituída por fungos zoospóricos, sendo observados com maior abundância após o estabelecimento dos Hyphomycetes aquáticos nas folhas (Tabela 1). Observou-se na Tabela 3, que apesar do maior número de espécies presentes na água ter sido isolada no segundo mês, nas folhas, estes fungos foram mais intensamente isolados a partir do terceiro mês de submersão, (Tabela 1). Isto

parece indicar que os fungos zoospóricos colonizam o substrato após este ter sido metabolizado pelos fungos autóctones e os Hyphomycetes aquáticos, que são fungos de colonização extremamente rápida (3). Tal como os fungos zoospóricos, os Zygomycetes também surgiram em estágios mais tardios na sucessão, Tabela 1. Apesar destes grupos terem sido considerados pioneiros nas sucessões de fungos em um substrato e consumidores de açúcares primários (34), aparentemente não conseguem competir com os Hyphomycetes terrestres e aquáticos no início da decomposição, aparecendo no substrato nas etapas finais, quando há açúcares disponíveis originados na degradação de celulose e hemicelulose. A razão de *Rhizophlyctis* ter sido isolada somente nas folhas e não na água pode ser justificado pela grande atividade celulolítica desempenhada por este fungo, também reportado para *Karlingia rosea* e *Nawakowskella* considerados de compostores muito importantes de folhas (35). Estes fungos também foram isolados em folhas submersas de *Ficus microcarpa* (22). Newton (35) isolou *Saprolegnia delica* e *Pythium* foram isolados em folhas de *Salix*, apesar da existência de vasta micota pré-existente na mesófilo foliar, aparentemente melhor adaptada ao substrato. Em folhas de representantes de *Quercus*, *Alnus* e *Fagus* utilizadas como iscas, o mesmo autor isolou *Phytophthora*, *Pythium*, *Saprolegnia*, *Achlya* e *Dictyuchus monosporus* ativos na decomposição foliar.

A partir destes resultados conclui-se que a ausência de fungos zoospóricos na sucessão fúngica em folhas não se deve à falta da atividade dos representantes deste grupo, mas sim às técnicas de isolamento empregadas, que dificilmente permitem a detecção da presença destes fungos, especialmente os Chytridiomycetes. Para o isolamento do maior número de fungos ativos na decomposição de folhas submersas, é necessário consorciar técnicas culturais com as de iscagem e observação direta, tal como havia sido proposto em estudos anteriores (22).

O número total de colônias isoladas, Tabela 2, aumento do primeiro para o segundo mês, decrescendo em seguida. Observou-se a tendência da variabilidade dos táxons acompanhar a quantidade total de colônias, no entanto, para confirmar esta hipótese maiores amostragens e estudos durante maiores períodos de tempo seriam necessários. A ausência de dados similares na literatura não permite a comparação dos atuais resultados.

SUMMARY

Fungal succession on *Quercus robur* L. leaves submerged in a lake in the municipality of Itapecerica da Serra, SP

The aim of this study was to compare the inhabiting micota of *Quercus robur* L. leaves, submerged in tropical climatic conditions with the micota of the same substrate cited for temperate zones; to verify the presence of zoosporic micota of the submerged leaves with that in the aquatic environment. Newly fallen oak leaves were disposed in nylon mesh litter-bags (20x10 x 1mm) and submerged on three sites in a lake located in the municipality of Itapecerica, São Paulo State, Brazil. Leaves and water samples were taken monthly from January to June of 1988, for fungal isolation by the following methods: leaf discs washing method with plaiting in potato dextrose agar and pentose malt agar; direct observation of leaves incubated in sterilized distilled water and baiting with corn straw, snake skin, hemp (*Cannabis sativa* L.) and *Sorghum* sp. seeds, hair and cellophane. Counting of the total colony number was carried out after 7 days of incubation of the plates at room temperature (25-30°C). The majority of the zoosporic fungi present in the water samples and the leaf disks were the same. Thirty-six taxa were isolated, 8 zoosporic fungi, 8 aquatic Hyphomycetes, 17 terrestrial Hyphomycetes and 3 Zygomycetes. The leaf-inhabiting pioneer micota isolated in *Quercus robur* L. leaves in tropical climate conditions seems to be very similar to that reported for the temperate zones. Typical soil fungi were isolated from the submerged leaves even after months of submergence. Aquatic Hyphomycetes colonized the substrate after 2 months, whereas the zoosporic fungi were observed after 3 months of leaf decomposition. Almost all zoosporic fungi isolated from leaf disks were also observed in the water samples.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às Sras. Isolde Strobel e Irene Alt, responsáveis pela reserva, a permissão para utilização do lago nos experimentos, e ao Eng. René Laerte Crusius pela colaboração nos trabalhos de campo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arsuffi, T.L. & Suberkropp, K. – Leaf processing capabilities of aquatic hyphomycetes: interspecific differences and influence on shredder feeding preferences. *Oikos*, 42:144-154, 1984.
2. Balocher, F. & Kendrick, B. – Fungi in the diet of *Gammarus pseudolimnaeus* (Amphipoda). *Oikos*, 24:295-300, 1973.
3. Barlocher, F. & Kendrick, B. – Dynamics of the fungal population on leaves in the stream. *J. Ecol.*, 62:761-791, 1974.
4. Barnett, H.L. & Hunter, B.B. – Illustrated genera of Imperfect Fungi. 3ed. Minnesota, Burgess Publishing Company, 241p., 1972.
5. Barron, G.L. – The genera of Hyphomycetes from soil. Baltimore, Ed. Robert Krieger, 364p., 1972.
6. 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.
7. Chamier, A. & Dixon, P.A. – Pectinases in leaf degradation by aquatic Hyphomycetes: the enzymes leaf maceration. *J. Gen. Microb.*, 128:2469-2483, 1982.
8. Disco Laboratories. Disco Manual, 9th. ed. Michigan, Detroit - Michigan Disco Laboratories Inc., 350p., 1972.
9. Dogma, I.J. – Studies on chitinophilic *Siphonaria*, *Diplophyctis* and *Rhizosclerotium* (Chytridiales). II. *Astrophyctis sarcopoides* II. E. Petersen: a *Diplophyctis* with a sexual phase. *Nova Hedwigia*, 25:121-141, 1974.
10. Frankland, J. – Mechanisms in fungal successions. In: Carroll, G.C. & Wicklow, D. (eds.). The fungal community. New York, Marcell Dekker, 403-423, 1981.
11. Grandi, R.A.P. – Hifomicetos de solo de cerrado da reserva biológica de Moji-Guaçú (São Paulo-Brasil) e triagem da ação amilolítica, celulítica e proteolítica. São Paulo, Escola Paula de Medicina, 1984. (Tese de mestrado), 114p.
12. Hogg, B. & Hudson, H.J. – Microfungi on leaves of *Fagus sylvatica* L. I. The micro-fungal succession. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 49:185-192, 1966.
13. Hudson, H.J. – Succession of micro-fungi on ageing leaves of *Saccharum officinarum*. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 45:395-423, 1962.
14. Ingold, C.T. – Dispersal in Fungi. Oxford. Clarendon Press, 1.ed., 86p., 1964.
15. Ingold, C.T. – Guide to aquatic Hyphomycetes (Fungi Imperfici) with notes on their biology. Ambleside, Freshwater Biological Association, Scientific Publications n.30, 96p., 1975.
16. Johnson, P.W. – The genus Achlya: morphology and taxonomy. Ann Arbor, University of Michigan Press. 15, 1956. 180p.
17. Kaushik, N.K. & Hynes, H.B.N. – The fate of the dead leaves that fall into streams. *Arch. Hydrobiol.*, 68:465-515, 1971.
18. Milanez, A.I. & Beneke, E.S. – New records of aquatic phycomycetes from Michigan. *Pap. Mich. Acad. Sci. Arts and Letters*, 3:11-22, 1968.
19. Park, D. – On the ecology of heterotrophic micro-organisms in freshwater. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 58:291-299, 1972.
20. Pugh, G.T.F.; Buckley, N.G. & Mulder, J. – The role of phylloplane fungi in the early colonization of leaves. *Symp. Biol. Hung.*, 11:329-333, 1972.
21. Saunders, G.W. – Decomposition in freshwater. cap. 15. In: Anderson, J.M. & Macfayden, A. (eds.). The role of terrestrial and aquatic organisms in decomposition processes. 17th. Symposium of the British Ecological Society. Blackwell Scientific Publications, London. p.341-373, April 1975.
22. Schoenlein-Crusius, I.II. & Milanez, A.I. – Sucessão fúngica em folhas de *Ficus microcarpa* L.f. submersas no lago frontal situado no Parque Estadual da fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. *Rev. Microbiol.*, 20(1):95-101, 1989.
23. Seymour, R.L. – The genus *Saprolegnia*. *Nova Hedwigia*, 19. 124p., 1970.
24. Shearer, C. & Lane, L. – Comparison of three techniques for the study of aquatic hyphomycetes communities. *Mycologia*, 75:498-508, 1983.
25. Shearer, C.A. & Webster, J. – Aquatic Hyphomycetes Communities in the River Teign. III. Comparison of sampling techniques. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 84:509-518, 1985.
26. Sparrow, F.K. – Aquatic Phycomycetes, 2th ed. Ann Arbor. University of Michigan Press, 1960. 1187p.
27. 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.
28. Subramanian, C.V. & Vittal, B.P.R. – Studies on litter fungi. V. Quantitative studies of the mycoflora of *Gymnosporia emarginata* litter. *Trans. mycol. Soc. Japan*, 21:345-350, 1980.
29. Suberkropp, K. & Klug, M.J. – Fungi and bacteria associated with leaves during processing a woodland stream. *Ecology*, 57:707-719, 1976.
30. Suberkropp, K.: Godshalk, G.L. & Klug, M.J. – Changes in the chemical composition of leaves during processing in a woodland stream. *Ecology*, 57:720-727, 1976.
31. Swift, M.J. – Species diversity and the structure of microbial communities in terrestrial habitats. In: Anderson, J.M. & Macfayden, A. (Ed.). The role of terrestrial and aquatic organisms in decomposition processes. 17th. Symposium of the British Ecological Society. Blackwell Scientific Publications, London 350p., 1975.
32. Triska, F.J. – Seasonal distribution of aquatic hyphomycetes in relation to the disappearance of leaf litter from a small woodland stream. Ph.D. thesis. University of Pittsburgh, Pennsylvania, 1898p., 1970.
33. Vardavakis, E. – Seasonal fluctuation of non-parasitic mycoflora associated with living leaves od *Cistus incanus*, *Arbutus unedo* and *Quercus coccifera*. *Mycologia*, 80:200-210, 1988.
34. Webster, J. – Introduction to fungi. 2.ed. Cambridge University Press, 660p., 1986.
35. Willoughby, L.G. – Decomposition of litter in Freshwater. In: Dickinson, C.H. & Pugh, G.J.F. (eds.). Biology of plant litter decomposition. London Academic Press Inc., vol.1, p.659-681, 1974.

Recebido para publicação em 19/9/89



PRELIMINARY STUDIES OF THE ANTIBIOTIC ACTIVITY OF SOME NEW ACYLSEMICARBAZIDES AND ACYLTHIOSEMICARBAZIDES

Rita de Cássia S.B. Caldas Barbosa¹
Astréa M. Giesbrecht¹
Carlos A. Montanari²
Joseph Miller²

SUMMARY

The antifungal and antibacterial activities of 8 new acyl and acylthiosemicarbazides substituted in N-1 and N-4 were investigated. The 4-methoxy-3-nitrobenzoyl derivatives were completely inactive whereas the 4-chloro-3-nitrobenzoyl derivatives showed good activity that was modified by the nature of the substituents in N-1 or C-3.

INTRODUCTION

The title compounds are of special interest in the synthesis of mesoionic compounds (7), an area in which we have an on-going programme. At the same time, they are a likely source of compounds possessing biological activity (1-4).

In the present work we investigated, as a preliminary study, the antibiotic activity of a series of new N¹-acyl-N⁴-arylsemicarbazides and N¹-acyl-N⁴-aryltiosemicarbazides.

MATERIAL AND METHODS

The structures of the new compounds are presented in Figure 1. Their purity was verified by standard methods, the melting points, elemental analysis and spectroscopic data being given elsewhere together with their preparation (8).

The microbiological tests were carried out against bacteria (*Bacillus cereus* ATCC 14579,

Staphylococcus aureus ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) yeasts (*Candida albicans* ICB 12, *Candida glabrata* ICB 51, *Candida tropicalis* ICB 19, *Cryptococcus neoformans* ICB 59, *Rhodotorula rubra* ICB 36), aflatoxin producing fungi (*Aspergillus flavus* ICB J-210, *Aspergillus parasiticus* ICB J-218) and dermatophytes (*Microsporum canis* ICB A-01, *Trichophyton rubrum* ICB B-2-11, *Epidermophyton floccosum* ICB A-07).

Assays with bacteria and yeasts were carried out by the cupplate agar diffusion method (6), using respectively Trypticase soy agar (Difco) and Sabouraud-dextrose agar (Difco). The compounds were dissolved in dimethylsulfoxide and tested in a concentration of 1mg/ml. The plates were incubated at 37°C and the activities measured as the diameter (in mm) of the zone of inhibition surrounding the agar well, after 24 and 48hs.

A two-fold serial dilution method in liquid

1 Instituto de Ciências Biomédicas – USP, Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, 05508 São Paulo SP, Brazil

2 Depto. de Química Fundamental, Instituto de Química – USP, Av. Prof. Lineu Prestes, 758, 05508 São Paulo SP, Brazil

medium (Trypticase soy broth - Disco) (6) was employed for determining the minimal inhibitory concentrations (MIC) of the active compounds. The latter method carried out in Sabouraud-dextrose medium was also employed for antifungal testing with dermatophytes and *Aspergillus* strains and the concentration of samples ranging from 400 to 6,2mg/ml. Two sets of controls were used, the organisms control without samples added to the medium and the solvent control. Antibiotic samples (streptomycin sulfate or nistatin 0,5mg/ml) were also tested in the agar diffusion method.

Qualitative evaluation of the antifungal activities was also accomplished using a bioautography assay (5). Samples containing 50mg of the test compound were spotted on silica gel plates (Alufolien, Merck) and spores of *Cladosporium sphaerospermum* suspended in a medium containing glicose and mineral salts were sprayed onto the plates. Inhibitory zones on the plates appeared as white zones on a dark background, after 72hr of incubation in a moist atmosphere at 25°C.

RESULTS

The results of assays with Gram-positive bacteria, *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* are summarized in Table 1. The results for Gram-negative bacteria and other yeasts are not listed since none of the compounds showed

activity.

Compounds 1 to 4 were inactive against all the cultures studied. Compounds 5 to 8 were active against one or more of the Gram-positive bacteria studied, the minimal inhibitory concentrations (MIC) being 500mg/ml for all compounds.

Compounds 6 and 8 were active against yeasts and showed clear inhibition zones on the thin-layer chromatograms sprayed with spore suspensions of *Cladosporium sphaerospermum*. They also inhibit the growth of dermatophytes, the MIC (mg/ml) being as follows:

<i>Epidermophyton floccosum</i> :	compound 6 (100); 8 (25)
<i>Microsporum canis</i> :	compound 6 (100); 8 (25)
<i>Trichophyton rubrum</i> :	compound 6 (200); 8 (12,5)

DISCUSSION

Several N¹-acyl-N⁴-arylthiosemicarbazides are reported as possessing antimicrobial properties (1-4).

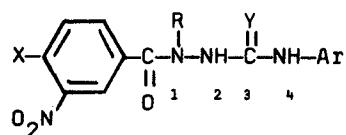
All compounds assayed are N¹-acyl-N⁴-arylsemicarbazides or N¹-acyl-N⁴-arylthiosemicarbazides. Compounds 1-4 are 4-methoxy-3-nitrobenzoic acid derivates and compounds 5-8 are 4-chloro-3-nitrobenzoic acid derivatives (Fig. 1).

Bhat et al investigated the "in vitro" antifungal activity (against *C. albicans*, *T. rubrum* and *T. mentagrophytes*) of several 4-nitrobenzoyl- or 3-nitrobenzoyl-thiosemicarbazides substituted in

Table 1 – Antibiotic activity of acylsemicarbazides and acylthiosemicarbazides (1mg/ml) measured as the mean (N ≥ 3) diameter of the zone of inhibition (mm).

N = number of assays
– no inhibition up to 1000 µg/ml

Compound	B. cereus	S. aureus	S. epidermidis	C. albicans	C. neoformans
1	–	–	–	–	–
2	–	–	–	–	–
3	–	–	–	–	–
4	–	–	–	–	–
5	9	9	10	–	–
6	10	10	11	8	9
7	9	9	8	–	–
8	7	–	–	–	8
solvent	–	–	–	–	–



Compound	X	Y	R	Ar
1	OCH ₃	O	CH ₃	C ₆ H ₅
2	OCH ₃	S	CH ₃	C ₆ H ₅
3	OCH ₃	O	CH ₃	C ₁₀ H ₇
4	OCH ₃	S	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅
5	Cl	O	CH ₃	C ₆ H ₅
6	Cl	S	CH ₃	C ₆ H ₅
7	Cl	O	CH ₃	C ₁₀ H ₇
8	Cl	O	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅

Figure 1 – Chemical structures of the acylsemicarbazides and acylthiosemicarbazides assayed.

nitrogen-4 and verified that none of the compounds showed any significant activity (1).

Our results showed that the introduction of a methoxy group in position *para* of the 3-nitrophenyl ring did not grant activity since all 4-methoxy-3-nitrobenzoyl derivatives (compounds 1-4) were inactive against bacteria and fungi.

However, with the introduction of a chloro substituent in position *para* (compounds 5-8), activity was observed against Gram-positive bacteria. Their activity was modified by the nature of substitution in nitrogen-1 or by replacing O by S in carbon-3. Hence, the replacement of a methyl group by a phenyl group (as in compound 8) decreased the antibacterial activity but increased activity against fungi. The replacement of O by S in carbon 3 (as in compound 6) increased the spectrum of activity, the compound now being active against yeasts, dermatophytes and *C. sphaerospermum*. The nature of the substituent in nitrogen-4 seemed not change the activity.

RESUMO

Estudos preliminares da atividade antimicrobiana de novas acil-semicarbazidas e aciltio-semicarbazidas.

Investigou-se a atividade antibacteriana e antifúngica de 8 novas acil-e aciltio-semicarbazidas substituídas em N-1 e N-4. As substâncias derivadas do ácido 4-metoxi-3-nitrobenzoico mostraram-se completamente inativas enquanto que as derivadas do ácido 4-cloro-3-nitrobenzoico mostraram boa atividade que variou de acordo com os substituintes em N-1 e C-3.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to CAPES and CNPq for fellowships and financial aid.

REFERENCES

- Bhat, A.K.; Bhamaria, R.P.; Bellare, R.A.; Deliwala, C.V. – Chemotherapy of fungus infections. Part I-1-Acyl-4-substituted thiosemicarbazides, 3-aryl-4-substituted-5-mercaptop-1,2,4-4H-triazoles and related compounds. *Indian J. Chem.*, 5:397-401, 1967.
- Demetrescu, C.; Chirita, C. and Ion, V. – New substituted isonicotinoyl hidrazides with "in vitro" tuberculostatic activity. Oxazolone structure. *Pharm. Zentralh. Deut.*, 107:127-132, 1968.
- Demetrescu, C.; Manu, V. and Chirita, C. – New therapeutic N¹-acyl-N⁴-arylthiosemicarbazides with spasmolytic action. *Pharmazie*, 25:317-319, 1970.
- Demetrescu, C. & Manu, V. – Synthesis of N¹-acyl-N⁴-arylthiosemicarbazides possessing therapeutic properties. I. Phenylthiosemicarbazides of -benzoylaminocinnamic acid with antibacterial and antispasmodic properties. *Chin. Ther.*, 6:18-24, 1971.
- Homans, A.L. & Fuchs, A. – Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *J. Chromatogr.*, 51:327-329, 1970.
- Lorian, V. *Antibiotics in laboratory medicine*. Baltimore, London, Williams & Wilkins, 1980. p. 1-192.
- Molina, P.; Alajarín, M.; Arques, A. and Benzal, R. – Fused mesoionic heterocycles: synthesis of 1, 3, 4-oxadiazolo [3, 2, a] pyridine and 1,3,4-thiadiazolo [3,2,a] pyridine derivatives. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, 351-355, 1982.
- Montanari, C.A. – Derivados de acil-hidrazinas, acil-semicarbazidas e aciltio-semicarbazidas e aplicações em síntese de compostos mesoíônicos com atividade biológica potencial. *Dissertação de Mestrado*, 138 p, 1987. Instituto de Química, USP.

Recebido para publicação em 13/10/1989



TRATAMENTO ANAERÓBIO EM DUAS FASES, DE SUSPENSÕES AMILÁCEAS II. FASE METANOGÊNICA. INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE CN⁻

Marney Pascoli Cereda¹

Agustí Flors Bonet²

Salvador Valles²

José Alberola²

RESUMO

Simulou-se a composição de resíduo líquido de indústria processadora de mandioca, através de uma suspensão de amido de batata e sais minerais. Optou-se por digestão anaeróbia em separação de fases devido às características do substrato. Trabalho anterior dos mesmos autores descreve a fase ácida, realizada a 30°C, por fermentação a partir de enzimas de microrganismos da flora natural de fécula de mandioca. A fase metanogênica, de que trata o presente trabalho, empregou um reator de leito fixo, mantido entre 32° e 33°C. O inóculo foi esterco bovino previamente digerido em reator de mistura completa. Após alcançar estabilidade, obteve-se cerca de 85% de redução do DQO de alimentação (6,25g/l). O tempo de residência hidráulico médio foi de 3,5 dias e segundo o modelo de Contois parece não haver previsão de aumento de produção gasosa com tempo de residência hidráulico superior a 5 dias. A produção de metano foi de 0,43 l/g de DQO consumido, o que representa 60% do rendimento teórico. O teor mínimo de metano no gás foi de 92%, valor bastante superior aos dados da literatura. A tentativa de adaptação da metanogênese ao cianeto, cuja presença em água residual de industrialização de mandioca no Brasil ultrapassa os 100 ppm, resultou inviável. A adição de 50 ppm de CN na forma de sal-sódico ocasionou imediata paralização da produção de gás, devida a inibição de parte dos microrganismos presentes.

INTRODUÇÃO

A literatura sobre tratamento anaeróbio de resíduos líquidos tem dedicado grande atenção aos reatores de fluxo ascendente. Entretanto esse modelo nem sempre é o mais indicado para alguns tipos de resíduos líquidos, como de indústrias processadoras de plantas amiláceas, para os quais a degradabilidade é tão rápida que pode ocasionar a acidificação da coluna.

Ghosh & Pohland (7) comentam que o pro-

jeto tradicional dos reatores de digestão anaeróbia coloca os dois grupos de microrganismos (ácido-gênicos e metanogênicos) no mesmo ambiente físico e químico. Conseqüentemente a operação desses processos dependia inteiramente das características de sensibilidade e cinética de crescimento das bactérias metanogênicas, com tempo de geração estimado entre 2 e 11 dias sob condições do processo convencional. Além disso, outra desvantagem deve-se à possibilidade de desequilíbrio na atividade dos microrganismos formado-

1 Depto. de Tecno. dos Prods. Agropecuários, Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP – Caixa Postal 237, 18600 Botucatu SP, Brasil

2 Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Jaime Roig, 11, Valencia, Espanha

res de ácidos e metano, cujo controle e prevenção pode ser difícil, ou mesmo impossível, levando ao colapso do processo.

Alguns pesquisadores, reconhecendo as diferenças fisiológicas entre os dois grupos de microrganismos sugeriram a necessidade da separação física do processo de digestão anaeróbia em distintos reatores. Com este modelo é possível manter condições ótimas de desenvolvimento para cada grupo, melhorando em geral o desempenho do processo.

Para Zeevalkink & Maaskant (17) a digestão anaeróbia é adequada ao tratamento de efluentes facilmente degradáveis e portanto para efluentes de indústrias de amido. As dificuldades encontradas, porém, são várias. Quando emprega-se reator de fluxo ascendente, torna-se difícil e oneroso manter o pH dentro dos limites de segurança. Os reatores que operam com resíduos amiláceos costumam apresentar baixa taxa de aplicação e dificuldades na separação da biomassa, que se traduz na perda de lodo e instabilidade.

Staffanstorop (15) comenta que vários modelos de reatores têm sido propostos para tratamento de águas residuárias de indústrias de extração de amido. Citam os resultados obtidos pelo uso de reator de contacto (mistura completa), com reciclo, no tratamento de efluentes de processamento de milho.

A batata é bastante utilizada na Europa como matéria prima para extração de fécula. A modernização destas indústrias, adotando processos tecnológicos adequados, tem diminuído a porcentagem de amido que é arrastado para as águas residuais, diminuindo também o seu volume. Os subprodutos são economicamente utilizados devido ao alto teor proteico, em alimentação animal e humana e na fabricação de um tipo de xarope de melão para alimentação animal, diminuindo assim os custos do sistema de tratamento (13).

Hemens & cols (9) lembram que os resíduos resultantes da produção de amido e seus derivados a partir do milho, contém quantidades consideráveis de materiais fermentescíveis e portanto uma elevada demanda de oxigênio. A literatura mostra que esses efluentes podem ser satisfatoriamente tratados por processos aeróbios. Caso não seja possível o tratamento, a disposição final desse resíduo pode-se constituir em sério problema. Os mesmos autores citam que até 1962 esses resíduos vinham sendo dispostos em lagoas ou solos porosos, provocando o desenvolvimento de odores indesejáveis, mas que é possível seu tratamento

através de reator modelo CLARIGESTER, que combina um tanque de sedimentação e um digester de manta de lodo, obtendo-se 90% de redução do DQO do efluente com tempo de retenção hidráulico de 2,5 a 4,5 dias, operando a 23°C.

Anrain (2) cita que entre as atividades causadoras de degradação ambiental no Estado de Santa Catarina, destacam-se as feculárias, cujos efluentes de características predominantemente orgânicas com elevados teores de DQO e DBO, são responsáveis por graves danos à fauna e à flora dos corpos de água, onde são inadequadamente lançados. As unidades em geral são de pequeno e médio porte, e neste caso o tratamento dos efluentes implica em grandes investimentos. A autora utilizou o sistema - UASB, por ser usado com sucesso em indústrias similares na Europa.

Além da elevada carga orgânica comum a efluentes amiláceos, a água residual de indústrias de processamento da mandioca é também tóxica, principalmente pela presença da linamarina, glucósideo encontrado na mandioca e que, segundo Godoy (6) dá origem à glicose, acetona e ácido cianídrico. A enzima linamarase ocorre na própria planta, mas a hidrólise pode também ser realizada por enzimas microbianas (6, 10) ou ainda por agentes físicos e químicos (12).

Yang & col (16) relatam o efeito do ion cianeto na fermentação metanogênica a 35°C, com tempo de retenção hidráulico de 50 dias, empregando-se culturas alimentadas com acetato como única fonte de carbono. Para cianeto originário de efluentes de indústrias galvanométricas, o limite de inibição foi de 1 mg/l.

Smith, Lequerica & Hart (14) estudaram o efeito inibitório de NaCN no crescimento e metabolismo de *Methanosarcina berkeri* 227, tendo comprovado a ação do CN⁻ em bactérias metanogênicas crescendo em acetato. O mecanismo da inibição estaria dirigido especificamente ao catabolismo, porque o crescimento e metanogênese em H₂-CO₂ e metanol não foram inibidos. Entretanto, segundo os autores, o cianeto não tem ação específica e seu efeito "in vivo" na metanogênese não foi relatado.

O objetivo do trabalho foi de avaliar o efeito do ion cianeto no modelo de fermentação metanogênica adotado, como tentativa de extrapolar os resultados para o tratamento de água residual de mandioca, que possui teores elevados deste tóxico. Na programação elaborada, uma vez alcançada a condição de estabilidade do reator, era intenção introduzir o radical cianeto (na forma de

cianeto de sódio) em concentrações crescentes através do substrato obtidos em fermentação ácida relatada em trabalho anterior de Cereda & col (4).

MATERIAL E MÉTODOS

O reator foi uma coluna de plexiglas, com volume útil de 6,5 l, recheada de anéis de plástico de PVC rígido de 3 x 2 cm de diâmetro. A coluna era alimentada através de uma bomba peristáltica que garantia a manutenção regular do fluxo. A coluna era dotada de parede dupla, através da qual circulava água mantida à temperatura controlada (32-33°C); a saída dos gases era adaptada à gasômetro tipo telescópio, no qual era medida a produção gasosa. A leitura da temperatura da coluna era feita através de termômetro cujo bulbo estava imerso na coluna.

O substrato foi uma suspensão de amido de batata e sais, com a seguinte composição (g matéria seca/litro): 1,71 a 9,49 g de amido, 1,23 g NH₄Cl; 0,37 g de K₂HPO₄; 0,07 g de KH₂PO₄, 0,17 g de Na₂S. A suspensão foi submetida a fermentação natural a 30°C, pH 5,5 a 6,0 (Cereda & col, 3), razão pela qual as quantidades de amido digeridas foram variáveis. O substrato obtido apresentou DQO de 4,57 a 10,69 mg/l, com valor médio de 7,34 e a seguinte composição (g/l) média (máxima e mínima) em ácidos orgânicos (média de 9 fermentações):

acético	1,60 (0,65-3,09);
propioníco	1,46 (0,23-2,29);
butírico	0,69 (0,09-1,58);
iso-valélico	0,03 (0,01-0,16);
valélico	0,06 (0,02-0,30).

O substrato previamente fermentado, diluído a valores de DQO ao redor de 5 g DQO/l e com pH ajustado a 7,0 era bombeado até a extremidade interior da coluna metanogênica, ocasionando saída de igual volume de efluente. A coluna funcionou de forma contínua por 5 semanas com tempos de residência hidráulicos (θ) variando de 3,07 a 4,14 dias.

No substrato e efluente eram feitas periodicamente determinações de pH e demanda química de oxigênio (DQO), permitindo que por cálculo fosse avaliado o DQO consumido. A medida da produção gasosa era feita pela elevação da cam-

panha coletora e a amostragem na ligação entre reator e gasômetro, através de seringas apropriadas.

Foi programada a adição gradual de cianeto de sódio ao reator, juntamente com o substrato, nas dosagens de 50 a 250 ppm, com intervalos de adaptação de 3 vezes o tempo de residência hidráulico. O início da adição de cianeto foi feita a partir do reator estabilizado.

A determinação de metano no gás foi feita por cromatografia gasosa em aparelho Perkin Elmer modelo 116E, dotado de detector de condutibilidade térmica, através de técnica descrita por Mindrup (11). As análises eram feitas em triplicata e comparadas com amostras de gases padrões de concentração conhecida.

Para determinar a demanda química de oxigênio, utilizou-se a metodologia de dicromato de potássio (Apha, (1)), modificado pela substituição da digestão por refluxo por digestão a 150°C, por duas horas em tubos fechados por tampa de rosca (Sovirel nº 15). O valor do pH foi determinado por método potenciométrico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O reator funcionou em condições de relativa estabilidade pelo período de 5 semanas (Tabela 1). O fluxo de alimentação variou de 1,57 a 2,12 litros/dia, ocasionando flutuação do valor do tempo de retenção hidráulica (TRH). Influui também o fato de que a carga orgânica variou, uma vez que o substrato era obtido por fermentação natural, como é possível observar na Tabela 1, pelos valores de carga de entrada (DQOe). Os valores médios apresentados na mesma Tabela mostram que o índice de tratamento (redução DQO) sempre esteve acima de 70%, obtendo-se o valor máximo de 89,45%, que pode ser considerado muito bom, uma vez que foi obtido em um período onde o TRH apresentou o menor valor de tempo aplicado ao reator. O valor obtido para tratamento é comparável aos valores citados na literatura para condições semelhantes. Hemens & col (9) citam reduções de 90% de DQO, com de 2,5 a 4,5 dias, operando reator de fluxo ascendente alimentado com resíduo líquido de indústria de extração de amido de milho.

O grau de tratamento obtido pode ainda ser considerado bom, uma vez que a carga (DQOe) aplicada foi mais elevada que a empregada por Staffanstorp (15) com efluente de indústria de

Tabela 1 – Médias semanais de resultados obtidos em fase metanogênica conduzida em reator de leito fixo, alimentado com substrato de fécula de batata estabilizada por fermentação prévia (32-33°C).

Semanas	DQOe	DQOs	F(l/d)	V gás(l/d)	Dias	CH ₄ (92%) l.	g DQOd (DQOe - DQOs).F	I.CH ₄ g DQOe	I.CH ₄ g DQOd	Redução DQO %
1 ^a	10,16	1,57	1,82	4,40	3,57	4,05	8,59	0,22	0,47	84,55
2 ^a	5,76	1,50	1,57	2,56	4,14	2,36	6,69	0,26	0,35	73,35
3 ^a	5,78	0,61	2,12	4,45	3,07	4,09	10,96	0,33	0,37	89,45
4 ^a	4,42	0,57	1,80	4,43	3,61	4,08	6,93	0,51	0,59	87,10
5 ^a	5,20	0,63	1,97	3,67	3,30	3,38	9,00	0,65	0,38	87,88
Valor Médio	6,26	0,98	1,86	3,90	3,54	3,59	8,43	0,39	0,43	84,67

DQOs = substrato

DQOe = efluente

DQOd = destruído

trigo tratado em reator de contacto com reciclo, em condições semelhantes de temperatura. Com uma carga variando de 0,6 a 3,4 g de DQO/l, o autor obteve em média 71,0% de redução, com rendimento de 0,51 l de gás/g de DQO e, contendo 68% de metano, Zeevalkin & Maaskant (17), tratando água residual de indústria de extração de amido de milho em reator de fluxo ascendente em separação de fases, com carga e temperatura semelhante ao adotado, obtiveram 0,36 l de gás/g de DQO, com 60 a 80% de metano.

Nas condições de laboratório, observa-se na Tabela 1 que os rendimentos de gás atingiram seu máximo na 4^a semana, com 0,59 l de metano/g de DQO destruído.

Para líquido residual de feculárias de mandioca, Anrain (2) usou reator de fluxo ascendente, ajustando o pH do resíduo à 7,0, na alimentação. Operando à temperatura semelhante à adotada no trabalho, DQO de entrada de 6,15 g/l, conseguiu reduções de 90% com TRH de dois dias. O rendimento de gás foi baixo, com 0,44 l de gás/g de DQO de entrada.

Alto rendimento de gás em geral é incompatível com alto grau de tratamento, uma vez que requer tempo de retenção hidráulica mais prolongado. Na Figura 1, que expressa a variação do rendimento de gás em relação à variação do tempo de residência hidráulica observa-se que para os valores de TRH obtidos, a produção de gás, expressa em litros de metano por grama de DQO

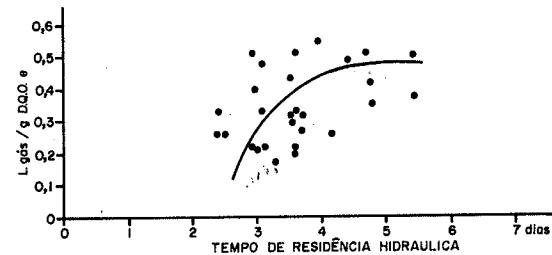


Figura 1 - Produção de gás, por grama de DQO de alimentação (DQOe), em relação ao tempo de residência hidráulica, em reator de leito fixo alimentado com substrato de fécula de batata fermentada (32-33°C).

de alimentação segue as previsões do modelo de Contois, na forma proposta por Chen & Hashimoto (5). Considerando-se válido o modelo, não haveria aumento na produção de gás com TRH superior a 5 dias, embora o grau de tratamento do resíduo provavelmente aumente.

Uma vez alcançada a estabilidade, foram adicionados 50 ppm de cianeto de sódio ao substrato. A coluna sofreu paralização imediata da produção gasosa, levando à suspensão do programa pré-estabelecido. Apesar da paralização da

coluna, quanto à produção de gás, resultados do cultivo dos microrganismos (Cereda & col, 2) evidenciaram que encontravam-se inibidos. As contagens efetuadas antes e após a adição de CN⁻ mostraram uma redução geral de cerca de 10%. A maior diferença encontrada foi no grupo de formadores precoces de gás, provavelmente *Clostridium* sp. Esses resultados encontraram comprovação em relatos da literatura sobre inibição de bactérias metanogênicas por íon cianeto e sua recuperação.

Os resultados obtidos são comparáveis aos relatados por Yang & col (16) que observaram em tratamento de resíduos que continham água de processos galvanométricos que a metanogênese pode aclimatar-se e remover cianeto em concentrações superiores àquelas consideradas letais. Com aclimatação os filtros anaeróbios resistem melhor e podem suportar 20 a 40 mg/l de cianeto, sem inibição na produção de metano. Uma dose única de 700 mg/l em um reator aclimatado com um dia de tempo de retenção hidráulica provocou imediata e severa inibição na produção de metano, recuperando-se ao final de 4 dias à produção normal. Conclui-se que o sistema não estava "morto", mas sim inibido, com a biomassa do sistema bloqueada porém viável, até que ocorra a destoxicação ou aclimatação. Quando o líquido que contém CN⁻ era removido e substituído por igual volume sem tóxico, o sistema se recuperava mais rapidamente do que quando o CN⁻ permanecia.

Os resultados de Smith, Lequerica & Hart (14), detalham o mecanismo de ação do tóxico e mostram que NaCN (10mM) inibiu o catabolismo de grupos metílicos à CH₄ e CO₂ mas não inibiram a metanogênese de metanol, CO₂, e outros substratos. Os resultados apontam o CN como inibidor "in vivo" da desidrogenase do CO.

Pode-se concluir que além de que a microflora do reator não se encontrava adaptada ao cianeto, como ocorre com os microrganismos das águas residuais de fecularias de mandioca no Brasil, resta o fato de que o cianeto na forma de sal de sódio tem um comportamento muito diferente do glucocianeto da mandioca. Nesta o radical cianeto está preso ao radical orgânico através de uma ligação beta, e sabe-se que é menor o número de microrganismos que possuem enzima capaz de desfazer essa ligação. Assim, parece que a hidrolise do glucosídeo cianogênico da mandioca ocorre mais lentamente, permitindo que ocorra uma adaptação. Comprovam esse fato o trabalho de Anrain (2), onde constatou-se a viabilidade da

digestão anaeróbia de água residual de indústrias de processamento de mandioca com teores muito acima dos 50 ppm usados no presente trabalho.

SUMMARY

A two-phase anaerobic treatment of starch suspensions II. Methanogenic phase. Influence of CN⁻ addition

A liquid waste from cassava processing plants was simulated using potato starch and minerals. Anaerobic digestion in separate phases was chosen due to waste characteristics. The starchy liquid waste was easily fermented causing an accumulation in volatile acids. This fact causes lower hydraulic retention time in the acid phase than in the methanogenic one and the anaerobic treatment was affected. A previous paper by the same authors describes the acid phase at 30°C fermented by natural microorganisms from cassava starch. The methanogenic phase discussed in this paper, used an up flow fixed-bed reactor of 6,5 l, kept between 32-33°C. The substrate was adjusted to 7,0. The inoculum was sludge from a completely mixed reactor feed with cattle manure. The reactor was functioned by 5 weeks and after reaching stability an 85% reduction in COD (6,25 g/l) was observed. The average time of hydraulic retention was 3,5 days; and according to Contois model it seems not to have growing prevision of gas rate production in more than 5 days of hydraulic retention time. The methane production measured by chromatographic method was 0,43 l/g of consumed COD what represents 60% of the theoretical rate. The minimum amount of methane in gas was 92%, much higher than those present in literature, but adequate to the reactor model adapted. The attempt to adapt methanogenesis to cyanide, which content in liquid waste from-cassava industrialization is above 100 ppm, was infeasible. The addition of 50 ppm of CN⁻ as a sodium salt caused an immediate paralyzation in gas production as a consequence of partial inhibition in microbial activity. The microrganisms examination showed that the inhibition was due to 10% of the total number and to acidogenic prior than methanogenic microorganisms. This action stopped the methanogenic to receive the substract for the anaerobic process.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. American Public Health Association (1980). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 15^a ed. Washington, D.C.
2. Anrain, E. (1983). Tratamento de efluentes de feculárias em reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 12, Balneário de Camboriú, Fundação de Amparo à Tecnologia e ao Meio Ambiente. p. 1-21.
3. Cereda, M.P.; Flors, A.B.; Vallés, S.A. & Alberola, J. - Avaliação de grupos de microrganismos em digestão anaeróbia. In: Encontro Estadual de Especialistas em Digestão Anaeróbia, 1, São Paulo, 1985. *Anais...*, São Paulo, 1985.
4. Cereda, M.P.; Flors, A.B.; Vallés, S. & Alberola, J. (1986) - Tratamiento anaerobio en dos fases de suspensiones amiláceas. I - Fase acidogénica. *Rev. Agroquím. Tecol. Aliment.*, 26:101-8.
5. Chen, Y.R. & Hashimoto, A.G. (1978). - Kinetics of methane fermentation. *Biochem Bioeng Symp.*, 8:269-82.
6. Colard, P.P. (1963). - Species of *Corynebacterium* isolated from fermented cassava roots. *J. appl. Bact.*, 26:115-6.
7. Ghosh, S. & Pohland, F.C. (1974). - Kinetics of substrate assimilation and production in anaerobic digestion. *Journal of WPCF*, 46:748-59.
8. Godoy, J.M. (1960). - *Fecularia e amidonaria*. 2. ed. Rio de Janeiro, Romiti & Lanzara, 288p.
9. Hemens, J.; Meiring, P.G.J. & Stander, G.J. (1962). - Full-scale anaerobic digestion of effluents from the production of maize starch. *Water and waste treatment*, may/june. 16-8.
10. Ikedione, C.O. & Onyike, E. (1982). - The use of linamarase in "gari" production. *Process biochem.*, 17:2-5.
11. Mindrup, R. (1978). - The analysis of gases and light hydrocarbons by gas chromatography. *J. chromatogr. Sci.*, 16:380-9.
12. Oke, O.L. (1968) - Cassava as food in Nigéria. *Wld. Rev. Nutr. Diet.*, 92:27-50.
13. Rosenau, J.R.; Whitney, L.F. & Haught, J.R. (1978). - Upgrading potato starch manufacturing wastes. *Fd Technol.*, 37-9.
14. Smith, M.R.; Lequerica, J.L. & Hart, M.R. (1985). - Inhibition on methanogenesis and carbon metabolism in *Methanosarcina* sp by cyanide. *J. Bacteriol.*, 162:67-7.
15. Staffanstorff, B.F. (1983). - Anacrobic-aerobic biological treatment of starch industry wastes. *Starch/Stärke*, 35:185-9.
16. Yang, J.; Speece, R.E.; Parkin, G.F.; Grosset, J. & Kocher, W. (1980). - The response of methane fermentation to cyanide and chloroform. *Prog. wat. tech.*, 12:977-89.
17. Zeevalkink, J.A. & Maaskant, W. (1984). „ Biogás from effluents of starch industries by anaerobic treatment. *Starch/Stärke*, 36:131-35.

Recebido para publicação em 31/8/1989

MODELLING ALCOHOL PRODUCTION AND CELL VIABILITY IN A CASCADE REACTOR WITH IMMOBILIZED CELLS

Aldo A. Milancse-Rubilar¹
Francisco Maugeri¹

SUMMARY

Alcohol production and cell viability performance were modeled in a cascade reactor with cells immobilized in polyethylene foam. Alcohol production could be predicted with a model based on apparent kinetic constants related to the free cells in the reactor effluent. Viability of cells was shown to be a function of both ethanol concentration and cell residence time in the reactor. The models are quite simple with kinetic constants, readily obtained from continuous culture data.

INTRODUCTION

The use of immobilized cells in alcoholic fermentation has been studied by many authors in recent years. Many advantages of this system have been described, high cell density in the reactor and high ethanol productivity being the most important ones. Natural polymers, like carrageenan and Ca alginate, have been most frequently used because they are easy to prepare and allow for the immobilization of living cells (4, 5, 6, 9). However, some authors (1, 2, 3) have been studying polyethylene foam as support for cell immobilization. This technique was shown to be promising because it is quite simple (immobilization takes place by natural attachment to the support) and leads to high productivities and high cell densities. Modelling of ethanol production by immobilized cells has been carried out recently with special attention to the internal and external mass transfer (5, 8, 12). However, there has not been much attention given to the viability of cells and its relation to the ethanol production. The objective of the present work is the modelling of ethanol production in a cascade reactor with cells immo-

bilized in polyethylene foam, without taking into account mass transfer and diffusion problems. The model is based on free cells, ethanol and substrate concentrations in the effluent. A model for the free cells viability was also developed.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism – The yeast strain used in this work was *Saccharomyces cerevisiae* IZ-888 from the Instituto Zimotécnico of the ESALQ, Piracicaba, Brazil.

Medium – A semi-synthetic medium was used containing 150g.l⁻¹ of sucrose, 1,0g.l⁻¹ of yeast extract, 2,0g.l⁻¹ of KH₂PO₄, 10,0g.l⁻¹ of (NH₄)₂SO₄ and 1,5g.l⁻¹ of Mg₂SO₄.7H₂O. After sterilization at 120°C for 15 min., 10ppm of Buzan 887, a bactericide from Buckman Laboratório Ltda., was added to the medium.

Culture conditions – The temperature was 33°C and the pH at the inlet was 4,5.

1. Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 13081 Campinas SP, Brazil

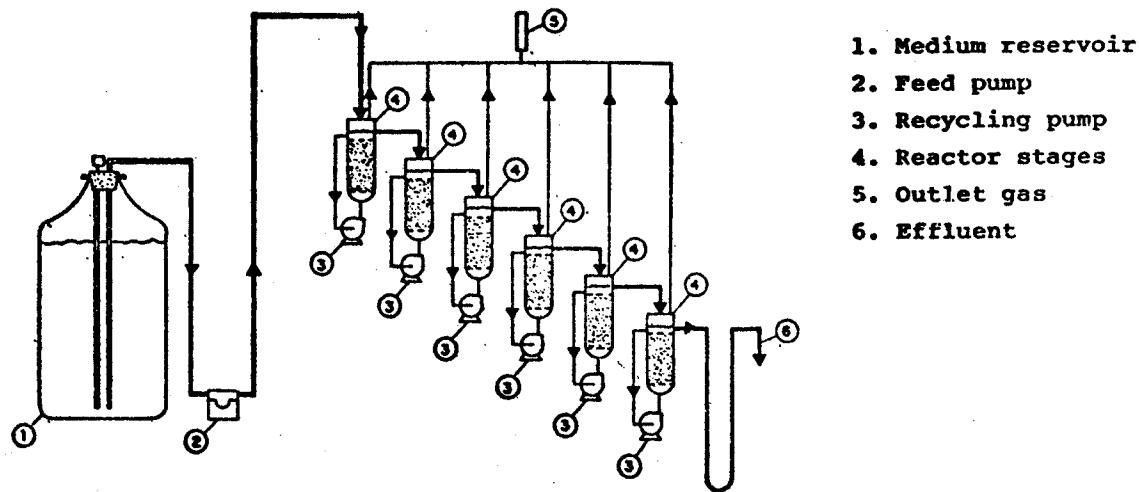


Figure 1 – The cascade reactor.

Reactor – The reactor is shown in Figure 1. It contains six stages, each containing one litre volume bed of 5mm cubes of polyethylene foam. A centrifugal pump promotes homogenization at each stage. The working volume considered at each stage was 1,275ml.

Immobilization – The immobilization was carried out by natural attachment of the cells to the polyethylene foam.

Biomass determination – Biomass dry weights were performed using 0.45m pore Sartorius membranes, dried in a vacuum oven at 60°C for 24h.

Substrate determination – Sucrose was determined by the dinitrosalicylic acid method, described by Miller (11), after previous hydrolysis with 1N HCl at 100°C for 10 min.

Ethanol determination – The ethanol was determined by gas chromatography, using butanol as the internal standard.

Viability – Yeast viability was estimated by the method described by Lee et al. (7).

Steady state – Determination of steady state

in the reactor was carried out by means of the CO₂ produced and measured during a given time interval. It was considered that steady state had been achieved when the CO₂ production rate was constant.

RESULTS AND DISCUSSION

Modelling cell growth and ethanol production

– The reactor was operated with increasing dilution rate from 0.054h⁻¹ up to 0.84h⁻¹, considering an individual stage. The experimental results obtained are shown in Figure 2. Biomass concentration represents only the free cells in the reactor, the immobilized cells were not considered for modelling purpose. The cell concentration (X) increases from stage to stage but decreases with increasing dilution rate (D). Substrate concentration (S) and viability (V) increase with increasing D. Maximum conversion, about 75%, was achieved at D equal to 0.054h⁻¹ and the viability is almost 100% at a dilution rate greater than 0.3h⁻¹. The ethanol concentration (P) increases from stage to stage and decreases with increasing D. The maximum concentration was 44.7g.l⁻¹ at the 6th stage for D equal to 0.054h⁻¹.

The model that best fitted the experimental data is represented by the following equation:

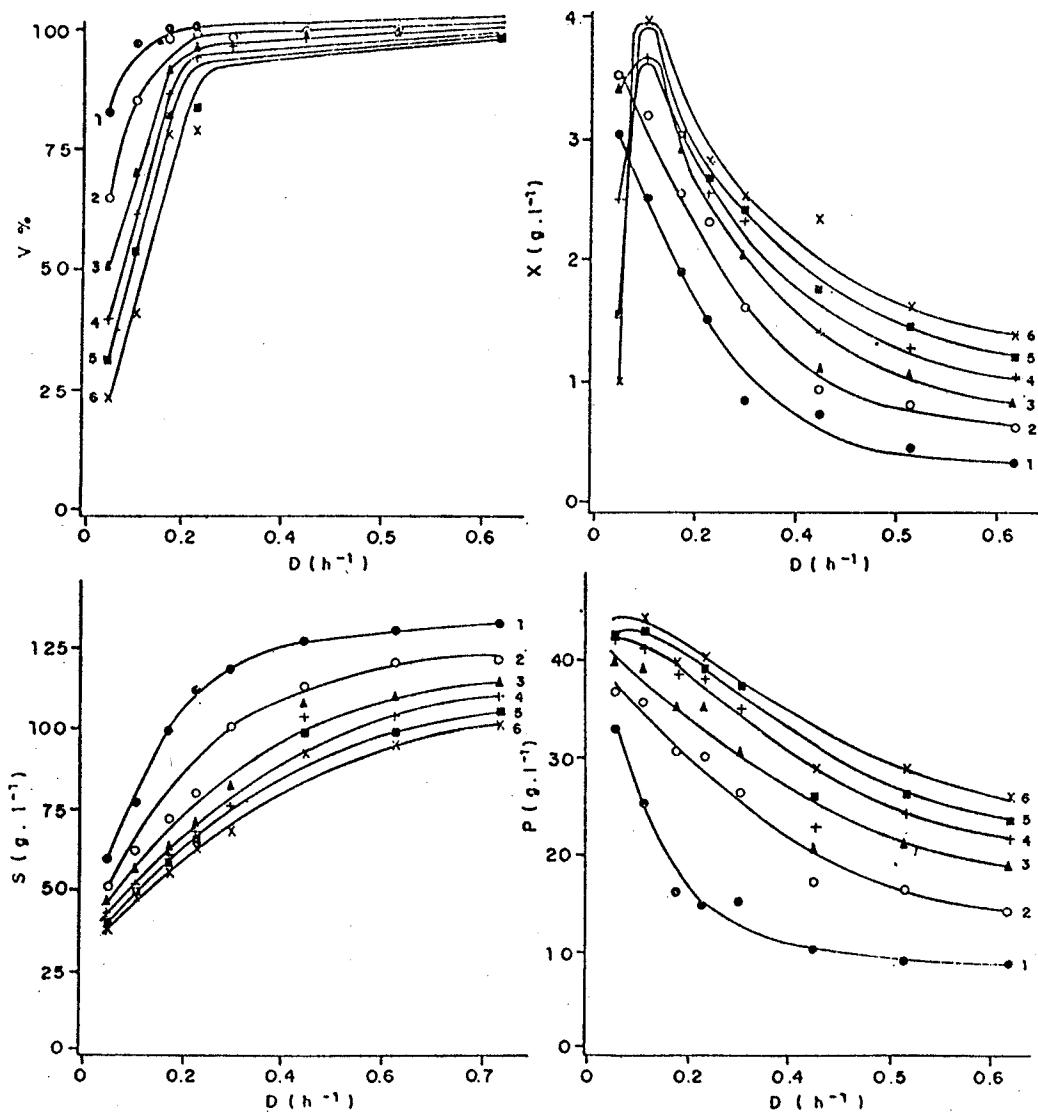


Figure 2 – Effects of the dilution rate (D) on the biomass (X), substrate (S), and ethanol (P) concentrations and on the viability (V%), in each stage (1–6).

$$\mu^{\text{app}} = \mu_{\max}^{\text{app}} \frac{S}{K_s + S} \frac{(P_{\max} - 1)^r}{P} \quad (1)$$

where μ^{app} is a hypothetical specific growth rate, μ_{\max}^{app} a constant that has a practical meaning as the critical μ^{app} value when $P \approx P_{\max}$ and r depends on the inhibitory effects.

The constants μ_{\max}^{app} , P_{\max} and r were determined by plotting $\ln \mu^{\text{app}}$ vs $\ln (P_{\max}/P - 1)$, considering $S/(K_u + S)$ equal to 1 (Figure 3).

The value of P_{\max} was found according to the best correlation obtained from the linear regression of the data.

It was previously verified (10) by means of stimulus-response techniques, that each reactor

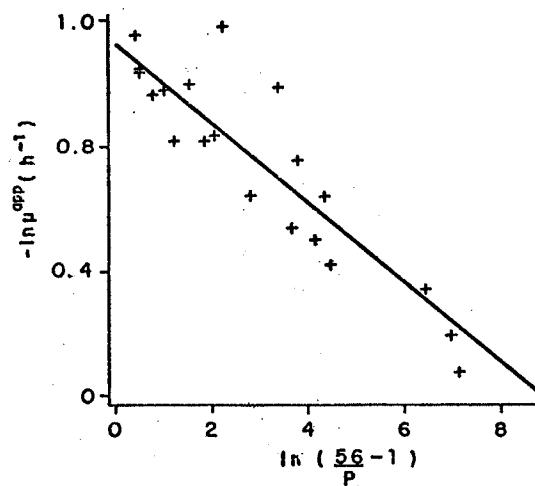


Figure 3 – Graphical determination of the kinetic constants, μ_{app}^{\max} , P_{\max} and r .

stage acted as a CSTR. Then, the cell mass balance in each stage at the steady state gives the following equations for μ^{app} :

$$DX_{i-1} - DX_i + \mu^{\text{app}}_i X_i = 0 \quad (1)$$

then

$$\mu^{\text{app}}_i = \frac{D(X_i - X_{i-1})}{X_i} \quad (2)$$

At the first stage $X_{i-1} = 0$, so

$$\mu^{\text{app}}_1 = D$$

Values for μ^{app} in Figure 3 were determined from data of all experimental trials, using the equation 2. Values for μ^{app} below 0.02 h^{-1} were not considered due to low accuracy. Therefore, the slope of the curve in Figure 3 gives the r value and the intercept, μ_{app}^{\max} which are 1.22 and 0.0788 h^{-1} , respectively. The best linear correlation leads to P_{\max} equal to 56 g.l^{-1} .

Comparison of the model with experimental data is shown in Figure 4.

The model predicts quite well the X values, while the P and S values are slightly different from the model's prediction, particularly at high μ^{app} .

Modelling cell viability – The model was developed considering the average cell residence

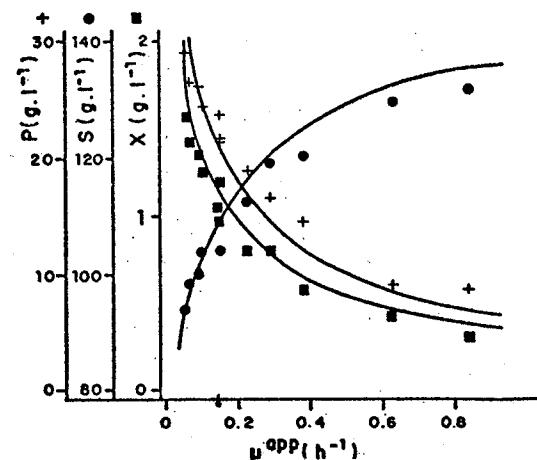


Figure 4 – Comparation of the model with experimental data.

time in each stage, and ethanol concentration. The cell residence time is defined as

$$T_c = \frac{\text{cell mass in the reactor}}{\text{cell with drawn rate}} = \frac{VX}{FX}$$

However, the reactor has more than one stage, so that the total cell mass, VX , is represented by $V(X_1 + \dots + X_i)$, since all the stages have the same working volume. So, the cell residence time for cells leaving the i^{th} stage, c_i , is represented by the equation (3).

$$T_{c1} = \frac{\text{total cell concentration from } 1^{\text{st}} \text{ to } i^{\text{th}} \text{ stage}}{\text{cell with drawn rate at the } i^{\text{th}} \text{ stage}} \\ = \frac{V(X_1 + \dots + X_i)}{FX_i} \quad (3)$$

The model that best fitted to the experimental data is represented by the following equation:

$$V\% = \frac{100 \exp(-c(\tau c_i P)^m)}{P_{\max} \cdot P} \quad (4)$$

P_{\max} was considered equal to 56 g.l^{-1} , as previously determined, while the other constants, c and m , were determined taking the double logarithm of expression (4),

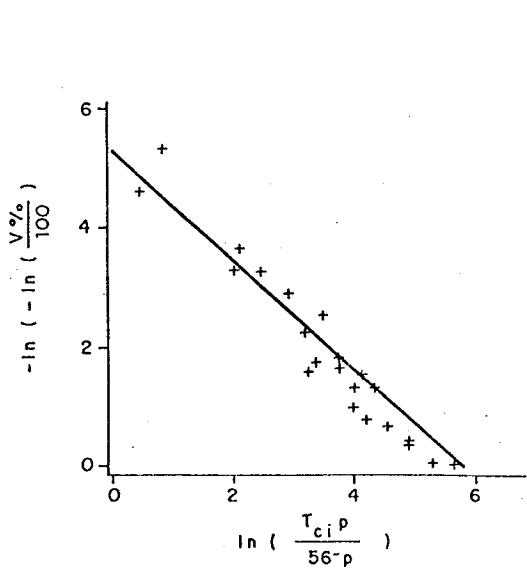


Figure 5 – Graphical determination of the kinetics constants, c and m .

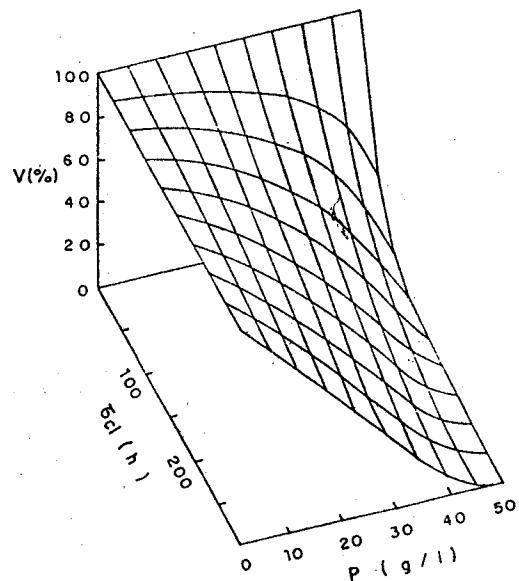


Figure 6 – Cell viability predicted by the model as a function of the average cell residence time in each reactor (τ_{ci}) and the ethanol concentration (P).

$$\ln \frac{(V\%)}{100} = -C \frac{(\tau_{ci}P)^m}{P_{max} - P} \quad (5)$$

and

$$\ln (-\ln \frac{(V\%)}{100}) = \ln C + m \ln \frac{(\tau_{ci}P)}{P_{max} - P} \quad (6)$$

and plotting $\ln(-\ln \frac{(V\%)}{100})$ vs $\ln \frac{(\tau_{ci}P)}{P_{max} - P}$ as shown in Figure 5.

The slope of the curve gives the m value and the intercept, the c value, which are 0.0047 and 0.953, respectively.

The tridimensional graphic shown in Figure 6 represents the variation of cell viability as function of the cell residence time and ethanol concentration, as predicted by equation (4).

It can be seen from Figure 6 that with increased ethanol concentration and increased cell residence time in the reactor, cell viability is decreased.

Nomenclature

- c constant (model for cell viability)
- D dilution rate (h^{-1})
- K_s substrate limitation constant (g.l^{-1})
- m exponent of the model for cell viability
- P ethanol concentration
- P_{max} ethanol concentration above which cells do not produce ethanol (g.l^{-1})
- r exponent of product inhibition term (model for immobilized cells)
- S substrate concentration (g.l^{-1})
- $V\%$ cell viability percentage
- X cell concentration (g.l^{-1})
- V working volume (l)
- F flow rate (l.h^{-1})

Greek letters

- μ_{app} apparent specific growth rate (h^{-1})
- μ_{app} critical apparent specific growth rate (h^{-1})
- τ_c cell residence time (h)

Subscripts

- i indicates the reactor stage (1 to 6)

RESUMO

A produção de álcool e a viabilidade celular foram modelizadas em reator cascata com células imobilizadas em esponja de polietileno. A produção de álcool pode ser prevista a partir de um modelo baseado em constantes cinéticas aparentes, relacionadas às células livres presentes no esfúlente do reator. A viabilidade mostrou ser função tanto da concentração alcóolica como do tempo de residência celular no reator. Ambos modelos são simples, com constantes cinéticas facilmente obtidas a partir de dados de culturas contínuas.

ACKNOWLEDGMENTS

This project was supported by grants from FAPESP.

REFERENCES

- Black, G.M. - Immobilized biomass systems. European Brewery Convention Symposium on Biotechnology - Monograph IX - Nutifield, 1983.
- Black, G.M. and Webb, C. - A practical technology for cell immobilization based on novel biomass support particles. VIth Australian Biotechnology Conference, Brisbane, 1984.
- Black, G.M.; Webb, C.; Matthew, T.M. and Atkinson, B. - Practical reactor system for yeast cell immobilization using biomass support particles. *Biotechnol. Bioeng.*, 24:134-141, 1984.
- Chibata, I.; Tosa, T. and Fujimura, H. - Immobilized living microbial cells. *Ann. Rep. Ferment. Proc.*, 6:1-22, 1983.
- Gódia, F.; Casas, C. and Solà, C. - Mathematical modelization of a packed-bed reactor performance with immobilized yeast for ethanol fermentation. *Biotechnol. Bioeng.*, 30:836-843, 1987.
- Hamancı, H. and Ryu, D.D.Y. - Performance of tapered column packed-bed bioreactor for ethanol production. *Biotechnol. Bioeng.*, 29:994-1002, 1987.
- Lee, S.S.; Robinson, F.M. and Wang, H.Y. - Rapid determination of yeast viability. *Biotechnol. Bioeng.*, 11:641-649, 1981.
- Luong, J.H.T. - Cell immobilization in carrageenan for ethanol production. *Biotechnol. Bioeng.*, 27:1652-1661, 1985.
- Melick, M.R.; Karim, M.N.; Linden, J.C.; Dale, B.E. and Mihaltz, P. - Mathematical modeling of ethanol production by immobilized *Zymomonas mobilis* in a packed-bed fermenter. *Biotechnol. Bioeng.*, 29:370-382, 1987.
- Milanese-Rubilar, A.A. - Aspectos cinéticos e operacionais da fermentação alcóolica contínua em fermentador cascata com células livres e imobilizadas. Campinas, UNICAMP, 1986 (MSc Thesis).
- Miller, G.L. - Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chem.*, 31:426-428, 1959.
- Rodovich, J.M. - Mass transfer effects in fermentations using immobilized whole cells. *Enzyme Microb. Technol.*, 7:2, 1985.

Recebido para publicação em 30/5/89

PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *SPIRULINA MAXIMA* PARA ALIMENTAÇÃO HUMANA E ANIMAL

Rogério Lacaz Ruiz¹
Eduardo do Nascimento Mós²

RESUMO

Spirulina maxima é uma cianobactéria filamentosa pluricelular fotossintetizante; cresce naturalmente em lagos alcalinos com altas concentrações de sais. Sua biomassa é extraída do Lago Texcoco (México) e Lago Tchad (Tchad) e consumida como suplemento proteico. A partir da década de 70 seu cultivo foi otimizado no Lago Texcoco incluindo-se um sistema de bombeamento para agitação da cultura. Posteriormente a biomassa é então concentrada, pasteurizada, filtrada, lavada e seca (processo semi-natural). Muitos países (e.g. Itália, Japão, EUA) iniciaram a produção utilizando meio de cultura definido (sintético). A produção de biomassa desta cianobactéria é resumidamente descrita nesta revisão, e sua utilização como fonte proteica alternativa não pode ser desprezada pelos países carentes de alimentos.

INTRODUÇÃO

A necessidade proteica é uma constante na alimentação humana e animal. Se conseguirmos produzir maior quantidade de proteína por área em função do tempo e satisfazer as necessidades proteicas mínimas de animais, e em última análise do homem, é razoável que não descartemos este fato como possível solução para o problema da fome em algumas regiões (Ciferri, 1983).

A produção de proteína de microrganismos cultivados "in vitro" para alimentação é uma via alternativa de disponibilidade de fonte proteica. Este tipo de proteína é conhecida como proteína unicelular, do inglês "single cell protein" (SCP), e abrange os fungos, as algas, as bactérias e, particularmente as cianobactérias (Litchfield, 1977).

Tacon & Jackson (1985) enumeraram as seguintes vantagens das cianobactérias como fonte alternativa proteica: 1. capazes de utilizar fontes de carbono inorgânico e orgânico; 2. possuem em torno de 40-70% de proteína bruta em função da espécie; 3. tempo de geração curto em condições ótimas (bactéria dobra a biomassa em 0,5-2h, levedura em 1-3h e alga 2-6h); 4. facilmente cultivadas em pequenas áreas com produção contínua; 5. passíveis de manipulação genética para alterar a composição nutricional desejada.

Tomemos então o caso singular das *Spirulina* spp., que possuem de 50% a 72% de proteína bruta na matéria seca, com uma produção de até 20g/metro quadrado/d (Clément, 1975; Oron et alii, 1979).

Existem atualmente no mundo quatro indústrias que produzem espirulina em larga escala:

1. Depto. de Criação de Ruminantes e Alimentação Animal, FMVZ/USP, Campus de Pirassununga - SP
2. Depto. de Microbiologia ICB/USP, Cidade Universitária - SP

uma no Japão, uma na China, uma na Tailândia e uma no México, sendo que a última produz 200 toneladas dessa cianobactéria seca por ano (Yanagimoto & Saitoh, 1982).

Classificação de *Spirulina maxima*

Spirulina maxima é uma cianobactéria filamentosa pluricelular fotoautótrofa, de ambiente aquático de elevada salinidade e alcalinidade, não heterocistada, que se divide somente em um plano, compreendida na Seção III de RIPPKA et alii (1979) com teores de guanina e citosina (G + C mol%) igual a 44-54.

Segundo Florenzano (1984), as espirulinas não fixam nitrogênio.

Misheskaya et alii (1983) encontraram na parede celular de *Spirulina maxima* lipopolissacáideos das bactérias gram negativas, diferindo somente na ausência do ácido beta-hidroximirístico. Também na parede celular de *Spirulina maxima*, Kataoka & Misaki (1983) encontraram 56% de proteína, 22% de lipídeos, e 10% de carboidratos (D-glucose [6,1%]; D-galactose [27,8%]; D-xilose [5,6%] e pequena percentagem de L-ramnose).

Distribuição geográfica

As espirulinas vivem em meios líquidos específicos ricos em sais minerais compostos principalmente por bicarbonato e carbonato de sódio, com pH de 8 a 11. As regiões propícias são as tropicais e subtropicais quentes e ensolaradas. Isoladas no México, Tchad, Etiópia, Quênia, Zaire, Zâmbia, etc., constituindo um dos raros exemplos de cianobactérias continentais utilizadas naturalmente como alimento humano e animal. (Abdin El Sherif & Clément, 1982).

Em outras regiões do globo, como na República Árabe do Egito, foram isoladas no ano de 1977 espécies de espirulina crescendo em estado natural. Os lagos Abou Gobara e El Khadra, situados na depressão de Wadi el Natroun no norte egípcio, são somente explorados pela riqueza salina, poderão ter mais uma fonte de proteína como a espirulina conforme estudos de Abdin El Sherif & Clément (1982).

Espirulina como alimento

O interesse suscitado pela pesquisa de novas fontes de proteína levou numerosos pesquisadores a estudar as *Spirulina* spp., já utilizada como

alimento no México e África desde tempos imemoráveis. Possui elevados teores protéicos, contendo todos os aminoácidos essenciais em proporções que satisfazem as recomendações da Food and Agriculture Organization (FAO), exceção metionina, cujos níveis estão abaixo dos requeridos para o homem (Kosaric et alii, 1974).

O uso de *Spirulina* spp. na dieta humana e ração animal já foi descrito na literatura. Os seguintes casos merecem citação, pois ilustram bem a diversidade de experimentos e descobertas já realizadas.

A biomassa de espirulina seca era consumida pela população asteca residente nas proximidades do Lago Texcoco na época da colonização espanhola. Tenochtilán (atual cidade do México), densamente povoada na época da colonização espanhola, possuía praças e mercados onde a espirulina era vendida com o nome de "tecuatlal" Diaz Del Castillo (1983).

Uma série de textos históricos abordam o tema do tecuatlal, posteriores a Diaz Del Castillo e estão reunidos em Fárrar (1966). Neste artigo, o autor cita a solução de continuidade no costume de ingerir espirulina e responsabilidade a ocupação espanhola, que trouxe novos hábitos, associada aos repetidos surtos de doenças nos nativos, como principais causas do abandono no consumo do tecuatlal.

No estado natural, as espirulinas crescem nas águas alcalinas do Lago Texcoco, ricas em bicarbonato e carbonato, formando aglomerados de biomassa na superfície da água. Esta biomassa era então recolhida com ajuda de uma malha de tecido e seca ao sol na superfície das pedras e consumida com o nome de "tecuatlal" i.e. excreta de pedras no dialeto local (Clément, 1975).

A espécie *Spirulina maxima* existe atualmente em estado semi-natural no lago Texcoco, e vem sendo extraída por uma indústria que produz uma tonelada por dia de matéria seca. Seu cultivo, à semelhança do estado semi-natural, é feito em meio sintético e dependente de grande superfície de exposição à luz. Etapas sucessivas de concentração, pasteurização, filtração e lavagem, seguida de secagem, são realizadas na obtenção de um produto final rico em pigmentos carotenoídes e proteína (Durand-Chastel, 1980).

Segundo Asturias (1977) a espirulina esteve esquecida durante cinco séculos, i.e. desde que os costumes europeus chegaram ao continente americano. Em 1967, técnicos do Institut Français du Pétrole (IFP) forneceram assessoria à companhia Texcoco Sosa SA, que, a partir de setembro de

1972, produz 1 ton/d de espirulina seca e pasteurizada. Tecuitlatl - assim denominavam os nativos à espirulina - ressurge como uma nova riqueza na região, sendo seu uso bastante difundido na alimentação mexicana atual.

O continente africano possui uma grande quantidade de lagos salgados (Beadle, 1974) e o primeiro relato de que se tem notícia da presença de espirulina nestes lagos foi o de Jenkin (1929). Em uma carta ao editor da Nature, comenta suas observações nos lagos alcalinos do Vale Rift no Quenia. Notificou a presença de *Spirulina* sp. nos lagos Crater, Elmenteita e Nakuru, e no interior do estômago de um flamingo.

Rich (1931) justificou a presença de *Arthrosira* (= *Spirulina*) *platensis* nos lagos do Vale Rift no leste de África como principal fonte alimentar de pequenos flamingos (*Phoenicopteca* sp.) habitantes desta região. Comentando o artigo de Jenkin (1929), acrescentou o ciclo completo de matéria orgânica na cadeia alimentar, envolvendo a espirulina. As cianobactérias são ingeridas pelos copépodos ou pelos cladoceros, que posteriormente servem de alimento aos peixes e finalmente às aves.

Em 1940, Dangeard relatou a presença de *Arthrosira* (= *Spirulina*) *platensis* no Lago Tchad na então África Equatorial Francesa, hoje República do Tchad. Essa biomassa de "alga azul espirulada" era vendida seca em um mercado de Massacory a 50km do Lago Tchad, para ser então utilizada como molho acompanhante da dieta padrão de milhete.

Brandily (1959), em um artigo de divulgação do potencial das algas microscópicas, tece alguns comentários dos hábitos alimentares da tribo Kanem ao norte do Tchad e, particularmente, o modo de manipular a biomassa ("douhé" do Lago Tchad).

A expedição liderada por Petiniot que atravessou a África, do Oceano Atlântico ao Mar Vermelho pelo deserto do Saara, nos anos de 1964-5, teve suas observações recolhidas em um artigo no Nature escrito por Léonard (1966), um dos participantes da exploração. Curiosamente, o autor tem a preocupação meramente descritiva, e redescobre a espirulina sem saber dos relatos de Jenkin (1929), Dangeard (1940) e Brandily (1959). Uma torta verde achatada, vendida com o nome de "dihe" - descreve o autor - pode ser comprada no mercado de Fort Lamy, atual N'djamena (Tchad), proveniente de manchas verdes, que aparecem sazonalmente no Lago Tchad e que são secas e consumidas pela população local.

Duas amostras, uma do Lago Tchad e outra de uma lagoa na cidade de Ounianga Kebir, analisadas por Compère a pedido de Léonard (1966) são tidas como *Spirulina platensis*.

Com estas informações, tudo leva a crer que a amostra proveniente do Lago Tchad estudada por Clément et alii (1967) consiste de *Spirulina platensis* e não *Spirulina maxima*.

Delpuech et alii (1975) e Sautier & Trémolières (1975) efetuaram revisão que demonstram o interesse nas pesquisas com a espirulina nesta região do planeta e a perspectiva desta fonte proteica natural e o exemplo desta população que praticamente substitui a carne pela espirulina como fonte de proteína.

Em 1963, o Institut Français du Pétrole (IFP) iniciou os estudos com espirulina em meio sintético a partir das observações feitas em suas colônias na África, e concluiu que este microrganismo possui um crescimento mais rápido se comparado às plantas superiores; é rico em proteína - 70% PB/MS; vem sendo consumido desde tempos imemoráveis pelos astecas e tribos do Tchad, sendo portanto atóxico (Clément, 1971). O IFN tem grande interesse em aproveitar os gases provenientes da combustão dos derivados do petróleo com fonte de carbono para microrganismos fotosintetizantes, visando desta maneira reduzir a poluição atmosférica por compostos tóxicos e obtendo uma biomassa que gera oxigênio e representa uma excelente fonte de proteína alimentar.

Jacquet (1976) descreve a possibilidade de utilização de espirulina na nutrição humana e também animal (moluscos, peixes, aves e mamíferos).

Garcia-Badell (1985) inclui as *Spirulina* spp. entre as algas cultivadas possível de serem utilizadas na dieta humana e ração para peixes como fonte proteica.

A espirulina já foi testada como complemento na ração de várias espécies. Bicho da seda, animais de laboratório, suínos, ruminantes, peixes e aves são alguns exemplos, conforme observamos nos seguintes estudos.

Hou & Chen (1981), concluíram que a espirulina liofilizada pode substituir o farelo de soja em níveis de 20-40% da ração de larvas do bicho da seda (*Bombyx mori*). A vantagem da espirulina sobre a soja é que não exige o tratamento complexo e custoso para retirada de substâncias inibidoras do crescimento, presente nesta leguminosa.

Bourges et alii (1971) testaram a tolerância

de ratos de laboratórios à ingestão de dieta rica em espirulina num período de 100 dias. Nenhuma anormalidade histológica foi encontrada em todas as vísceras examinadas.

Chung et alii (1978) produziram biomassa de espirulina a partir de efluentes de biodigestor carregados com fezes de suínos. Os objetivos foram os de verificar a possibilidade deste tipo de excreta ser utilizado como meio de cultura e também de analisar a composição químico-nutritiva da biomassa de espirulina produzida nos efluentes de biodigestores com fezes suínas como alimento para ratos de laboratório. Os ratos que ingeriram espirulina, não apresentaram qualquer alteração histopatológica no fígado, pulmão, rim, coração, baço, estômago, intestino e linfonodos.

Devi & Venkataramam (1983) utilizaram espirulina na ração com níveis protéicos de 10 e 15% para ratos albinos. Estes autores não observaram diferença no crescimento dos ratos quando comparados com o controle sem espirulina. Os níveis de colesterol reduziram-se de 14% nos animais com ração de 15% PB de espirulina. O efeito hipocolesterolêmico é devido ao ácido eicosapentaenoico [EPA], presente neste microrganismo. Trata-se de um ácido graxo poli-insaturado capaz de diminuir os níveis séricos de colesterol (Klausner, 1986).

Février & Séve (1975) substituíram parcialmente a fonte de proteína tradicional da ração de leitões por biomassa seca de *Spirulina maxima*. Os níveis de substituição não podem, segundo estes autores, exceder 25% da dieta total proteíca. Os leitões de 1 a 5 dias são mais sensíveis aos níveis de substituição acima de 25%, pois a espirulina compromete o ganho de peso destes animais por fornecimento insuficiente de substâncias digestíveis. Trabalhando também com suínos, Rodler Cabrera et alii (1975) utilizaram espirulina como fonte proteíca. Concluíram que é factível o uso desta ciano bactéria no arraçoamento suíno, considerando porém a necessidade de adicionar lisina sintética como aminoácido limitante.

Yap et alii (1982), relataram que *Spirulina maxima* se mostrou apta para ser oferecida aos leitões de 4-8 dias de idade quando fornecida como 50% da fonte proteíca em substituição à soja. Não houve redução no ganho de peso quando comparados com animais alimentados à base de farelo de soja-milho-leite em pó. Os exames histopatológicos dos órgãos do trato gastrointestinal, rins, adrenal e fêmur não demonstraram

qualquer alteração anatomo-patológica.

A espirulina também foi utilizada com sucesso, como substituta do concentrado proteíco na ração de bezerros e novilhos (Calderón-Cortés et alii, 1976).

Matty & Smith (1978), observaram que a truta arco-íris (*Salmo gairdneii*) é capaz de se alimentar de *Spirulina maxima* a nível de 40% por períodos superiores a 10 semanas sem alterações anatomo-patológicas. O estudo do valor específico da proteína para truta sugere níveis não superiores a 25% na ração para evitar um crescimento inferior àqueles dos padrões zootécnicos.

Attack et alii (1979), com o objetivo de testar fontes de proteína não convencionais, utilizaram *Spirulina maxima* como única fonte proteíca para carpa (*Cyprinus carpio*). Os resultados do experimento demonstraram que *Spirulina maxima* é comparável à soja (*Glycine max*) como fonte proteíca, e que existem outros probióticos mais eficientes do ponto de vista microbiológico e zootécnico, com melhor conversão alimentar e ganho de peso.

Tacon & Jackson (1985), assinalam a possibilidade de se utilizar *Spirulina maxima* como fonte proteíca para peixes, sendo o aminoácido essencial limitante a metionina.

Hirano & Suyama (1985) balancearam uma ração para o peixe ayu (*Plecoglossus altivelis*), substituindo parcialmente a fonte proteíca de farinha de peixe e farelo de soja por níveis de 50% de *Spirulina* sp.. Os resultados do tratamento com níveis de 50% de cianobactéria demonstram mudanças positivas e características na coloração de pele, aumento no ganho de peso, comprimento e altura, quando comparados com o controle sem espirulina.

Os salmonídeos são incapazes de sintetizar pigmentos e satisfazem as suas necessidades através da ingestão de crustáceos e insetos. Em condições artificiais de manejo, este pigmento é suplementado na ração. A utilização de espirulina dentro deste contexto apresenta a vantagem de poder ser incorporada na ração também como fonte de proteína, lípideo e vitamina. Choubert (1979) estudando o efeito pigmentante de espirulina, concluiu que a mesma é totalmente eficaz como fonte de pigmento por este não ser totalmente incorporado em truta em níveis satisfatórios (*Salmo gairdnerii*).

Klausner (1985) relata em seus estudos as vantagens de fornecer espirulina na dieta de salmonídeos após verificar o aumento da proporção de fêmeas e o atraso na maturidade sexual dos

machos. Estes dois fenômenos são almejados dentro da aquicultura.

A utilização de espirulina como fonte proteico-pigmentante na ração de aves é amplamente difundida.

Cuca (1974), observou que a espirulina na dieta de frangos de corte substitui com êxito os corantes naturais ou sintéticos adicionados na ração por possuir 1,5g de xantofila por quilograma de proteína seca, oferecendo vantagem econômica ao produtor por se tratar de uma fonte proteico-pigmentante.

São as xantofilas (zeaxantina e luteína) pigmentos que podem ser utilizados pelas aves, apesar de não possuirem nenhuma atividade nutritiva fisiológica (Dobon, 1986).

O elevado teor de proteína (50-60% PB/MS) e xantofila (1,5g/Kg) fazem da espirulina uma excelente fonte proteico-pigmentante para galinhas de postura. Bezares-Sansores et alii, (1976) utilizaram os níveis de 7,5 e 10,0% na ração de poedeiras, proporcionando uma coloração amarela intensa no bico, tarso e pele, enquanto as gemas dos ovos ficaram avermelhadas. Não houve nenhuma alteração na taxa de postura, peso médio dos ovos e conversão alimentar. Estes fatos confirmam o poder pigmentante da espirulina para aves poedeiras. Níveis inferiores, como os de 2-3% equivalem a 30-45mg de xantofila por quilograma de alimento, o que confere índices aceitáveis de coloração da gema a nível de mercado.

Marquez et alii (1974) verificaram que a substituição da soja (*Glycine max*) por espirulina (*Spirulina maxima*) é vantajosa até níveis de 25%, levando-se em conta o ganho de peso, consumo de alimento e conversão alimentar de frango de corte.

A adição de espirulina a nível de 5% em dietas de frango de corte, confere boa pigmentação no tarso dos animais e não interfere no ganho de peso e conversão alimentar. Testes com valores percentuais de 10 a 15% demonstraram que é necessário um novo balanço energético para que os animais não percam peso (Bezares-Sansores et alii, 1977).

Brune (1982) administrou *Spirulina maxima* como única fonte proteica para frangos de corte e concluiu que: (1) o efeito inibitório do crescimento padrão da linhagem em estudo é compensado total ou parcialmente pela adição de vitamina A e suplementação de metionina; (2) a espirulina se mostrou efetiva como promotora de crescimento após a retirada do extrato etéreo; (3) o

fator limitante do crescimento provavelmente está no extrato etéreo da cianobactéria.

A fração do extrato etéreo que atua como fator limitante do crescimento do frango de corte é passível de ser removida (Vincenzini et alii, 1984).

Composição química

Paoletti et alii (1981) trabalhando com 10 cepas de *Spirulina maxima* de origem africana e centro-americana em cultura massiva ao ar livre, obtiveram os seguintes valores médios percentuais: proteína bruta, 60,0; lipídios, 15,0; carboidratos, 16,0; cinzas, 9,0; ácidos nucleicos, 4,3.

Podemos observar paralelamente os valores obtidos por Soeder (1981): proteína bruta, 56,0-74,0; lipídios totais, 6,0-7,0; lipídios insaponificáveis, 1,2; carboidratos, 16,0-18,0; ácidos nucleicos, 4,0; cinzas, 4,0-5,0.

Dentre as características de *Spirulina maxima*, podemos assinalar os altos teores de proteína de boa qualidade, lipídios, carboidratos e pigmentos (clorofila a, carotenóides e ficolíbinas) -as ficolíbinas são responsáveis pela coloração verde azulada -.

Vincenzini et alii (1984), ao estudarem a possibilidade de retirar da biomassa os pigmentos e demais frações, obtiveram os seguintes valores: fração lipídica (15%) e fração proteica (85%, sendo que 5,5 por mil de ficolianobilina e 80% de proteína incolor).

Léonard & Compère (1967) foram os primeiros a verificarem o elevado teor proteico de *Spirulina platensis*, em torno de 50% da matéria seca.

Clément et alii (1967) obtiveram teores de proteína em torno de 62 a 68% na matéria seca quando cultivaram a espirulina em laboratório com meio de cultura sintético e iluminação artificial.

Os teores de PB/MS variam em função da técnica de produção utilizada, chegando até 75%. Teores de nitrato, método de secagem e descoloração, são fatores técnicos que influenciam decisivamente o nível e qualidade da proteína do produto final (Clément, 1975).

Voronkova et alii (1980) descreveram complexos proteico-pigmentantes onde um está intimamente ligado ao outro. Os aminoácidos podem ser encontrados livres ou na forma de proteínas. Os pigmentos ligados às proteínas na forma de

complexos, nas espirulinas são: clorofila, carotenóides, ficocianina e aloficocianina.

A ficocianina é o principal pigmento acessório da fotossíntese, podendo ser separada em duas biliproteínas: a c-ficocianina e a aloficocianina. O interesse no estudo dos pigmentos das cianobactérias é grande, tanto pelo efeito pigmentante como proteico, uma vez que as biliproteínas compreendem grande parte da proteína total capaz de ser metabolizada pelos homens e animais (Bousbiba & Richmond, 1979).

Os pigmentos carotenóides de *Spirulina maxima* foram quantificados por Paoletti et alii (1981) e apresentam os seguintes valores em g/Kg de biomassa seca: beta-caroteno (1,40); echinenoa (0,40); criptoxantina (0,09); 4-queto-3'-hidroxi-beta-caroteno (0,45); zeaxantina (0,68); mixoxantofila (1,68); oscillaxantina (0,30), com um conteúdo de 5,0 g/Kg de carotenóides totais e 13,0 g/Kg de clorofila a (responsável pela coloração verde).

O pigmento ficobiliproteíco, que confere a coloração verde azulada, é tido como substância de reserva de fotopigmento e proteína (Florenzano, 1984).

A quantidade de ácidos nucléicos em *Spirulina maxima* é de 2,63 g/100 g de biomassa seca (Jassey et alii, 1971).

Soeder (1981) obteve os seguintes valores percentuais de ácidos nucléicos nos diferentes microrganismos: 18 para *Pseudomonas methylo-trophia*, 4 para *Spirulina maxima*, 8 para *Candida lipolytica* e 3-4 para *Scenedesmus acutus*.

O teor de ácido nucléico da farinha de espirulina é 6%, sendo que a quantidade de ARN (4,5%) é superior a de ADN (1,5%) (Anusuya Devi & Venkataraman, 1984).

A espirulina contém também o ácido gamma linoléico, considerado um dos melhores princípios ativos hipotensivo (Clément, 1971).

Materassi et alii (1974) foram os primeiros a considerar as espirulinas como fonte cianobacteriana de vitamina B12.

Paoletti et alii (1981), sugeriram *Spirulina maxima* como suplemento vitamínico por apresentar a seguinte composição de vitaminas lipossolúveis em mg/Kg de peso seco: provitamina A (1400); vitamina E (140); vitamina K (90); vitamina F (1300); vitamina B1 (54); vitamina B2 (41); vitamina B6 (3); vitamina B12 (6); biotina (0,4); inositol (340); ácido fólico (0,6); pantotenoato de cálcio (11) e vitamina C (70).

Meio de Cultura

O crescimento de qualquer ser vivo depende de uma fonte de carbono e de energia. Os nutrientes podem estar disponíveis no estado natural ou serem fornecidos em um sistema artificial.

A espirulina necessita de íons sódio, associados aos íons bicarbonato e carbonato, que asseguram o fornecimento de carbono.

O cultivo de espirulina ocorre de uma maneira natural, artificial ou ambas no caso semi-natural.

Diferentes meios de cultura foram testados e descritos na literatura, com objetivos e resultados bastante variados. Garcia-Badell (1985) recomenda os seguintes sais (g/l): K₂HPO₄, 0,5; NaHCO₃, 16,0; NaNO₃, 2,7; MgSO₄, 6,0; FeSO₄, 6,0; K₂SO₄, 1,0; NaCl, 1,0.

As espirulinas respondem com um aumento de produção de cisteína sem afetar os teores de metionina quando o sulfato é substituído pelo sulfito como fonte de enxofre (Pushparaj et alii, 1975). Trabalhos como este demonstram que é possível alterar na prática, a composição de aminoácidos desta cianobactéria sem alterar o genoma.

Clément et alii (1968) sugerem a utilização do gás carbônico produzido pela combustão dos derivados do petróleo como fonte de carbono na fotossíntese de *Spirulina maxima*. O gás carbônico na atmosfera está na concentração de 0,03% em volume. A utilização dos gases provenientes da combustão funcionam como nutrientes para o cultivo de cianobactérias (Kosaric et alii, 1974).

Faucher et alii (1979) foram os primeiros a experimentar a utilização da água do mar para o cultivo de *Spirulina maxima*, e obtiveram as seguintes conclusões: (1) a água do mar tratada com NaHCO₃ e/ou Na₂CO₃ para remover o excesso de íons cálcio e magnésio, suplementada com K₂HPO₄, NaNO₃ e FeSO₄, constitui um meio de cultura tão bom quanto o melhor meio sintético para *Spirulina maxima*; (2) uréia cristalizada ou polimerizada pode substituir NaNO₃ em menores quantidades para produzir o mesmo resultado em biomassa produzida; (3) os resultados são confirmados tanto para pequena escala em frascos de Roux como em grande escala em tanques abertos, biorreatores do tipo 130L.

Água do mar ou sal marinho como fonte de micronutrientes, e nitrato de sódio puro ou "sal pedra" [NaNO₃-74,5%; KNO₃-21,5%; Na₂SO₄-1,25%; NaCl-1,1%; MgSO₄-0,41%; H₃Bo₃-

0,25%; I2-0,0025%) como fonte de nitrogênio, atendem à produção de biomassa, semelhante ao controle com meio sintético (Ayala & Bravo, 1982).

Posteriormente Ayala et alii (1985) fizeram um balanço das vantagens e desvantagens do uso do mar como meio de cultura para *Spirulina maxima*: possui 35g de sal por litro; é uma boa fonte de micronutrientes; suporta a manutenção de culturas de cianobactérias não marinhas; exige tratamento prévio, pois ocorre competição pelos nutrientes entre a cianobactéria e outras formas de vida marinha, e o sal marinho pode ser transportado e depois reconstituído sem maiores problemas. Sendo o meio de cultura sintético, é inviável para a produção em larga escala, e os resultados em escala piloto são positivos, devemos aguardar os trabalhos anunciados por estes autores para um futuro próximo de produção de espirulina em escala industrial utilizando a água do mar.

Edwardson et alii (1981) assinalaram a vantagem do ponto de vista energético (energia bruta requerida por tonelada em Giga Joules - GER/GJ) do sistema de produção de microrganismos fotossintéticos cultivados em efluentes orgânicos, quando comparados com aqueles cultivados com sais inorgânicos do meio de cultura totalmente sintético. Os valores de 115 contra 252 demonstram claramente o benefício do primeiro em relação ao segundo.

Como os efluentes municipais são ricos em nitrogênio e fósforo, Kosaric et alii (1974) trabalharam no sentido de utilizar este material como meio de cultivo para *Spirulina maxima*. Desta maneira, evitaram a proliferação de algas indesejáveis nos efluentes e removeram o N e P com produção econômica de biomassa para consumo humano e animal. A remoção de nitrogênio é praticamente total e a de fósforo chega a 64% após 8 dias de cultivo. O aumento dos teores de fósforo no meio composto por efluentes não altera a velocidade de utilização de N e P. Este fenômeno explica os elevados teores de nitrogênio na biomassa em relação ao fósforo ($N = 10,0\%$ e $P = 0,5$ a $1,0\%$). A alcalinidade do meio líquido permite a ocorrência de pequena fração nitrogenada na forma gasosa de amônia. O único inconveniente apresentado pelos autores é o de incompatibilidade do sistema de tratamento de efluentes com o aproveitamento de gases provenientes da combustão, uma vez que o pH é regulado pelo fluxo de gás carbônico no meio de cultura. A incompatibilidade dos sistemas de produção de espirulina

em efluentes com o dióxido de carbono como fonte de carbono se deve a uma limitação fisiológica de *Spirulina maxima*. O pH do efluente que serve como fonte de nitrogênio e fósforo para espirulina está entre 6,8 e 7,3, e os valores limites de crescimento de *Spirulina maxima* são valores de pH superiores a 8,0 e inferiores a 11,0. A única maneira de aumentar o pH e fornecer carbono, é adicionar bicarbonato de sódio e não dióxido de carbono que acarreta a uma diminuição do pH. Adicionando CO₂ à cultura ocorre a formação de ácido carbônico que diminui o pH (Fox, 1983).

Shapiro (1973) demonstrou que as cianofíceas são mais eficientes no aproveitamento de dióxido de carbono em baixas concentrações no meio líquido quando comparadas com as algas verdes. Em circunstâncias em que o pH é acima de 9,0 as cianofíceas são predominantes.

Richmond (1983) também concluiu que altos teores de bicarbonato de sódio e baixo suprimento de CO₂ são identificados como principais fatores mantenedores de culturas monoespecíficas de *Spirulina* sp.

Florenzano (1977) esclarece o perigo de não se utilizar microalgas e cianobactérias específicas no tratamento de efluentes urbanos, uma vez que estes são ricos em nitrogênio e fósforo que permitem o crescimento de algas indesejáveis por possuirem princípios tóxicos, comprometendo posteriormente seu consumo.

A espirulina apresenta ainda a vantagem de produzir penicilinase (beta-lactamase) (Kusher & Breuil, 1977), o que facilita a utilização de fezes animais, independente de estarem ou não em tratamento medicamentoso, como meio de cultura para o crescimento cianobacteriano.

Rogers (1978) inclui *Spirulina maxima* dentre as SCP com as seguintes características quando utilizadas no tratamento secundário ou terciário de efluentes rurais: (1) crescimento lento; (2) exige alteração nos modelos dos fermentadores; (3) apresenta limitação luminosa; (4) 64-70% PB\MS; (5) não patogênica e não tóxica; (6) aceitável como suplemento protéico.

Spirulina maxima foi cultivada em fase líquida de fezes de bovinos (Oron et alii, 1979), com o objetivo de produção de proteína unicelular de alto valor nutritivo e alta digestibilidade. Estes autores concluíram que: (1) é possível a utilização de fezes de bovinos para produção de biomassa de espirulina a ser utilizada, após secagem e esterilização para alimentação animal; (2) a produção está em torno de 3g/litro de sólidos totais; (3) a degradação de matéria orgânica pelas bactérias

celulolíticas é um processo lento; (4) o tempo de retenção para a produção de biomassa pode diminuir, utilizando efluentes de biodigestor, onde os componentes orgânicos estão lisados pelas bactérias metanogênicas no interior do biodigestor anaeróbico, e prontamente disponíveis para a cianobactéria.

Como há um investimento enorme do ponto de vista energético na fabricação de fertilizantes usados na produção da ração animal, e grande parte dos nutrientes são perdidos nos excretas, é uma necessidade reaproveitá-los. A produção de biogás permite aproveitar parcialmente a energia, utilizando o metano, porém o efluente fermentado é rico em nitrogênio e fósforo. A utilização deste efluente como fonte de nutrientes para a produção de *Spirulina maxima* foi feita por WU & Pond (1981), que testaram líquor de efluentes a partir de excretas de bovinos, suínos e aves. Estes autores não encontraram diferenças entre os aminogramas de biomassa de *Spirulina maxima* crescida nos efluentes, quando comparados com o da espirulina crescida em meio sintético. O teor de proteína foi em média de 63,5%; 71,8% para fezes de aves, e 60,1% na de bovinos. Estes valores estão diretamente relacionados com os teores de NH₃-N dos excretas.

Com o objetivo de aproveitar os efluentes municipais, Saxena et alii (1982) utilizaram como meio de cultura material, proveniente de esgoto municipal acrescido de bicarbonato de sódio como fonte de carbono e nitrato de sódio ou uréia como fonte nitrogenada. Os teores proteicos foram em torno de 10-20% inferiores, quando comparados aos 55-60% de PB/MS no meio sintético.

O resultado do trabalho de Saxena et alii (1983) é que *Spirulina* ssp. pode crescer adequadamente em excretas avicolas em meio líquido suplementado com uma mistura de bicarbonato e nitrato.

É possível, segundo Ferraz et alii (1986), utilizar a vinhaça diluída e clarificada como fonte de nutrientes para obtenção econômica de biomassa de *Spirulina maxima*.

Condições de Cultivo

Existem diferentes estados de cultivo de espirulina: natural, como ocorre na África; semi-natural, no caso do lago Texcoco; e o artificial com meio sintético.

Gordon (1970) coloca cinco condições básicas e indispensáveis para o bom crescimento des-

tes microrganismos fotossintetizantes: (1) suprimento de dióxido de carbono; (2) presença de elementos minerais em concentrações adequadas; (3) iluminação com luz de apropriado comprimento de onda e intensidade; (4) manutenção de temperatura ótima em função do microrganismo; (5) agitação adequada das células para prevenir a sedimentação e assegurar a distribuição de dióxido de carbono, nutrientes e luz.

Dentre os vários sistemas artificiais de cultivo de *Spirulina maxima* existe o sistema tubular descrito por Torzillo (1981). Trata-se de um método de cultivo onde o crescimento ocorre no interior de tubos transparentes com fluxo contínuo. O motivo que levou o autor a estudar este sistema foi o de controlar a temperatura da cultura. Os resultados obtidos foram bastante satisfatórios, com diminuição porém dos níveis protécicos nunca inferiores a 50% de PB na MS.

Schaim (1977) estudou o comportamento de *Spirulina maxima* em um aquário de paredes foscas e com iluminação solar na lâmina líquida superior. Comparou o crescimento em condições de aquário coberto e descoberto, com vantagem do primeiro em relação ao segundo. A cobertura transparente, além de proporcionar um crescimento mais acentuado observado a densidade óptica, diminui a evaporação da água tão escassa em algumas regiões de cultivo artificial.

A agitação do meio de cultura é necessária para homogeneizar o cultivo. No interior de um recipiente de cultivo ocorre uma diminuição da intensidade luminosa nas regiões mais profundas pois as cianobactérias das camadas mais superficiais fazem sombra nas camadas mais profundas, prejudicando as cianobactérias que naturalmente precipitam. A movimentação do meio de cultura propicia uma melhor distribuição da luz e também do calor, ocorrendo desta maneira condições uniformes aos seres que nele se desenvolvem (Schaim, 1977).

Clément et alii (1968) observaram que a agitação é necessária para evitar a floculação das bactérias, havendo assim uma melhor eficácia fotossintética.

Condições de crescimento

Kosaric et alii (1974) determinaram os valores limites no que diz respeito ao pH. Houve boa produção de biomassa entre os valores 9,0 e 10,0 com pH ótimo 9,5. Foi observada redução de crescimento em pH 11,0 e inibição total em pH 8,0.

Os valores limites de temperatura para o crescimento de *Spirulina maxima* são de 10 e 45 graus Celsius. Observou-se um bom crescimento entre 30 e 40 graus Celsius no meio sintético e 25 a 35 graus Celsius nos esfuentes. Os autores complementam estes estudos analisando outro fator como o tempo de iluminação. Compararam o crescimento com iluminação contínua e 12 h de luz incidente na cultura, concluindo que a iluminação contínua permite uma performance melhor.

Meio alcalino, com grande quantidade de bicarbonato e carbonato de sódio, pH entre 8,5 e 11,0 e temperatura de 32 graus Celsius são as condições desejáveis segundo Clément (1975).

Santillan (1982) coloca os seguintes limites para o crescimento: pH 9 - 11; salinidade 3 - 8%; temperatura da cultura 7 - 30 graus Celsius.

Garcia-Badell (1985) assinala 33 graus Celsius como temperatura ideal de crescimento, a salinidade deve ser elevada (até 56 g/l) e o pH de 8,5 a 11,0.

Produção

O estudo de Clément et alii (1968), utilizando o gás carbônico como fonte de carbono para *Spirulina maxima*, relata níveis de produção na ordem 15g/metro quadrado/ dia.

A produção de espirulina utilizando esfuentes como meio de cultura está na ordem de 24300 kg/ha/ano, i.e. 6,6g/metro quadrado/dia. (Oswald, 1973).

Clément (1975), tomando como base o período de um ano e utilizando meio sintético, obteve a produção média de 12g/metro quadrado/dia; ou seja, 40 ton/ha/ano, 28 ton de proteína/ha/ano.

Aaronson & Dubinsky (1982) compararam os valores de produção de proteína de espirulina (10-20g MS/metro quadro/d) de 39530Kg/ha/ano com a produção de carne, leite e gramíneas. Estes valores da espirulina equivalem, segundo os autores, a 59 vezes mais que as gramíneas, 395 vezes a produção do leite, e 658 vezes a produção de carne bovina, levando em conta a mesma área e a tecnologia atual em todos os casos.

A produção de biomassa utilizando esfuentes urbanos foi em torno de 7,3 a 9,7g/metro quadrado/dia em cultivo ao ar livre (Saxena et alii, 1982).

Garcia-Badell (1985) assinala o rendimento de 4Kg/dia/100 metros quadrados, i.e. 4,1g/metro quadrado/dia.

Aspectos técnicos e econômicos

Tomaselli et alii (1969) ao relatarem as "prime esperienze in Italia di cultura de *Spirulina platensis*" ressaltam a importância do estudo das cianobactérias como base para o progresso neste campo; do melhor rendimento produtivo das cianobactérias (processo contínuo) em relação à agricultura (processo descontínuo); da proteína produzida como principal produto da fotossíntese.

Do ponto de vista econômico, podemos levar em conta os valores apresentados por Oswald (1973). Em seu trabalho com esfuentes para produção de biomassa de microrganismos fotossintetizantes, afirmou que é requerido 2% da área, 10% da água, 61% da energia, 20% do investimento e 2% dos recursos humanos comparados com a agricultura convencional para produzir igual quantidade de material orgânico disponível.

Contaminação da cultura ao ar livre

A cultura de *Spirulina maxima* a céu aberto é habitualmente contaminada por bactérias e fungos anemófilos. Esta cianobactéria produz substâncias extracelulares (compostos nitrogenados, ácidos orgânicos, vitamina, fatores de crescimento, inibidores, ativadores, etc) que propiciam o desenvolvimento de uma microbiota heterótrofa em culturas não estéreis.

Apesar de *Spirulina maxima* não possuir qualquer princípio tóxico, Jacquet (1976) estudou a microbiota associada a biomassa de *Spirulina* spp. com o objetivo de verificar a potencialidade do produto final como fonte para transmissão de microrganismos. Os principais microrganismos isolados foram:

algas: *Naviculata* sp e *Arterionella* sp.

protozoários: *Stylonychia mytilus* e *Spiromonas angusta*

bactérias: *Bacillus subtilis*, *B. brevis*, *B. circulans*, *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. firmus* e *B. megaterium*; *Streptococcus faecium* e *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter* sp., *Proteus* sp. e *E. coli*.

fungos: *Rhodotorula* sp., *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium* sp., *Scopulariopsis* sp. e *Mucor* sp.

O produto seco armazenado tende a diminuir a contagem microbiana em função do tempo, e os anaeróbios são os mais resistentes.

Vonshak et alii (1982) observaram que a produção de espirulina em tanques ao ar livre possui na prática os seguintes limites: (i) concentração

de nutrientes; (ii) variação sazonal diária de temperatura e radiação solar; (iii) grau de manutenção de uma cultura monoespecífica. Os microrganismos contaminantes podem estar estreitamente relacionados ao tricoma ou dispersos no meio líquido.

Pelosi et alii (1975) verificaram que a proporção de microrganismos bacterianos e cianobacterianos não excede 1:500; e *Flavobacterium*, *Serratia*, *Chromobacterium*, *Pseudomonas* e *Micrococcus* são habitualmente encontrados no meio líquido de cultura. Dentre os contaminantes mais problemáticos de uma cultura a céu aberto, temos *Chlorella* spp. e *Anabaena* spp.. Estes microrganismos competem pelos nutrientes do meio de cultura e muitas vezes produzem metabólitos tóxicos para o homem e animais domésticos, tornando o produto final fora dos padrões de qualidade de espirulina propriamente dita.

Richmond et alii (1982) constataram que o principal contaminante das culturas ao ar livre de espirulina (procarioto) é *Chlorella vulgaris* (eucarioto). Analisando o efeito dos níveis de dióxido de carbono e bicarbonato na competição entre espirulina e clorela em condições de laboratório, concluíram que altos teores de bicarbonato e baixo suprimento de gás carbônico são os principais fatores que mantêm a cultura monoespecífica de espirulina (Richmond, 1983). Vonshak et alii (1983) sugerem a concentração de bicarbonato a 0,2 molar e manutenção da temperatura superior a 25 graus Celsius, para manutenção de uma cultura monoespecífica ao ar livre.

A biomassa produzida com meio de cultura a partir de fase líquida de efluente de biodigestor contendo excretas animais, apresentou-se contaminada com vários tipos de microrganismos. Todas apresentavam coliformes e bactérias esporuladas; *Shigella* e *Salmonella* foram isoladas somente da biomassa produzida a partir de excretas suínos (Wu & Pond, 1981).

Secagem da biomassa

Após a filtração, a biomassa de espirulina possui 90% de umidade, apresentando sérios problemas de armazenamento e deterioração. Estes problemas são resolvidos com a secagem do material (Baranowski et alii, 1984).

Os diferentes métodos de secagem interferem na qualidade da proteína (Clément, 1975).

Dentre os diferentes métodos empregados, (secagem em estufa a 130 graus Celsius; secagem em superfície de tambor a mesma temperatura

que estufa; liofilização -30/+25 graus Celsius; secagem por calor provenientes da energia solar à temperatura de 47-58 graus Celsius), a secagem em superfície de tambor foi a mais eficiente, proporcionando maior disponibilidade de lisina e digestibilidade (41,9 mol/100000g de proteína - 89,2% de digestibilidade) quando comparados com os outros métodos, ou mesmo o produto "in natura" (30,0 mol/100000g de proteína - 65,9% de digestibilidade) (Baranowski et alii, 1984).

CONCLUSÃO

No Brasil, Ferraz et alii (1985) foram pioneiros nos estudos destes microrganismos em cultura em laboratório. Esta revisão é apenas o primeiro passo dado - para adiantar o caminho daqueles que se interessem por este microrganismo tão singular.

A pesquisa costuma proporcionar subsídios àqueles que desenvolvem a produção em larga escala. A divulgação serve como atalho e degrau aos que iniciam o estudo. A espirulina não será somente o alimento dos astronautas, dos obesos, dos hipertensos; constituirá sim, um suplemento da alimentação do homem e dos animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aaronson, S. & Dubinsky, Z - Mass production of microalgae. *Experientia*, 38:36-40, 1982.
2. Abdin El Sherif, S.A. & Clement, G. - *Spirulina* sp. food algae. Discovery of natural lakes at wadi el natrun in the Arab Republic of Egypt. *Revue de L'Institut Français du Pétrole et Annales des Combustibles Liquides*, 37:123-30, 1982.
3. Anasuya Devi, M. & Venkataraman, L.V. - Functional properties of protein products of mass cultivated blue green alga *Spirulina platensis*. *Journal of Food Science*, 49:24-71, 1984.
4. Asturias, A. - Spirulina un alga milagrosa. *Tecnica Pesquera*, 10:8-10, 1977.
5. Atack, T.H.; Jauncey, K.; Matty, A.J. - The utilization of some single cell proteins by fingerling mirror carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 18:337-48, 1979.
6. Ayala, F.A.J. & Bravo, R.B. - An improved cheap culture medium for the blue green microalga *Spirulina*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 15:198-9, 1982.
7. Ayala, F.A.J.; Diaz, M.E.G.; Bravo, R.B. - Microalgae culture in salt-water media. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergeb. Limnol.*, 20:53-61, 1985.
8. Baranowsky, J.D.; Dominguez, C.A.; Magarelli, P.C. - Effects of drying on selected qualities of *Spirulina*

- platensis* protein. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 32:1385-7, 1984.
9. Beadle, L.C. - The inland waters of tropical Africa. London, Longman, 1974. 312p.
 10. Bezires-Sansores, A.; Arteaga, F.; Avila, G.E. - Valor pigmentante y nutritivo del alga espirulina en dietas para gallinas en postura. Técnica Pecuária en México, 30:30-4, 1976.
 11. Bezires-Sansores, A.; Rossainz-II., M.A.; Avila-Gonzales, E. - El valor alimenticio del alga espirulina (*Spirulina geitleri*) en dietas para pollos de engorda. Técnica Pecuária en México, 32:46-52, 1977.
 12. Bourges, H.; Sotomayor, A.; Mendonza, E.; Chavez, A. - Utilization of the alga spirulina as a protein source. Nutrition Reports International, 4:31-43, 1971.
 13. Boussiba, S. & Richmond, A.E. - Isolation and characterization of phycocyanins from blue-green alga *Spirulina platensis*. Archives of Microbiology, 120:155-9, 1979.
 14. Brandily, M.Y. - La nourriture de l'an 2000. Sciences et Avenir, 152:516-9, 1959.
 15. Brune, H. - Zur Vertraglichkeit der Einzelleralgen *Spirulina maxima* und *Scenedesmus acutus* als alleinige Eiweissquelle für Broiler. Zeitschrift für Tierphysiologie Tierernährung und Futtermittelkunde, 48:143-54, 1982.
 16. Calderón Cortés, J.F.; Merino Zuñiga, H.; Barragán Meza, D. - Valor alimenticio del alga espirulina (*Spirulina geitleri*) para ruminantes. Técnica Pecuária en México, 31:42-6, 1976.
 17. Choubert, G. - Tentative utilization of spirulin algae as a source of carotenoids pigments for rainbow trout. Aquaculture, 18:135-43, 1979.
 18. Chung, P.; Pond, W.G.; Kingsbury, J.M.; Walker Junior, E.F.; Krool, L. - Production and nutritive value of *Arthrospira platensis* a spiral blue green alga grow on swine wastes. Journal of Animal Science, 47:319-30, 1978.
 19. Ciferi, I. - Spirulina, the edible microorganism. Microbiological Reviews, 47:551-78, 1983.
 20. Clément, G. - Une nouvelle algue alimentaire: la spiruline. Revue de l'Institut Pasteur de Lyon, 4:103-14, 1971.
 21. Clément, G. - Production et constituants caractéristiques des algues *Spirulina platensis* et *maxima*. Annales de la Nutrition et de l'Alimentation, 29:477-88, 1975.
 22. Clément, G.; Gidley, C.; Menzi, R. - Amino acid composition and nutritive value of the alga *Spirulina maxima*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 18:497-501, 1967.
 23. Clément, G.; Rebeller, M.; Trambouze, P. - Utilization massive du gaz carbonique dans la culture d'une nouvelle algue alimentaire. Revue de l'Institut Français du Pétrole et Annales des Combustibles Liquides, 23:702-11, 1968.
 24. Cuca, M.G. - Consumer preference and pigmentation cost. In: World Poultry Congress, 15., 1974. Proceedings. 1974, p.251-3.
 25. Dangeard, P. - Sur une algue bleue alimentaire pour l'homme: *Arthrospira platensis* (Nordst.) Gomont. Actes de la Société Linnaéenne de Bordeaux, 91:39-41, 1939-40.
 26. Delpuech, F.; Joseph, A.; Cavelier, C. - Consommation alimentaire et apport nutritionnel des algues bleues (*Oscillatoria platensis*) chez quelques population du kanem (Tchad). Annales de la Nutrition et de l'Alimentation, 29:457-516, 1975.
 27. Devi, M.A. & Venkataraman, L.V. - Hypocholesterolemic effect of blue green algae *Spirulina platensis* in albino rats (India). Nutrition Reports International, 28:519-30, 1983.
 28. Díaz Del Castillo, B. - Historia verdadera de la conquista de la Nueva España. Tomo I. Espasa-Calpe, Madrid. p.322-5, 1933.
 29. Dobon, N.C. - Importancia de la pigmentación en productos avícolas. Gaceta de Granja, 67:3-5, 1986.
 30. Durand-Chastel, H. - Production and use of spirulina in Mexico. In: Shelef, G. & Soeder, C.J. Algae Biomass. Amsterdam, Elsevier, 1980. p.51-64.
 31. Edwardson, W.; Lewis, C.W.; Slesser, M. - Energy and environmental implications of novel protein production systems. Agriculture and Environment, 6:1-21, 1981.
 32. Fárrar, W.V. - Tecuitlatl: a glimpse of Aztec food technology. Nature, 211(5047):341-2, 1966.
 33. Faucher, O.; Coupal, B. & Leduy, A. - Utilizaton of seawater-urea as a culture medium for *Spirulina maxima*. Canadian Journal of Microbiology, 25:752-9, 1979.
 34. Ferraz, C.A.M.; Krauter, M.; Aquarone, E. - Efeito da luz e do pH no crescimento de *Spirulina maxima*. Revista de Microbiologia, São Paulo, 16:132-7, 1985.
 35. Ferraz, C.A.M.; Aquarone, E.; Krauter, M.; Balloni, W.; Florenzano, G. - Utilização de sub-produtos da indústria alcooleira na obtenção de biomassa de *Spirulina maxima*. Parte II Emprego do resíduo da destilação do mosto fermentado (vinhaça). Revista de Microbiologia, São Paulo, 17:15-21, 1986.
 36. Février, C. & Séve, B. - Essais d'incorporation de spiruline (*Spirulina maxima*) dans les aliments des porcins. Annales de la Nutrition et de l'Alimentation, 29:625-50, 1975.
 37. Florenzano, G. - Fotosintesi microbica, difesa ambientale e produzione di proteine. In: Riunione Della Sips, 54, Brescia, 28/9-02/10/1977. Estrato dagli atti.
 38. Florenzano, G. - I cianobatteri azotofissatori e le biotecnologie applicate al loro sfruttamento. Annali dell'Accademia di Agricoltura di Torino, 126:177-232, 1983-1984.
 39. Fox, R.D. - Algocultures. Tese de Doutorado. Université Louis Pasteur, Strasbourg, 1983. p.336.
 40. García-Badel, J.J. - Aprovechamiento de las aguas para el cultivo de algas. IN: *Tecnología de las explotaciones piscícolas*. Madrid, Ed. Mundi Prensa, 1985. p.217-41.
 41. Gordon, J.F. - Algal proteins and human diet. In: Lawrie, R.A. *Proteins as human food*. London, Butterworths, 1970, p.328-345.
 42. Hirano, R. & Suyama, M. - Effect of dietary micro-algae on the quality of cultured ayu (*Plecoglossus altivelis*). Journal of the Tokyo University of Fisheries, 72:21-41, 1985.
 43. Hou, R.F. & Chen, R.S. - The blue-green algae *Spirulina platensis*, as a protein source for artificial rearing of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). Applied Entomology and Zoology, 16:169-71, 1981.
 44. Jacquet, J. - Microflore des préparations de spirulines. Annales de la Nutrition et de l'Alimentation, 29:589-601, 1976.
 45. Jassay, Y.; Berlot, J.P.; Baron, C. - Etude comparée des acides nucléiques de deux espèces de spirulines: *Spirulina platensis* et *Spirulina maxima*. Comptes Rendus

- de la Academie des Sciences de Paris, serie D Sciences Naturelles*, 273:2365-8, 1971.
46. Jenkin, P.M. – Biology of Lakes in Kenia. *Nature*, 124:574, 1929.
 47. Kataoka, N. & Misaki, A. – Glicolipids isolated from *Spirulina maxima*: structure and fatty acid composition. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47:2349-55, 1983.
 48. Klausner, A. – Food from the sea. *BIO/TECHNOLOGY*, 3:27,29-32, 1985.
 49. Klausner, A. – Algaiculture: food for thought. *BIO/TECHNOLOGY*, 4:947-53, 1986.
 50. Kosaric, N.; Nguyen, H.T.; Bergougnon, M.A. – Growth of *Spirulina maxima* algae in effluents from secundary waste-water treatment plants. *Biotechnology and Bioengineering*, 16:881-96, 1974.
 51. Kushner, D.J. & Breuil, C. – Penicillinase (β -lactamase) formation by blue green algae. *Archives of Microbiology*, 112:219-23, 1977.
 52. Léonard, J. – The 1964-65 belgian trans-Saharan espedition. *Nature*, 209(5019):126-8, 1966.
 53. Léonard, J. & Compère, L. – *Spirulina platensis* alga bleu de grande valeur alimentaire parsa richeesse en protéines. *Bulletin du Jardin Botanique National de Belgique*, 37(suppl.):1-23, 1967.
 54. Litchfield, J.H. – Single cell proteins. *Food Technology*, 31:175-9, 1977.
 55. Marquez, V.A.; Avila, E.G.; Shimada, A.S. – Estudios preliminares sobre el valor nutritivo del alga espirulina para pollos de engorda. In: WORLD PULTRY CONGRESS, 15, 1974. Proceedings, v.14, p.486-7.
 56. Materassi, R.; Ricci, A.D.; Tosani, A. – Produzione di vitamina B12 da parte di ceppi di *Spirulina*. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 37:197-202, 1974.
 57. Matty, A.J. & Smith, P. – Evaluation of a yeast, a bacterium and an alga as a protein source for a rainbow trout. *Aquaculture*, 14:235-46, 1978.
 58. Mikheiskaya, L.V.; Ovodova, R.G.; Ovodov, Y.U.S. – Polysaccharides from *Spirulina platensis*. *Chemistry of Natural Compounds*, 19:127-31, 1983.
 59. Oron, G.; Shelef, G.; Levi, A. – Growth of *Spirulina maxima* on cow-manure wastes. *Biotechnology and Bioengineering*, 21:2169-73, 1979.
 60. Oswald, W.J. – Productivity of algae in sewage disposal. *Solar Energy*, 15:107-17, 1973.
 61. Paoletti, C.; Vicenzini, M.; Bocci, F.; Materassi, R. – Composizione biochimica generale delle biomasse di *Spirulina platensis* e *S. maxima*. In: CONVEGNO "PROSPETIVE DELLA COLTURA DI Spirulina IN ITALIA", Firenze, 20-21 novembre 1980. Atti. 1981. p.111-25.
 62. Pelosi, E.; Pushparaj, B.; Ricci Bertocci, D. – Microflora batterica associata alle colture massive di *Spirulina platensis* e *S. maxima*. In: CONGRESSO NAZIONALE SOCIETA ITALIANA DI MICROBIOLOGIA, 17, Padova, 1975. Atti. 1975. p.801-7. Soc. Ital. Microbiologia. Padova p.801-7, 1975.
 63. Pushparaj, B.; Paoletti, C.; Materassi, R. – Sul comportamento in coltura di *Spirulina platensis* e di *S. maxima* nei confronti del solfuro. In: CONGRESSO NAZIONALE DE SOCIETA ITALIANA MICROBIOLOGIA, 17., Padova, 1975. Atti. 1975 p.809-15.
 64. Rich, F. – Notes on *Arthrospira platensis*. *Revue Algologique*, 6:75-9, 1931.
 65. Richmond, A. – Effects of bicarbonate and carbon dioxide on the competition between *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, B, 33B:197, 1983.
 66. Richmond, A.; Karg, S.; Boussiba, S. – Effects of bicarbonate and carbon dioxide on the competition between *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*. *Plant and Cell Physiology*, 23:1411-7, 1982.
 67. Rippka, R.; Dervells, J.; Waterbury, J.B.; Herdmann, M.; Stanier, R. – Generic assignments, strains histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, 111:1-61, 1979.
 68. Robles Cabrera, A.; Soriano Torres, J.; Shimada, A.S. – El valor nutritivo del alga espirulina para el cerdo de abasto. *Técnica Pecuaria en México*, 28:13-6, 1975.
 69. Rogers, P.L. – Single cell protein from food and agricultural wastes. *Food Technology in Australia*, 30:109, 111-5, 1978.
 70. Santillan, C. – Mass production of *Spirulina*. *Experientia*, 38:40-3, 1982.
 71. Sautier, C. & Trémolières, J. – Valeur alimentaire des algues spirulinées chez l'homme. *Annales de la Nutrition et de l'Alimentation*, 29:517-34, 1975.
 72. Saxena, P.N.; Ahmad, M.R.; Shyan, R.; Misra, P.S. – Chemical composition of sewage-grown *Spirulina platensis*. *Experientia*, Basel 38:14-38, 1982.
 73. Saxena, P.N.; Ahmad, M.R.; Shyan, R.; Amla, D.V. – Cultivation of *Spirulina* in sewage for poultry feed. *Experientia*, Basel 39:1077-83, 1983.
 74. Schaim, H. – Solar energy and industrial algology. *Solar Energy*, 19:407-10, 1977.
 75. Shapiro, J. – Blue green algae: why they become dominant. *Science*, 179:382-4, 1973.
 76. Soeder, C.J. – Chemical composition of microalgal biomass as compared to some other types of single cell protein (SCP). U.O.F.S. Publ. Series C, Wiesbaden 3:73-85, 1981.
 77. Tacon, A.G.J. & Jackson, A.J. – Utilisation of conventional and unconventional protein sources in practical fish feeds. IN: _____. *Nutrition and feeding in fish*. London, Academic Press, 1985. p.119-45.
 78. Tomaselli, L.; Pelosi, E.; Materassi, R.; Florenzano, G. – Prime esperienze in Italia di cultura massiva di una alga verde azzurra, ricca di proteine (*Spirulina platensis f. granulata*). In: CONGRESSO NAZIONALE DI MICROBIOLOGIA, 15, Torino, 1969. 12p.
 79. Torzillo, G. – Sperimentazione sulla coltura massiva de *Spirulina maxima* in sistema tubolare nel biennio 1979-1980. In: CONVEGNO "PROSPETIVE DELLA COLTURA DE Spirulina IN ITALIA" Firenze, 20-21 novembre 1980. Estratto di Atti. 1980 p.329-35.
 80. Vicenzini, M.; Bocci, F.; Materassi, R.; Florenzano, G. – Decoloration and fractionation of *Spirulina* biomass. In: PROGRESS in food engineering. Ed. Cantarelli, C. & Peri, C. Switzerland, Forster-Verlag, 1984. p.563-565.
 81. Vonshak, A.; Abeliovich, A.; Boussiba, S.; Arad, S.; Richmond, A. – Production of *Spirulina* biomass: effects of environmental factors and population density. *Biomass*, London, 2:175-85, 1982.
 82. Vonshak, A.; Boussiba, S.; Abeliovich, A.; Arad, S.; Richmond, A. – Production of *Spirulina* biomass: maintenance of monoalgal culture outdoors. *Biotechnology and Bioengineering*, 25:341-9, 1983.
 83. Voronkava, S.S.; Sadkova, N.P.; Al'Bitskaya, O.N.;

- Pavlova, S.A.; Rogozhin, S.V. - Investigation of some physicochemical properties of water soluble proteins from *Spirulina platensis*. Applied Biochemistry and Microbiology, 16:266-72, 1980.
84. Yanagimoto, M. & Saitoh, H. - Evaluations tests of a large spiral blue-green alga *Oscillatoria* sp. for biomass production. Journal of Fermentation Technology, 60:305-10, 1982.
85. Yap, T.N.; Wu, J.F.; Pond, W.G.; Krook, L. - Feasibility of feeding *Spirulina maxima*, *Arthrospira platensis*, or *Chlorella* sp. Nutrition Reports International, 25:543-52, 1982.
86. Wu, J.F. & Pond, W.G. - Amino acid composition and microbial contamination of *Spirulina maxima*, a blue green algae, grown the effluent of differentiated fermented animal wastes. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 27:151-9, 1981.

Recebido para publicação em 1/8/89.



MODELO ECOLÓGICO DOS NUTRIENTES, MICRORGANISMOS E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE SOLO SOB VEGETAÇÃO DE CERRADO TRATADO COM VINHAÇA, CORUMBATAÍ, SP

Sânia Maria Tauk¹

Iracema Helena Schoenlein-Crusius²

Ademir Petenate³

RESUMO

Estudou-se o efeito da adição de doses cumulativas de vinhaça tipo caldo misto, durante seis anos, em 18 parâmetros em Latossolo Vermelho-Amarelo textura média, de 0-15cm de profundidade, em área de cerrado, localizada no município de Corumbataí, SP. Determinaram-se em amostras mensais, os teores de K^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Al^{+3} , PO_4^{-3} , CTC, C orgânico, N total, relação C/N, pH, matéria orgânica, as atividades da celulase, invertase, amilase e urease e o número de unidades formadoras de colônias de bactérias, actinomicetos e fungos filamentosos. Os resultados obtidos foram analisados com os testes de variância com réplicas e com dois fatores e o de Tukey. O método de coeficiente de correlação possibilitou a proposição de dois modelos, um para o solo testemunha e outro para aquele tratado com doses cumulativas anuais de vinhaça tipo caldo misto, durante seis anos consecutivos. Foram discutidas as correlações encontradas no solo testemunha e as alterações das mesmas no solo tratado com o resíduo. A vinhaça acarretou mudanças nas correlações entre os íons, mas não aquelas entre os microrganismos e as atividades enzimáticas.

INTRODUÇÃO

A área de cerrado estudada possui 16 alqueires e localiza-se no município de Corumbataí, SP, nas coordenadas entre os meridianos 47° 10' e 22° 15' de latitude sul, extraído de Folha Corumbataí, escala 1:50000 (2). Possui altitude máxima de 850 metros e a mínima de 790 metros, tendo vegetação com vários aspectos desde o campo limpo até o cerradão. Dentro dessa área, em uma sub-área com vegetação tipo cerrado "sensu stricto" foram delimitadas quatro parcelas ao acaso, sendo que duas receberam anualmente doses cumulativas de

vinhaça tipo caldo misto (6), com volume de 20 l/m²/ano de 1981 a 1983 e de 50 l/m²/ano de 1984 a 1986 (9, 22, 25).

Vários parâmetros têm sido estudados nessa área (7, 10), porém existe maior número de estudos do efeito de adição de vinhaça sobre a microbiologia do solo em culturas de cana-de-açúcar (12, 20).

Este trabalho tem como objetivo estabelecer modelos ecológicos baseados no método de coeficiente de correlação (23) dos parâmetros estudados no solo da sub-área acima citada, com ou sem adição de doses cumulativas anuais de vinha-

1. Depto. de Ecologia, IB-UNESP, Caixa Postal 178, 13500 Rio Claro SP, Brasil

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

3. Depto. de Estatística, IMEC-UNICAMP, Caixa Postal 6065, 13100 Campinas SP, Brasil

ça tipo caldo misto, durante seis anos consecutivos.

MATERIAL E MÉTODOS

A vinhaça tipo caldo misto foi obtida na Usina São João, Araras, SP, adicionada a quente, 80-85°C, anualmente no mês de julho no período de 1981 a 1986, sobre a serapilheira do solo sob vegetação de cerrado "sensu stricto", no município de Corumbataí, SP. As coletas de amostras compostas foram mensais, três por parcela, em solo submetido a dois tratamentos, com e sem adição de vinhaça, realizadas sempre até 15cm de profundidade, utilizando-se arado apropriado para este tipo de amostragem. Durante as coletas foram medidas a temperatura e umidade relativa do ar com termoigrômetros e as temperaturas do solo até 5 e até 20cm de profundidade do solo, com termômetro de solo tipo haste.

As amostras de solo foram levadas para o laboratório, onde foram imediatamente processadas para o estudo dos demais parâmetros. A umidade foi determinada com o peso constante das amostras após terem sido deixadas a 105°C e a matéria orgânica por combustão a 450°C, durante

4h (19). O pH foi medido em suspensão de solo em água ou em solução salina, na proporção 1:0,5, agitada por 30 minutos e a determinação potenciométrica realizada em pHmetro digital (16). As análises químicas trimestrais foram realizadas no Departamento de Solos, Geologia e Fertilizantes, ESALQ, Piracicaba, SP, fornecendo dados em porcentagem de carbono orgânico e nitrogênio total, e em miliequivalentes/100g de terra de fósforo (PO_4^{2-}), potássio, cálcio, magnésio, alumínio, hidrogênio e capacidade de troca catiônica.

As técnicas das atividades das enzimas, celulase (24), amilase (26), invertase (13) e urease (18) foram realizadas mensalmente, sendo que para as três primeiras determinou-se a presença de açúcares redutores e para a última, a de uréia pelo método de azul de indofenol (18). O cálculo foi realizado em mg de produto obtido por 100g de solo, peso seco.

O número de microrganismos do solo foi determinado utilizando-se o método indireto (21), com a técnica de diluição em série a partir de 10g de solo, peso úmido, em 90ml de solução salina (NaCl-0,85%), agitando-se a suspensão durante 30 minutos. Para as bactérias utilizou-se o meio de cultura agar nutritivo (14), diluição de 10^{-7} , tempo de incubação de 48h; para os actino-

Tabela 1 – Valores máximos (M) e mínimos (m) dos parâmetros microclimáticos, do pH, umidade e da matéria orgânica do solo, 0-15cm de profundidade, das parcelas com (C) ou sem (S) adição de doses cumulativas de vinhaça, na área de cerrado no município de Corumbataí, SP, no período de 1983 a 1986.

Parâmetros	1983		1984		1985		1986	
	C	S	C	S	C	S	C	S
umid. rel. ar M (%)	91,0		91,0		90,0		85,0	
m	58,0		45,0		40,0		75,0	
temp. do ar M (°C)	30,0		28,0		25,0		23,0	
m	18,0		10,0		10,0		17,0	
temp. solo 5cm (%)	26,0	28,0	35,0	10,0	25,0	25,0	23,0	22,0
temp. solo 20cm (%)	18,0	18,0	10,0	10,0	10,0	10,0	15,0	15,5
umidade (%)	24,0	24,0	25,0	22,0	24,0	22,0	23,0	21,0
mat. org. (%)	14,0	12,0	12,0	12,0	8,0	8,0	14,0	14,0
pH	M	13,0	12,8	13,0	12,2	15,0	14,0	20,0
m	7,6	7,9	6,5	5,8	6,5	6,3	10,0	6,2
Δ pH	M	3,8	3,8	4,3	3,9	4,4	3,7	3,7
m	3,6	3,6	3,6	3,7	3,6	2,6	3,6	3,6
	M	0,0	0,1	0,0	0,2	-0,1	0,1	-
	m	-0,7	-0,2	-0,4	-0,2	-0,6	-1,1	-

Tabela 2 – Valores máximos (M) e mínimos (m), dos nutrientes do solo, 0–15cm de profundidade, das parcelas com (C) ou sem (S) adição de doses cumulativas de vinhaça, na área de cerrado no município de Corumbataí, SP, no período de 1983 a 1986.

Parâmetros	1983		1984		1985		1986		
	C	S	C	S	C	S	C	S	
(mec./100g de solo)									
Ca ⁺²	M	0,8	0,3	0,8	0,3	1,4	0,3	1,4	0,6
	m	0,4	0,2	0,6	0,2	0,3	0,1	0,5	0,3
Mg ⁺²	M	0,7	0,4	1,0	0,4	0,7	0,3	0,6	0,3
	m	0,3	0,1	0,4	0,1	0,3	0,1	0,4	0,1
K ⁺	M	0,5	0,1	0,7	0,2	1,5	0,1	1,5	0,2
	m	0,3	0,1	0,7	0,1	1,5	0,1	0,2	0,1
Al ⁺³	M	2,7	2,8	2,9	3,0	2,8	3,1	3,6	3,8
	m	2,2	2,5	2,0	2,0	0,9	2,0	2,3	3,0
PO ₄ ⁻³	M	0,14	0,08	0,12	0,08	0,10	0,08	0,10	0,08
	m	0,07	0,04	0,05	0,02	0,04	0,03	0,08	0,06
CTC	M	13,0	10,5	14,0	11,0	11,7	11,1	14,5	13,0
	m	10,0	8,6	9,2	8,5	8,8	9,0	13,0	12,0
C org. (%)	M	4,4	4,5	3,6	3,3	4,2	4,2	5,0	3,3
	m	3,3	3,1	3,0	2,8	2,8	3,0	1,5	1,4
N total (%)	M	0,48	0,49	0,31	0,29	0,34	0,34	0,40	0,30
	m	0,29	0,28	0,19	0,23	0,24	0,25	0,15	0,12
Relação	M	11,8	11,8	11,8	11,7	11,6	11,7	11,6	11,6
C/N	m	11,4	11,4	11,5	11,4	11,3	11,4	11,6	11,6

Tabela 3 – Valores máximos (M) e mínimos das atividades das enzimas e dos números de unidades formadoras de colônias (NUFC) de microrganismos do solo, 0–15cm de profundidade, das parcelas com (C) ou sem (S) adição de doses cumulativas de vinhaça, na área de cerrado no município de Corumbataí, SP, no período de 1983 a 1986

Parâmetros	1983		1984		1985		1986		
	C	S	C	S	C	S	C	S	
Mg glicose/ 100g solo									
invertase	M	24,0	14,1	16,0	7,0	10,0	10,3	9,0	9,5
	m	4,5	3,9	1,5	2,0	3,8	4,0	7,0	7,9
amilase	M	14,2	11,9	8,0	7,8	6,4	4,2	32,0	12,0
	m	3,9	1,5	1,2	1,1	1,1	1,1	13,0	3,0
celulase	M	12,0	2,0	4,0	2,5	1,5	1,4	11,0	10,0
	m	1,5	1,2	1,5	1,5	0,2	0,1	9,0	4,5
mg-N-NH ₄ /100g solo									
urease	M	1,5	1,6	0,5	0,8	1,2	0,6	2,0	2,0
	m	0,6	0,6	0,1	0,1	0,3	0,4	1,8	1,5
NUFC									
bactéria (10 ⁷)	M	4,2	2,9	68,6	24,2	85,2	80,9	250,0	100,0
	m	6,3	0,2	0,8	1,0	2,2	1,4	70,0	80,0
fungo filam. (10 ⁶)	M	15,8	11,9	0,8	2,8	8,2	3,3	9,0	15,0
	m	2,1	0,4	0,9	0,3	2,4	0,4	6,0	0,3
actinomiceto (10 ⁵)	M	10,5	7,3	30,7	1,8	16,1	14,4	100,0	200,0
	m	1,2	0,6	2,4	1,5	1,8	1,4	50,0	20,0

Tabela 4 – Análise estatística com o teste do coeficiente de correlação dos parâmetros estudados mensalmente, no período de 1983 a 1986, em Latossolo Vermelho-Amarelo textura média, de 0–15cm de profundidade, em parcelas com ou sem adição de doses cumulativas anuais de vinhaça, no município de Corumbataí, SP.

Parâmetros	Coeficiente da correlação a 5% e a 1% Latossolo Vermelho-Amarelo	
	com vinhaça	sem vinhaça
umidade x cálcio	-0,5980*	-0,5180n.s.
umidade x carbono org.	-0,3960n.s.	-0,6370*
umidade x fósforo	0,6051*	0,3908n.s.
umidade x mat. org.	-0,4140n.s.	-0,6230*
umidade x nitrog. total	-0,41630n.s.	-0,6210*
mat. org. x CTC	0,5828*	0,7145**
mat. org. x carbono org.	0,9907**	0,9823**
mat. org. x hidrogênio	0,5807	0,8238**
mat. org. x cálcio	0,5282n.s.	0,6232*
CTC x carbono org.	0,5983*	0,7462**
CTC x hidrogênio	0,8259**	0,9085**
CTC x fósforo	0,2778n.s.	0,5714*
mat. org. x nitrog. total	0,9990**	0,9990**
nitrog. total x CTC	0,5874*	0,7128**
nitrog. total x carbono org.	0,9908**	0,9824**
nitrog. total x hidrogênio	0,5855*	0,8231**
nitrog. total x cálcio	0,5270*	0,6224**
alumínio x cálcio	-0,5660*	0,0951n.s.
alumínio x fósforo	0,7193**	0,8014**
alumínio x pH	-0,8943**	-0,8860**
alumínio x CTC	0,4916n.s.	0,7426**

micetos o meio de cultura foi agar amido (7), diluição de 10^{-4} , tempo de incubação de 6 dias; para os fungos o meio de cultura foi o de Martin com estreptomicina (14), diluição de 10^{-5} , tempo de incubação de 72h e para os microrganismos capazes de crescerem em meio mineral (14) com amido, sacarose ou carboximetil celulose, como única fonte de carbono utilizou-se a diluição de 10^{-4} e o tempo de incubação de 6 dias.

Com os resultados obtidos, foram realizados cálculos do coeficiente de correlação (23), utilizando-se as médias dos valores obtidos durante o período de 1983 a 1986. As correlações estatisticamente significativas a 1 e a 5% entre os parâmetros foram consideradas para a proposição dos modelos, um estabelecendo o mecanismo da dinâmica dos nutrientes em solo sob cerrado, testemunha, e o outro para demonstrar as alterações desse mecanismo nesse solo quando tratado com doses cumulativas anuais de vinhaça durante seis anos, em uma reserva da FAPESP localizada no município de Corumbataí, SP.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise estatística dos resultados obtidos demonstrou que doses cumulativas anuais de vinhaça acarretaram acréscimo da capacidade de troca catiônica, do pH, do potássio, do cálcio, do magnésio, do fósforo, das atividades da amilase e da celulase e do número de unidades formadoras de colônias de fungos filamentosos. Antes da adição da quinta dose anual, também este efeito foi verificado para os teores de matéria orgânica, carbono orgânico, atividade da amilase e dos números de unidades formadoras de bactérias e de actinomicetos. Houve decréscimo do teor de alumínio trocável e a partir da sexta dose anual de vinhaça houve ainda aumento do teor da umidade do solo.

Para melhor entendimento foram citados os valores máximos e mínimos de cada parâmetro estudado, em cada ano do período de estudo, sem se importar com os valores mensais de cada um

Tabela 5 – Análise estatística com o teste de coeficiente de correlação dos parâmetros estudados mensalmente, no período de 1983 a 1986, em Latossolo Vermelho-Amarelo textura média, 0–15cm de profundidade, em parcelas com ou sem adição da doses cumulativas anuais de vinhaça, no município de Corumbataí, SP.

Parâmetros	Coeficiente da correlação a 5% e a 1%	
	Latossolo Vermelho-Amarelo	
	com vinhaça	sem vinhaça
alumínio x magnésio	-0,9990**	-0,0640n.s.
alumínio x potássio	-0,9999**	-0,4050n.s.
cálcio x fósforo	-0,6140n.s.	0,2841n.s.
cálcio x magnésio	0,8427**	0,7349**
pH x cálcio	0,5801*	0,0318n.s.
pH x CTC	-0,4740n.s.	-0,5520*
fósforo x pH	-0,6930**	-0,7220**
fósforo x temp. 20 cm	0,3805n.s.	0,6482*
carbono org. x hidrogênio	0,6239*	0,5888**
carbono org. x cálcio	0,5186n.s.	0,6423*
carbono org. x potássio	0,4752n.s.	0,5544*
potássio x cálcio	0,6121*	0,9991**
potássio x pH	0,3922n.s.	0,6412*
magnésio x potássio	0,6122*	0,9995**
temp. 5 cm x temp. 20 cm	0,7736**	0,8319**
alumínio x bactéria	-0,9998**	-0,2529n.s.
alumínio x fungo	0,9755**	0,3253n.s.
alumínio x actinomiceto	0,5709*	0,9999**
alumínio x amilase	0,9992**	0,2116n.s.
cálcio x bactéria	0,9998**	0,5822*
cálcio x fungo	0,9931**	0,0769n.s.
cálcio x invertase	0,9860**	0,5590n.s.

deles, dentro das parcelas com os dois tipos de tratamentos utilizados, na área de cerrado em pauta (Tabelas 1, 2, 3).

A análise estatística com o teste de correlação (Tabelas 4, 5, 6) possibilitou a proposição de dois modelos ecológicos, baseados somente nas correlações significativas entre os parâmetros estudados. Os resultados apresentados somente se referem as correlações significativas encontradas no solo tratado ou naquele que serviu como testemunha. Quando não ocorreu, em nenhum tipo de solo, essas correlações significativas, os valores encontrados não foram citados. As correlações significativas positivas foram consideradas diretas ou diretamente proporcionais e as negativas, indiretas ou inversamente proporcionais, representadas graficamente com os sinais + ou -, respectivamente.

No Latossolo Vermelho-Amarelo textura

média, de 0-15cm de profundidade, sob vegetação de cerrado foi proposto o modelo ecológico baseado nas correlações significativas entre os parâmetros em estudo (Figura 1). Este solo sendo tratado com doses cumulativas anuais de vinhaça tipo caldo misto, no período de 1981 a 1986, apresentou outro modelo, também baseado somente nas correlações significativas (Figura 2). Em ambos os modelos não foram consideradas as correlações não significativas estatisticamente entre os parâmetros em estudo.

Determinaram-se correlações positivas altamente significativas entre os íons Ca^{+2} com o Mg^{+2} e ambos com o K^+ , Figura 1. Estes íons estão intimamente relacionados no solo, podendo o acréscimo de um deles representar o aumento dos demais ou vice-versa. O K^+ quando encontra-se em excesso no solo, entretanto, pode facilitar a lixiviação dos outros dois (16), este efeito não

Tabela 6 – Análise estatística com o teste do coeficiente de correlação dos parâmetros estudados mensalmente no período de 1983 a 1986, em Latossolo Vermelho-Amarelo textura média, 0-15cm de profundidade, em parcelas com ou sem adição de doses cumulativas anuais de vinhaça, no município de Corumbataí, SP.

Parâmetros	Coeficiente de correlação a 5% e a 1%	
	Latossolo Vermelho-Amarelo com vinhaça	sem vinhaça
cálcio x celulase	0,9958**	0,2712n.s.
fósforo x celulase	0,9707**	0,1002n.s.
magnésio x amilase	0,9927**	0,0810n.s.
potássio x bactéria	0,9999**	0,2163n.s.
potássio x amilase	0,9832**	0,2458n.s.
bactéria x invertase	-0,9872**	-0,1101n.s.
bactéria x celulase	-0,1123n.s.	-0,6710n*
bactéria x amilase	-0,5262*	-0,5523*
fungo x invertase	0,9996**	0,6108*
fungo x mat. org.	0,6140*	0,6214*
fungo x celulase	0,9757**	0,3422n.s.
fungo x urease	0,5495n.s.	0,9999**
actinomiceto x invertase	-0,6930*	-0,9999**
actinomiceto x celulase	-0,6198*	-0,6028*
invertase x mat. org.	0,6463*	0,0782n.s.
invertase x celulase	0,9999**	0,6018*
invertase x amilase	0,9991**	0,6178*
invertase x urease	0,6976*	0,0503n.s.
mat. org. x celulase	0,6056*	0,60091*
mat. org. x amilase	0,6078*	0,6202*
mat. org. x urease	0,6293*	0,9999**
celulase x urease	0,9999**	0,6129

foi observado no solo em pauta, onde o primeiro apresenta-se em quantidades deficientes (24).

Quando ocorre acréscimo do K^+ há aumento do pH e concomitantemente decréscimo do Al^{+3} e do PO_4^{3-} , esse comportamento demonstrado pelas correlações encontradas e que confirmaram os dados da literatura que propõem que elas são decorrentes do processo de imobilização que ocorre entre esses íons no solo (16). O Al^{+3} tem importância fundamental na dinâmica do solo sob vegetação de cerrado, no qual encontra-se em excesso, e seu aumento é acompanhado pela alta acidez, imobilizando o K^+ , Ca^{+2} e Mg^{+2} , impedindo que estes íons sejam solúveis para a planta e para a biota do solo. Os valores de pH no solo em estudo foram extremamente baixos, chegando em média ao valor de 3,9 (22, 25), abaixo do observado para a maioria de outras áreas de cerrado (16).

Outras correlações demonstraram que maior quantidade do íon PO_4^{3-} no solo sob vegetação de cerrado pode ser decorrente da liberação do mesmo dos íons K^+ , Ca^{+2} e Mg^{+2} , que apresentam a capacidade de imobilizá-lo (16), ao se tornarem insolúveis pelo Al^{+3} , resultando no aparente acréscimo do primeiro.

Outras correlações demonstradas na Figura 1, possibilitaram verificar que o decréscimo dos íons Ca^{+2} e K^+ foi diretamente proporcional aos teores de N total, CTC, carbono orgânico, H^+ e da matéria orgânica do solo. Esta última é considerada fonte de nutrientes do solo e no início de sua decomposição ocorre decréscimo do pH (17). Essas afirmações foram demonstradas nas correlações observadas na Figura 1, enfatizando a importância da matéria orgânica no solo sob vegetação de cerrado.

O número de fungos filamentosos foi direta-

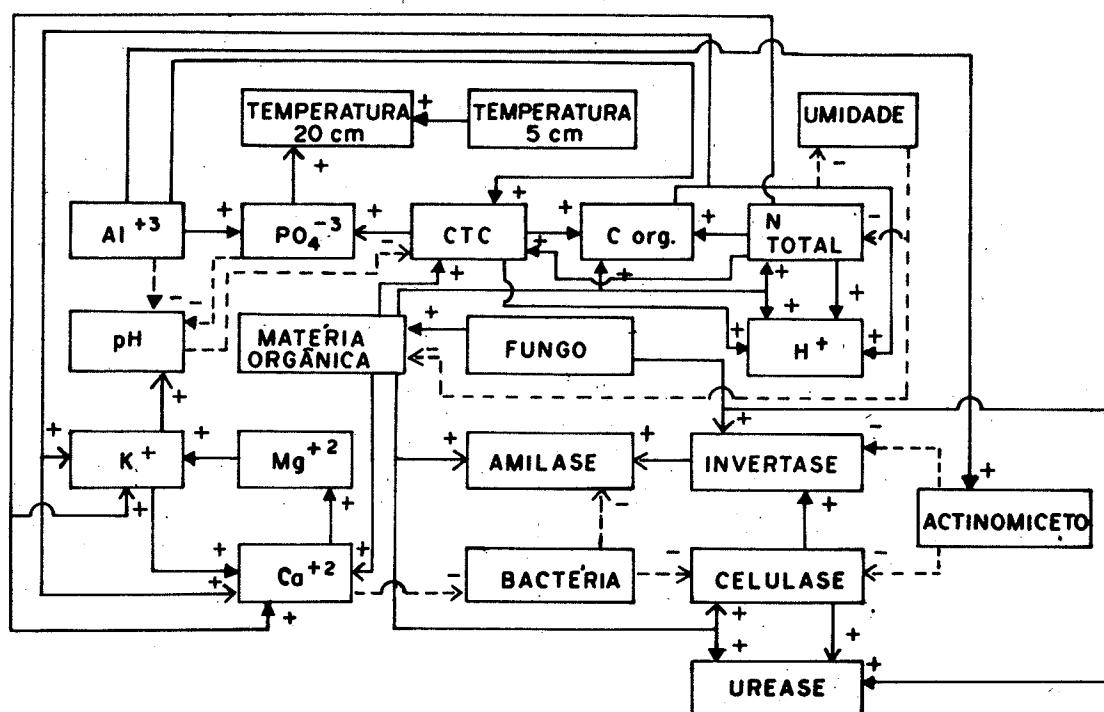


Figura 1. Modelo baseado no método de coeficiente de correlação dos parâmetros estudados no solo sob vegetação do cerrado, sem adição de vinhaça, no município de Corumbaí, SP

----- correlação inversa;

— correlação direta;

correlação significativa a 5% e

correlação significativa a 1%

mente proporcional ao teor de matéria orgânica no solo em estudo e no mês de dezembro, no período chuvoso e quente, houve decréscimo de ambos juntamente com a CTC do solo, esta última calculada pelo Δ pH (25). Nessa mesma época ocorreu ainda diminuição das atividades da amilase, celulase e da invertase no solo, sendo estas diretamente proporcionais ao número de fungos filamentosos e ao teor de matéria orgânica, Figura 1. Entre as enzimas verificou-se que a atividade da invertase é diretamente proporcional à da urease. Proporcionalidade inversa foi verificada entre o número de bactérias com as atividades da celulase e da amilase e do número de actinomicetos com as atividades da celulase e da invertase. Não foi encontrada correlação entre a atividade da amilase com a da urease, Figura 1, confirmando que no solo estudado ocorre a ausência da mesma, como em outros tipos de solos (8). As correlações entre o número de microrganismos com a atividade enzimática nem sempre foram encontradas (4).

Os fungos filamentosos no solo da área em

estudo, demonstraram evidências de serem mais ativos quanto a degradação de possíveis substratos, nos quais atuariam as enzimas aqui determinadas. Foi proposto anteriormente que esses microrganismos seriam os primeiros a intervir, como "tropa de ataque", decompõendo a matéria orgânica no solo (1). De fato, eles apresentam capacidade de romper a estrutura da parede celular, atacando a celulose por apresentarem, alguns deles, três enzimas que atuam neste substrato, endoenzima, celobiohidrolase e a celobiase. Outros fungos e algumas espécies de bactérias apresentam somente as endocelulases, precisando de outros microrganismos para utilizarem a celulose, como fonte de carbono (5).

Doses cumulativas anuais de vinhaça, tipo caldo misto adicionadas no solo em estudo durante 1981 a 1986, na profundidade de 0-15cm alteraram ou não algumas das correlações citadas anteriormente para o solo testemunha, Figura 2.

Permanecem iguais as correlações entre matéria orgânica ou nitrogênio total com o carbono

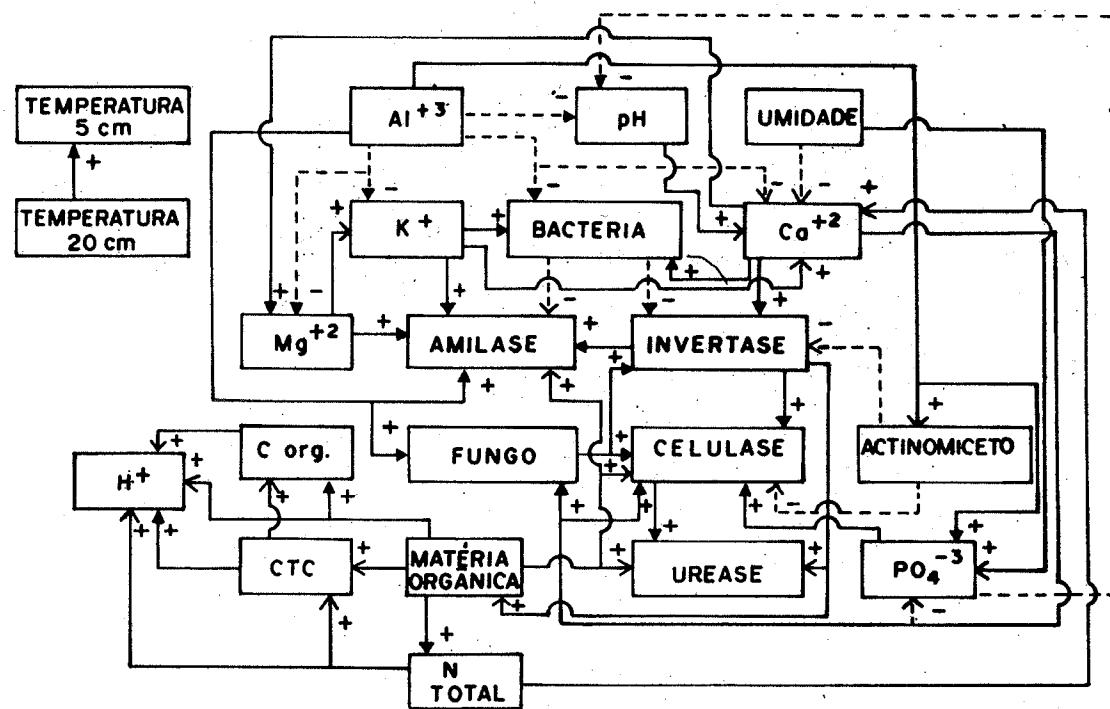


Figura 2. Modelo baseado no método de coeficiente de correlação dos parâmetros estudados no solo sob vegetação de cerrado, com adição de doses cumulativas de vinhaça, no município Corumbataí, SP.

---- correlação inversa;
correlação significativa a 5% e

— correlação direta
correlação significativa a 1%

orgânico, a CTC com H^+ , o Al^{+3} com PO_4^{3-} ou pH, o Ca^{+2} com Mg^{+2} , o pH com PO_4^{3-} e a temperatura até 5cm de profundidade com aquela até 20cm de profundidade. Doses cumulativas anuais de vinhaça durante seis anos, portanto, não alteraram os processos relacionados com essas correlações, no solo sob vegetação de cerrado de 0-15cm de profundidade. Outras correlações que permaneceram inalteradas, porém com menor no grau de significância utilizado na análise estatística foram, a matéria orgânica com CTC ou H^+ , a CTC com carbono orgânico, o N total com CTC ou H^+ e o C orgânico com H^+ . A correlação que teve seu grau de significância acrescido foi o N Total com Ca^{+2} . Assim nos processos que participam dessas correlações, a vinhaça parece ter contribuído para promover algumas alterações, porém não detectadas com a análise estatística utilizada.

Algumas das correlações encontradas no so-

lo testemunha, não foram encontradas no solo tratado com esse resíduo, como aquela entre a umidade com N total, a matéria orgânica com Ca^{+2} a CTC com PO_4^{3-} , o Al^{+3} com CTC, o PO_4^{3-} com temperatura até 20cm de profundidade, o C orgânico com Ca^{+2} ou K^+ e este último com pH. Os resultados demonstraram que mesmo ocorrendo acréscimo da matéria orgânica ou do C orgânico, esse efeito não foi acompanhado na mesma intensidade para o H^+ , CTC, N total, K^+ , Ca^{+2} e pH, como foi observado para o solo testemunha.

A vinhaça aumentando a umidade do solo, após seis anos consecutivos de sua aplicação na mesma área, contribui para maior lixiviação do íon Ca^{+2} , ao contrário do PO_4^{3-} , Figura 2, permitindo maior acidez do solo. O íon Ca^{+2} tem capacidade de imobilizar o PO_4^{3-} , a celulase, a invertase e a amilase, sendo que o decréscimo do primeiro pode produzir o acréscimo dos últimos (5).

Esse mecanismo foi observado, Figura 2, ocorrendo juntamente a diminuição do número de bactérias e aumento do número de fungos filamentosos.

O decréscimo do número das bactérias é atribuído à grande quantidade de Al^{+3} que além de contribuir para a acidez do solo, também é tóxico para esses microrganismos (11). A imobilização da amilase pode ser realizada pela presença de K^+ e do Mg^{+2} (10), daí resultar a correlação negativa da amilase com o número de bactérias e este último sendo diretamente proporcional ao teor de K^+ , demonstrou que a primeira foi inversamente proporcional aos íons K^+ e Mg^{+2} , demonstrando que a enzima pode ser imobilizada por estes últimos (4).

No solo tratado com doses cumulativas de vinhaça se mantiveram iguais as correlações dos números de microrganismos com as atividades das enzimas estudadas, comprovando que com ou sem o resíduo são os fungos filamentosos que atuam primeiramente na decomposição de materiais ricos em celulose no solo sob vegetação de cerrado, como foi acima citado. Anteriormente não foi estabelecida correlação entre o tipo de ecossistema e a densidade das populações celulíticas e entre essa última e a atividade de enzima (15). A adição de um determinado resíduo pode causar aumento considerável do número de microrganismos, porém a decomposição da matéria orgânica através dos pioneiros pode ter curta duração, devido as relações de competição, amíbese (3) e a predação (4).

Ainda pouco se conhece do efeito crônico sobre os microrganismos do solo com taxas de resíduos por longos períodos de tempo. A vinhaça durante seis anos, acarretou mudanças nas correlações entre os íons, mas não aquelas entre os microrganismos e as atividades enzimáticas.

SUMMARY

Ecological model of nutrients, microorganisms and enzymatic activity of soil in a cerrado area treated with vinasse, Corumbataí, SP

The effect of annual cumulative doses of vinasse on eighteen parameters in reddish-yellow latosol medium texture, 0-15cm deep, in a cerrado area located at Corumbataí city, São Paulo state, was studied. Air temperature and relative air moisture were determined during the sampling periods. Monthly soil samples and meteorological measurements were taken from 1983 to 1986. The

soil parameters measured were: temperature by 5 and 20cm deep, moisture, potassium, magnesium, calcium, aluminium, phosphorus, organic carbon contents, total N and organic contents, cation exchange capacity, pH, C/N rate and cellulase, amylase, invertase and urease activities were determined as well as the bacteria, actinomycetes and filamentous fungi colony forming units. The results obtained were analysed by test of variance and tukey tests. The vinasse caused an increase in the values of the pH, cation exchange capacity, potassium, calcium, magnesium and phosphorus contents, amylase and cellulase activities and number of filamentous fungi. An alteration in the number and diversity of fungi was found, as well as a decrease on the exchangeable aluminium content. For the others, the vinasse caused decreased in number of actinomycetes. Through the correlation coefficient method it was possible to establish two ecological models: one to the control area and another to the area treated with cumulative doses of vinasse, yearly applied from 1980 to 1986. The correlations found in the control area and the modifications in the soil treated with the waste were discussed. The vinasse brought about changes in the ion correlations, but not for the microorganisms and the enzymatic activities.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho recebeu apoio financeiro da FINEP e do CNPq. Os autores agradecem a Miguel Petreire Jr. pelas sugestões quanto aos testes estatísticos a serem utilizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Almeida, J.R. - O problema da vinhaça em São Paulo. Bolm.Inst.Zimotec.(ESALQ), Piracicaba, SP, 3:1-24, 1952.
2. Anônimo - Folha de Corumbataí, SP, escala 1:50.000 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 1971.
3. Burges, A. - Soil fungi. In: IV International Conference-Giam. Global Impacts of Applied Microbiology, São Paulo, SP, 1973.
4. Burns, R.G. - Soil Enzymology. Soil.Prog., Oxford, 64:275-85, 1977.
5. Burns, R.G. & Martins, J.P. - Biodegradation of organic residues in soil. In: M.J. Mitchell & J.P. Nakas. Microfloral and faunal interactions in natural and agro-ecosystems. Martinus Nijhoff/Dr W.Junk Publ, 1986. p.137-202.
6. Ceccato-Antonini, S.R. - Produção de biomassa e depuração biológica da vinhaça de cana-de-açúcar por

- cultura mista de fungos filamentosos e leveduras. Rio Claro, UNESP, 1988. 159p. (Tese M.S.).
7. Coelho, R.R.R. & Drosdowicz, A. – The occurrence of actinomycetes in a cerrado soil in Brazil. Rev.Ecol.Biol.Sol, 15:459-473, 1978.
 8. Cortez, J.; Lossaint, P. & Billes, G. – L'activité biologique des sols dans les écosystèmes méditerranéens. III. Activités enzymatiques. Rev.Ecol.Biol.Sol., 9:1-19, 1972.
 9. Costa, S.M.G. da – Efeito da adição da vinhaça na dinâmica da microflora do solo de cerrado de Corumbataí, SP. Rio Claro, UNESP, 1983. 130p. (Tese M.S.).
 10. Coutinho, L.M. – O conceito de cerrado. Revista Brasileira de Botânica, 1:17-23, 1978.
 11. Dommergues, V. & Mangenot, F. – Écologie microbiense du sol. Paris, Masson et Cie, 1972. 796p.
 12. Ferreira, E.S. & Monteiro, A.O. – Efeitos da aplicação de vinhaça nas propriedades químicas, físicas e biológicas do solo. Boletim Técnico da Copersucar, (26):3-7, 1987.
 13. Hestrin, S.; Beingold, O.S. & Schramm, M. – Hexoside hydrolases. Methods Enzymology, 1:251-257, 1955.
 14. Larpent, J.P. & Larpent-Gourgaud, M. – Microbiologia prática. EDUSP & Edgard Blucher Ltda., 1975. 160p.
 15. Linhares, L.F.T.L. & Drosdowicz, A. – Atividade celulolítica em alguns solos brasileiros. Revista de Microbiologia, 3:91-100, 1972.
 16. Lopes, A.S. – Solo sob cerrado. Características, propriedades e manejo. 2a. ed., Piracicaba, SP, Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1984. 162p.
 17. Mason, C.F. – Decomposição. Ed. Pedagógica e Universitária (EDUSP), 1980. 63p.
 18. Mc Garity, J.W. & Myers, M.G. – A survey of urease activity in soils of Northern. Plant Soil, 27:217-238, 1967.
 19. Mc Lean, R.C. & Cook, W.R.F. – Practical field ecology: A guide for the Botany Departments of Universities Colleges and Schools. George Allen & Unwin Ltd., 1968. 213p.
 20. Neves, M.C.P., Lima, J.T. & Dobereiner, J. – Efeito da vinhaça sobre a microflora do solo. Revista Brasileira Ciência do Solo, 7:131-136, 1983.
 21. Parkinson, D.; Gray, T.R.G. & Williams, S.T. – Methods for studying the ecology of soil micro-organisms. International Biological Programme, Blackwell Sc. Publ., 1971. 166p.
 22. Schoenlein-Crusius, I.II. – Decomposição e sucessão de fungos em folhas de *Ocotea pulchella* (Nees) Mez. em solo sob cerrado, tratado com vinhaça, no município de Corumbataí, SP. Rio Claro, UNESP, 1988. 195p. (Tese M.S.).
 23. Snedecor, G.W. & Cochran, W.G. – Statistical method. 6^a ed., Iowa State University Press, 1967. 585p.
 24. Stevens, F. – Cellulase preparation from *Helix pomatia* (Snails). Methods Enzymology, 1:173-178, 1955.
 25. Tauk, S.M. – Efeitos de doses cumulativas de vinhaça em algumas propriedades do solo sob cerrado e do solo de culturas de milho e de cana-de-açúcar nos municípios de Corumbataí e Rio Claro, SP. Rio Claro, UNESP, 1987. 349p. (Tese de Livre-Docência).
 26. Watanabe, K. & Fukimbara, T. – Studies on saccharogenic amylase produced by *A. awamori*. J. Ferment. Technol, 45:325-340, 1967.

Recebido para publicação em 11/8/89.

PESQUISA DE *HELICOBACTER (CAMPYLOBACTER) PYLORI* EM PACIENTES COM QUEIXAS REFERENTES AO TRATO GASTROINTESTINAL SUPERIOR

Claude André Solari¹

Eliane Moura Falavina dos Reis¹

Ernesto Hofer¹

Carlos Alberto Basílio²

Charisse Mendoza Salas de Rodriguez Valido²

Luís Leite Luna²

RESUMO

Helicobacter (Campylobacter) pylori tem sido associado à patologia digestiva humana alta. Nesse sentido, foram estudados 50 pacientes consecutivos (19-75 anos), nos quais procedeu-se o exame endoscópico e retirada de 4 fragmentos de biópsia na região do antro gástrico para estudos bacteriológico e histopatológico. A pesquisa de *H. pylori* foi realizada através do teste da urease pré-formada, diretamente na biópsia; da bacterioscopia pelo método de Gram e da cultura. Cortes de fragmentos de biópsia fixados pela formalina foram corados pela Hematoxilina & Eosina e pelo método de Steiner. Doze pacientes apresentaram exame endoscópico normal, e em 38 foram observadas alterações do trato digestivo (gastrite crônica em 19, úlcera péptica em 11 e outras patologias em 8). Foi observada estreita correlação entre a presença de *H. pylori* e gastrite crônica em atividade (100%). *H. pylori* foi detectado no antro gástrico de todos os pacientes portadores de úlcera péptica. A urease foi o teste laboratorial com maior sensibilidade diagnóstica (31/34), seguido do Gram (27/34), impregnação argêntica (27/34) e cultura (17/34).

INTRODUÇÃO

Apesar da presença de bactérias espiraladas em mucosa gástrica humana já ter sido assinalada desde o início do século (4, 6, 12) somente a partir do trabalho de Marshall & Warren (16) despertou-se um interesse maior na avaliação do real significado clínico desse achado.

Warren (24) notou uma estreita correlação entre a presença de bactérias, denominadas ini-

cialmente de "campylobacter-like organism (CLO)", e certas alterações histopatológicas compatíveis com gastrite crônica em atividade, traduzidas por infiltrado linfocitário, de células plasmáticas e notadamente de polimorfonucleares.

Marshall (15) partindo do princípio de que se tratava de uma das espécies do gênero *Campylobacter*, empregou técnicas clássicas de isolamento, que consistiram no cultivo de fragmentos

1. Depto. de Bacteriologia, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Caixa Postal 926, 20010 Rio de Janeiro RJ, Brasil
2. Setores de Anatomia Patológica Cirúrgica e de Endoscopia Digestiva, Hospital São Vicente de Paulo, Rua Dr. Satamini, 333 – Tijuca, 20270 Rio de Janeiro RJ, Brasil

de biópsia em agar chocolate e em atmosfera úmida de microacrosíbia, obtendo crescimento de microrganismos classificados como *Campylobacter pyloridis*, *Campylobacter pylori* e atualmente denominados *Helicobacter pylori* (7).

Marshall & Warren (16), num estudo prospectivo de 100 casos, observaram a presença da bactéria em 95% dos pacientes com gastrite crônica em atividade, inclusive nos 13 com úlcera duodenal, e em 18 dos 22 com úlcera gástrica. Subseqüentemente, a evidenciação de *H. pylori* em mucosa gástrica foi confirmada por numerosos trabalhos (1, 10, 13, 21).

H. pylori possui potente urease (14, 20) produzida de modo constitutivo, o que permitiu o desenvolvimento de testes presuntivos (9, 18) para a detecção da presença da bactéria, diretamente dos fragmentos de biópsia gástrica.

Esse trabalho tem por objetivo detectar a presença de *H. pylori* na mucosa gástrica de pacientes com queixas referentes ao trato gastrointestinal superior, através de métodos bacteriológicos e histopatológicos, correlacionando estes resultados com os achados endoscópicos e histopatológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes

O estudo foi realizado em 50 pacientes consecutivos, com queixas referentes ao trato digestivo superior, que foram encaminhadas ao Serviço de Endoscopia do Hospital São Vicente de Paulo, RJ, para esclarecimento diagnóstico. A amostragem foi constituída de 29 mulheres e 21 homens, distribuídos na faixa etária de 19 a 75 anos, com média de idade de 47 anos.

Endoscopia, colheita e transporte

Após prévio consentimento do paciente e afastadas as contra-indicações formais, procedeu-se à anestesia da orofaringe com nebulização local de cloridrato de lidocaína a 2% e injetou-se, por via intravenosa, associação de ansiolítico (Diazepam 10mg) e hipnoanalgésico (Meperidina 50mg). Em seguida, introduziu-se o endoscópio Olympus XQ para estudo do trajeto esofagogastrroduodenal, retirando-se quatro fragmentos de biópsia da mucosa do antro gástrico a aproximadamente 2 centímetros do piloro. Os fragmentos foram imersos nas seguintes soluções: uréia,

tamponada com indicador (0,05ml), teste presuntivo da presença de *H. pylori* segundo Hazell et al. (9); glicose a 20% (0,5ml), meio de transporte para análise bacteriológica; e formalina a 10%, preservador histopatológico (2 fragmentos).

Bacteriologia

O teste presuntivo (teste de urease pré-formada) foi acompanhado até 24 horas com o intuito de se observar atividade ureásica.

O material para exame bacteriológico foi encaminhado ao laboratório, sob refrigeração a 4°C em recipiente isotérmico, sendo processado num intervalo de tempo inferior a 3 horas.

O fragmento de biópsia foi semeado por rolagem na superfície de meio seletivo, preconizado por Goodwin et al (8), e incubado a 37°C em atmosfera de microacrosíbia (obtida com o emprego de envelope Gas Pak® BBL gerador de H₂ e CO₂, sem catalisador). Do mesmo fragmento, após semeadura, preparou-se um esfregaço destinado à bacterioscopia pelo método de Gram.

A jarra contendo a cultura foi mantida por 7 dias em observação, sendo aberta nos 3º e 7º dias. A caracterização de *H. pylori* se baseou na morfologia colonial, na presença de formas espiraladas, Gram-negativas, oxidase, catalase e urease positivas, de acordo com Czin, Carr & Aronoff (3).

Histopatologia

No estudo histopatológico empregou-se o método de coloração pela Hematoxilina & Eosina, para diagnóstico e classificação da gastrite (24) e o método da impregnação pela prata, segundo Steiner (22), para evidenciação de formas espiraladas.

RESULTADOS

O exame endoscópico foi normal em 12 pacientes. Em 38 havia alterações do trato digestivo superior (gastrite crônica em 19, úlcera péptica em 11, bulbite em 3, esofagite em 2, adenocarcinoma gástrico em 1, pólipos gástricos em 1 e cicatriz de úlcera péptica em 1).

A presença de *H. pylori* foi detectada por um ou mais métodos em 34 pacientes (68%).

Dentre os métodos empregados, o teste da urease pré-formada apresentou maior índice de positividade 31/34 (91,1%); seguido do Gram e impregnação pela prata 27/34 (79,4%) e da cultu-

ra 17/34 (50%). A identificação de *H. pylori* concomitantemente através de 3 ou 4 métodos, ocorreu em 76,3% dos casos. Em apenas 4 pacientes (11,7%), detectou-se a presença do microrganismo somente por um método, sendo 2 através da urease pré-formada e 2 por meio da impregnação pela prata.

O tempo de viragem do teste presuntivo, evidenciando atividade ureásica, foi inferior a uma hora em 19 oportunidades (61,2%).

Na histopatologia, pelo método de H & E, diagnosticou-se gastrite crônica em atividade (GCA) em 31 pacientes (91,1%) dos 34 portadores de *H. pylori* (Tabela 1). Todos os pacientes com diagnóstico endoscópico de úlcera péptica apresentaram gastrite crônica em atividade.

Numa avaliação global do exame endoscópico e dos diferentes métodos empregados, *H. pylori* foi detectado em 100% dos pacientes portadores de úlcera péptica; em 84,2% (16/19) dos pacientes com gastrite crônica (com ou sem atividade) e, em 25% dos pacientes considerados normais, endoscopicamente.

Tabela 1 – Correlação entre achados histopatológicos e presença de *H. pylori* na mucosa antral de 50 pacientes com queixas referentes ao trato digestivo superior.

<i>Histopatologia</i>	<i>H. pylori</i>	
	Presença	Ausência
Gastrite crônica com atividade	31	0
sem atividade	3	7
Normal	0	9
Total	34	16

DISCUSSÃO

A evidenciação de *H. pylori* em mucosa gástrica de pacientes com queixas referentes ao trato digestivo superior e encaminhados a endoscopia tem sido relatada numa faixa que varia de 57,5 a 78% (2, 5, 10, 11, 14). Empregando técnicas bac-

teriológicas (teste da urease pré-formada, bacterioscopia pelo Gram e cultura) e histopatológica (impregnação argêntica de Steiner) detectamos a presença de *H. pylori* em 68% (34/50) dos pacientes estudados. Entre os métodos de diagnóstico utilizados o teste da urease pré-formada apresentou maior índice de positividade 91,1% (31/34); seguido da coloração pelo Gram e impregnação argêntica de Steiner, com o mesmo índice 79,4% (27/34), e da cultura com 50% (17/34). Nossa dado em relação à urease pré-formada foi semelhante aos obtidos por Ferrari (5) e Morris (19), e inferior ao de Marshall (18), que observou 98,7% de positividade.

No tocante ao Gram, considerando as várias investigações (2, 5, 11, 19, 23), assinala-se uma variação de 81 a 90% de positividade, enquanto o nosso resultado se situou em 79,4%. Talvez esta discreta inferioridade seja resultado da rarefação ou até mesmo esgotamento do material pelo fato de se preparar o esfregaço, destinado à bacterioscopia, após semeadura do mesmo por rolagem.

Em relação à eficácia da impregnação argêntica, "The Gastrointestinal Physiology Working Group" (23) obteve percentual maior que o nosso (90% contra 79,4%). É possível supor a presença de bactérias em número reduzido ou mesmo a retirada de fragmentos de biópsia inadequados, dificultando a evidenciação dos microrganismos.

Quanto a cultura, onde os dados variam de 43,3 a 100% (1, 2, 5, 16) obtivemos 50% de êxito no isolamento, no entanto, devemos ressaltar que vários fatores podem induzir a resultados falsos-negativos, citando-se a deglutição de anestésico na endoscopia, o uso prévio de antimicrobianos ou sais de bismuto e ainda a presença de cimetidina ou ranitidina no estômago (17).

O tempo de viragem do teste presuntivo no presente estudo foi inferior a uma hora em 61,2% dos casos, índice um pouco menor que os obtidos por Hazell (9) e Marshall (18), respectivamente 75 e 77%. É provável que estes autores tenham considerado como positivos os testes que apresentavam pequena variação de cor que se acentua com o decorrer do tempo.

A Histopatologia (H & E) revelou 31 casos de gastrite crônica em atividade (GCA), nos quais detectou-se a presença de *H. pylori* em todos (100%), dado esse superior ao de Marshall (16) e de Coelho (2) que obtiveram respectivamente 95% e 89%. Quanto a relação de *H. pylori* e gastrite crônica inativa tivemos 3 casos em 10 (30%), proporção bastante inferior a desses mes-

mos autores: 17/29 (16) e 17/21 (2), provavelmente devendo-se ao fato de que a gastrite não se distribui uniformemente e com igual intensidade por todo o antró gástrico, bem como aos diferentes critérios de classificação de gastrite adotados pelos autores. Correlacionando-se a endoscopia e detecção de *H. pylori* verificamos que 100% dos pacientes portadores de úlcera péptica (gástrica e/ou duodenal) estavam colonizados por *H. pylori*, achado semelhante ao de Coelho (2) e superior ao de Marshall (16); 84,2% dos pacientes com gastrite à endoscopia foram positivas para *H. pylori*, freqüência superior a de outros autores (2, 13), e 25% dos pacientes com laudo endoscópico normal apresentaram *H. pylori*, índice inferior aos obtidos em outros trabalhos (2, 13, 21).

Numa análise global, notou-se elevada associação entre a presença de *H. pylori* e gastrite crônica em atividade, fator talvez predisponente à ulceração péptica. A detecção de *H. pylori* em pacientes com exame endoscópico normal torna imperiosa a necessidade de se pesquisar *H. pylori* por métodos bacteriológicos e/ou histopatológicos, devendo-se ressaltar que é preferível, para maior segurança, empregar mais de um método de diagnóstico, apesar do alto índice de positividade e sensibilidade do teste da urease pré-formada.

SUMMARY

Helicobacter (Campylobacter) pylori in patients with upper gastrointestinal symptoms

The bacteriology of the stomach and the duodenum was neglected during many years, but the recognition and isolation of *Helicobacter pylori* has opened new perspectives in our understanding of inflammatory gastroduodenal disorders. *H. pylori* has been associated with gastritis, duodenal and gastric ulcer, and nonulcer dyspepsia in many countries. We searched for *H. pylori* in 50 consecutive patients (29 females and 21 males, range 19-75 years, mean age 47) referred for endoscopy to the upper gastrointestinal tract. Biopsy specimens from the gastric antral mucosa were analysed by bacteriological and histological techniques. The presence of *H. pylori* was investigated by urease test, directly in the gastric biopsy sample; Gram stain; culture in selective lysed horse blood agar and Steiner silver stain. The biopsy specimens for histopathologic study were fixed in formalin and the sections were stained by Hema-

toxilin & Eosin. Streaked plates were incubated at 37°C in a microaerophilic environment for 7 days. *H. pylori* were identified as oxidase, catalase and urease positive gram-negative curved bacilli. The endoscopy revealed 12 patients without abnormalities and 38 with disorders of the upper gastrointestinal tract (19 with chronic gastritis, 5 with gastric ulcer, 5 with duodenal ulcer, 1 with gastric and duodenal ulcer, 3 with duodenitis, 2 with esophagitis, 1 with gastric carcinoma, 1 with gastric polyp, and 1 with gastric ulcer scar). *H. pylori* was detected by one or more techniques in 34 (68%) of the 50 cases examined. *H. pylori* was present in all of 31 patients with active chronic gastritis, in 3 of 10 patients with inactive chronic gastritis and in none of the 9 normal patients. The increased rate of infection caused by *H. pylori* in the gastric antrum of patients with peptic ulcer may lead to the hypothesis that the infection is a predisposing factor to ulceration. The detection of urease enzyme was the test with highest diagnostic sensitivity (31/34), followed by Gram stain (27/34), silver stain (27/34), and culture (17/34).

AGRADECIMENTOS

À estagiária Roberta Salgado Pinto Nogueira, a enfermeira Rosângela Cosmo da Silva e aos histotécnicos Ari Jorge Passos e Lourival de Jesus Costa pela colaboração prestada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Buck, G.E.; Gourley, W.K.; Lee, W.K.; Subramanyan, K.; Latimer, J.M. & DiNuzzo, A.R. - Relation of *Campylobacter pyloridis* to gastritis and peptic ulcer. J. Infect. Dis. 153:664-669, 1986.
2. Coelho, L.G.V.; Das, S.S.; Karim, Q.N.; Walker, M.M.; Queiroz, D.M.M.; Mendes, E.N.; Lima Jr., G.F.; Oliveira, C.A.; Baron, J.H. & Castro, L.P. - *Campylobacter pyloridis* in the upper gastrointestinal tract: a brazilian study. Arq. Gastroenterol. São Paulo, 24:5-9, 1987.
3. Czinn, S.; Carr, H. & Aronoff, S. - Susceptibility of *Campylobacter pyloridis* to three macrolide antibiotics (erythromycin, roxithromycin \ddagger RU 28965 \ddagger and CP 62993) and rifampin. Antimicrob. Agents Chemother., 30:328-329, 1986.
4. Doenges, J.L. - Spirochetes in the gastric glands of *Macacus rhesus* and the man without related disease. Arch. Pathol., 27:469-477, 1939.
5. Ferrari Jr., A.P.; Geocze, S.; Trabulsi, L.R.; Toledo, M.R.F. & Vilela, M.P. - *Campylobacter pylori* in dyspeptic patients. Rev. Hosp. S. Paulo; Esc. Paul. Med., 1:65-68, 1989.
6. Freedberg, A.S. & Barron, L.E. - The presence of

- spirochetes in human gastric mucosa. Am. J. Dig. Dis., 7:443-445, 1940.
7. Goodwin, C.S.; Armstrong, J.A.; Chilvers, T.; Peters, M.; Collins, M.D.; Sly, L.; McConnel, W. & Harper, W.E.S. – Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. Int. J. Syst. Bacteriol., 39:397-405, 1989.
 8. Goodwin, C.S.; Blincow, E.D.; Warren, J.R.; Waters, T.E.; Sanderson, C.R. & Easton, L. – Evaluation of cultural techniques for isolation *Campylobacter pyloridis* from endoscopic biopsies of gastric mucosa. J. Clin. Pathol., 38:1127-1131, 1985.
 9. Hazell, S.L.; Borody, T.J.; Gal, A. & Lee, A. – *Campylobacter pyloridis* gastritis I: detection of urease as a marker of bacterial colonization and gastritis. Am. J. Gastroenterol., 82:292-296, 1987.
 10. Itoh, T.; Yanagawa, Y.; Shingaki, M.; Takahashi, M.; Kai, A.; Ohashi, M. & Hamana, G. – Isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa and characterization of the isolates. Microbiol. Immunol., 31:603-614, 1987.
 11. Jones, D.M.; Lessells, A.M. & Eldridge, J. – Campylobacter-like organism on the mucosa: culture, histological, and serological studies. J. Clin. Pathol., 37:1002-1006, 1984.
 12. Krienitz, W. – Ueber das auftreten von spirochäten verschiedener form im mageninhalt bei carcinoma ventriculi. Dtsch. Med. Wochenschr., 22:872, 1906.
 13. Lamouliatte, H.; Mégraud, F.; de Mascarel, A.; Roux, D. & Quinton, A. – “*Campylobacter pyloridis*” and epigastric pain: endoscopic, histological, and bacteriological correlations. Gastroenterol. Clin. Biol., 11:212-216, 1987.
 14. Langenberg, M.L.; Tytgat, G.N.J.; Schipper, M.E.I.; Rietra, P.J.G.M. & Zanen, H.C. – Campylobacter-like organisms in the stomach of patients and healthy individuals. Lancet, I (8390):1348, 1984.
 15. Marshall, B.J. – Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet, I (8336):1273-1275, 1983.
 16. Marshall, B.J. & Warren, J.R. – Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastric and peptic ulceration. Lancet, I (8390):1311-1315, 1984.
 17. Marshall, B.J.; McGechie, D.B.; Rogers, P.A. & Glancy, R.J. – Pyloric campylobacter infection and gastroduodenal disease. Med. J. Austr., 142:439-444, 1985.
 18. Marshall, B.J.; Warren, J.R.; Francis, G.J.; Langton, S.R.; Goodwin, C.S. & Blincow, E.D. – Rapid urease test in the management of *Campylobacter pyloridis* - associated gastritis. Am. J. Gastroenterol., 82:200-210, 1987.
 19. Morris, A.; McIntyre, D.; Rose, T. & Nicholson, G. – Rapid diagnosis of *Campylobacter pyloridis* infection. Lancet, I (8473):149, 1986.
 20. Owen, R.J.; Martin, S.R. & Borman, P. – Rapid urea hydrolysis by gastric campylobacters. Lancet, I (8420):111, 1985.
 21. Price, A.B.; Levi, J.; Dolby, J.M.; Dunscombe, P.L.; Smith, A.; Clark, J. & Stephenson, M.L. – *Campylobacter pyloridis* in peptic ulcer disease: microbiology, pathology, and scanning electron microscopy. Gut, 26:1183-1188, 1985.
 22. Steiner, G. & Steiner, G. – New simple silver stain for demonstration of bacteria, spirochetes, and fungi in sections from paraffin-embedded tissue blocks. J. Lab. & Clin. Med., 29:868-871, 1944.
 23. The Gastrointestinal Physiology Working Group. Rapid identification of pyloric *Campylobacter* in peruvians with gastritis. Dig. Dis. Scien., 31:1089-1094, 1986.
 24. Warren, J.R. – Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet, I (8336):1273, 1983.

Recebido para publicação em 4/10/89



EFICIÊNCIA DE VÁRIAS AMOSTRAS DO VÍRUS DA DOENÇA DE NEWCASTLE NA PRODUÇÃO DE INTERFERON HUMANO DE MEMBRANAS AMNIÓTICAS

Erna Geessien Kroon¹

Paulo César Peregrino Ferreira¹

Romain Rolland Golher¹

RESUMO

A eficiência de oito amostras de vírus da doença de Newcastle (NDV) na produção de interferon humano de membrana amniótica (IFN-MA) foi investigada. Utilizando-se os fluidos alantóicos obtidos de ovos embrionados *in natura*, títulos maiores de IFN-MA foram produzidos com as amostras Texas-2, H595, F2 e Roakin; quantidades médias foram induzidas pelas amostras Victória e La Sota e níveis baixos pelas amostras Herts e L-12. Quando os vírus foram diluídos para ter a mesma dose infectante para ovos embrionados, as amostras Roakin, Texas-2 e H595 foram as mais eficientes na produção de IFN-MA. Se a indução fosse feita com o mesmo número de unidades hemaglutinantes, níveis mais altos de IFN-MA derivaram de âmnios infectados com as amostras Texas-2 e Roakin. Em diferentes âmnios, a quantidade de IFN-MA produzida variou menos com as amostras Texas-2, Roakin, H595 e F2. As duas primeiras induziram títulos mais altos de IFN-MA. Não se observou relação entre unidades hemaglutinantes e patogenicidade das amostras de NDV com os níveis de IFN-MA produzidos.

INTRODUÇÃO

Os interferons (IFN) constituem uma família de proteínas naturais dotadas de efeitos pleiotrópicos, sendo das mais marcantes suas atividades anti-vírica e anti-cellular (20). São atualmente empregados como agentes terapêuticos em infecções causadas por vírus e tumores (17, 18).

Para sua aplicação clínica, o interferon humano tem sido derivado de leucócitos (3), fibroblastos (21), células linfoblastoides (22) e de bactérias (7) por métodos de DNA recombinante.

Outra fonte capaz de fornecer tecido humano para a produção de IFN é a placenta humana. Falcoff et al (5) utilizaram fragmentos de âmnio para a produção de IFN. Novo e Golher (16)

investigando os tecidos placentários - membrana amniótica, membrana e vilosidades coriônicas - verificaram que a membrana amniótica era a melhor produtora quando infectada pelo vírus da doença de Newcastle (NDV) amostra Victória.

O sistema membrana amniótica - NDV tem características interessantes: a matéria prima é abundante, de baixo custo e de fácil obtenção; o processo de produção de interferon é simples (5, 16) e o IFN pode ser obtido em baixa concentração de soro (E.G. Kroon, P.C.P. Ferreira e R.R. Golher, em preparo).

Por outro lado, freqüentemente diferentes amostras de um mesmo vírus induzem quantidades diferentes de IFN (10). Em relação ao NDV, vários trabalhos demonstraram este fato em ovos embrionados, galinhas e camundongos (2,

1 Laboratório de Vírus, Depto. de Microbiologia – ICB – UFMG, 30161 Belo Horizonte MG, Brasil

11-14). Conseqüentemente, investigações comparativas entre diversas amostras de NDV foram realizadas, para se conhecer mais profundamente a indução do IFN-MA e melhorar este sistema a fim de alcançar títulos mais significativos deste interferon.

MATERIAL E MÉTODOS

Vírus

Foram utilizadas oito amostras de NDV. A amostra Victoria foi cedida pelo Dr. Kurt Paucker, de Filadélfia, EUA. As amostras Texas-2, Herts 33, L12, F2, La Sota e H595 foram fornecidas pelo Dr. Bela Lomniczi, de Budapeste, Hungria e a amostra Roakin dos National Institute of Health, Bethesda, Md, EUA. Os estoques de vírus foram obtidos pela multiplicação em ovos embrionados de galinha e o título infectante das amostras pela determinação da dose mortal para 50% dos embriões de galinha (1). O título hemaglutinante em microtécnica foi realizado conforme Grandi (8).

O vírus Sindbis foi doado pelo Dr. Norman B. Finter, de Beckenham, Kent, Inglaterra e multiplicado em células Vero. Seu título foi determinado pelo cálculo da dose infectante para 50% das câmaras (WID₅₀) em células Vero (6).

Interferon

Placentas de parto cesáreo foram colhidas em solução salina de Hanks (SSH) (9) contendo antibióticos. A membrana amniótica foi retirada e lavada em SSH. Cortou-se a membrana em pequenos fragmentos e 5 g eram colocados em um frasco. A cada frasco foram adicionadas amostras de NDV diluídas 1:5 (0,8ml/g de tecido). Transcorrida uma hora de adsorção a 37°C, o excesso de vírus foi removido e acrescentou-se 6 ml/g de tecido de meio mínimo (4), com 1% de soro de carneiro e antibióticos, por mais uma hora. Depois deste pré-tratamento, iniciou-se a indução propriamente dita, retirando-se o meio e adicionando-se o NDV (0,8ml/g de tecido) retirando-se o excesso de vírus e acrescentando-se o mesmo meio (6 ml/g de tecido) após 2h. a 37°C. Dependendo do experimento, os sobrenadantes foram colhidos depois de 24 a 48 horas de incubação a 37°C, renovando-se o meio. Aliquotas dos sobrenadantes foram colhidas, submetidas à luz ultra-

violeta (UV) durante 2 minutos e mantidas a -20°C.

A titulação de IFN-MA foi feita pela microtécnica, essencialmente conforme Ferreira et al (6). As preparações foram diluídas em série de 2 em placas de 96 câmaras e foram adicionadas células Vero. Depois de 24 horas de incubação a 37°C a 5% CO₂, as células de cada câmara foram infectadas com aproximadamente 100 WID₅₀ de vírus Sindbis e as placas reincubadas. Quando o efeito citopático dos controles de vírus alcançava 75 a 100% de monocamada de células, a leitura final foi realizada. O inverso da diluição causando 50% de inibição do ECP era tomado como título. Em cada titulação, um padrão interno de IFN-MA foi utilizado e os títulos ajustados ao título deste padrão e em 30 titulações, o coeficiente de variação foi de 27%. Cada unidade do laboratório correspondeu a 0,4 unidades do padrão internacional de interferon humano "research standard B 19/".

RESULTADOS

Comparação entre diferentes amostras – Foram utilizadas oito amostras de NDV. Primeiramente, as amostras foram utilizadas diluídas 1:5, na fase de pré-tratamento e, na indução, não diluídas, isto é, "in natura". Desta forma, foi possível verificar a sua capacidade de indução, em relação à quantidade de vírus encontrada nos fluidos alantóicos. Como controle, utilizou-se a amostra Victoria, que era rotineiramente empregada.

Observando-se os resultados da Tabela 1, verifica-se que as amostras Texas-2, H595, F2 e Roakin foram as melhores indutoras, sendo que as amostras Herts-33 e L12 induziram baixos títulos de interferon, e que as amostras Victoria e La Sota induziram quantidades intermediárias. A produção de interferon em 48 horas decai com a maioria das amostras, de 50% a 87%, fazendo exceção, neste experimento, a amostra Roakin, que não apresentou redução na produção de interferon.

A irradiação das diferentes amostras utilizadas no pré-tratamento e na indução, com luz UV no tempo de 10 a 80 segundos, não alterou os títulos de interferon (dados não mostrados).

Efeito da dose infectante – A influência das unidades infecciosas víricas na produção de interferon foi analisada, num estudo comparativo entre as amostras, utilizadas numa mesma concentração.

Tabela 1 – Produção de interferon em ámnio humano por diferentes amostras do vírus da doença de Newcastle.

âmnio	amostra	dose de vírus ($EID_{50}/ml \times 10^6$)		interferon produzido (U/ml)	
		pré-tratamento(a)	indução(b)	24h	48h
A	Victoria	700	3500	400	100
	Herts-13	10	50	30	<10
	H595	100	500	6400	800
	Texas-2	40	200	3200	800
B	Victoria	700	3500	1600	500
	F2	200	1000	3200	800
	L12	1240	6200	40	<10
	La Sota	40	200	400	200
	Roakin	4	20	1600	1600

(a) Pré-tratamento – fluido alantóico diluído 1:5

(b) Indução – fluido alantóico “in natura”

Tabela 2 – Produção de interferon em ámnio humano por diferente amostras do vírus da doença de Newcastle com a mesma dose infectante.

Amostras	Interferon produzindo U/ml			U IF/ EID_{50} ($\times 10^{-5}$) ^(a)
	24h	48h	72h	
Victoria	100	30	30	0,8
F2	100	30	20	0,7
Herts-33	100	30	20	0,7
H595	3200	500	100	19,0
L12	100	30	100	1,1
La Sota	1600	300	200	10,5
Roakin	2400	800	200	17,0
Texas-2	3200	300	60	17,8

(a) Relação entre o total de unidades de interferon produzidas e dose infectante para 50% dos ovos embrionados.

As amostras foram diluídas em solução de Hanks a 4°C, na mesma dose infectante para 50% dos ovos embrionados, cuja concentração foi de $2 \times 10^6 EID_{50}/ml$ na indução e $2 \times 10^6 EID_{50}/ml$ no pré-tratamento. Esta dose é a correspondente à concentração da amostra com menor título (Roakin).

Maiores quantidades de interferon foram in-

Tabela 3 – Produção de interferon em ámnio humano por diferentes amostras do vírus da doença de Newcastle com a mesma dose hemaglutinante

Amostras	interferon produzido U/ml			U IF/UH ^(a)
	24h	48h	72h	
Victoria	300	100	1,2	
F2	800	1600	7,0	
Herts-33	100	400	1,5	
H595	1600	800	7,0	
L12	1600	800	7,0	
La Sota	800	200	3,0	
Roakin	3200	600	11,0	
Texas-2	3200	800	12,0	

(a) Relação entre o total de unidades de interferon produzidas por unidade hemaglutinante.

duzidas pelas amostras Roakin, Texas-2, H595 e La Sota (Tabela 2). Fazendo-se uma relação entre o total de unidades de interferon produzidas e a dose infectante para 50% dos ovos embrionados, verificou-se que as amostras Roakin, Texas-2 e H595 apresentaram valores mais altos.

Na coleta de interferon em 72 horas, ocorreu na maioria das amostras uma queda no título de interferon, o que também foi observado no intervalo de tempo de 24 a 48 horas, fazendo exceção

Tabela 4 – Produção de interferon com amostras de vírus da doença de Newcastle em diferentes âmnios

Amostras	Nº de âmnios	dose vírus (EID ₅₀ /ml x 10 ⁶)		interferon produzido U/ml	média ^(a)
		pré-tratamento	indução	variação	
Victoria	10	700	3400	660 – 3800	1900
F ₂	5	200	1000	2600 – 5300	3700
Herts-33	4	0,7 – 2	7 – 20	100 – 500	200
H595	5	2 – 8	20 – 80	2120 – 3800	2700
L ₁₂	4	80	800	460 – 2400	700
La Sota	6	2 – 2,5	20-25	80 – 2000	800
Roakin	8	1 – 4	20	2900 – 6400	4400
Texas-2	9	2 – 40	20 – 200	2200 – 5600	4100

(a) Média de interferon produzido nos diferentes âmnios em 24 e 48 horas.

as amostras que produziram menor quantidade de interferon. Como os títulos foram muito baixos em 72 horas, apenas os fluidos de 24 e 48 horas foram coletados nos experimentos subsequentes.

Efeito da dose hemaglutinante – A Tabela 2 mostra um estudo comparativo entre as diferentes amostras utilizadas com a mesma dose hemaglutinante, sendo 320 unidades hemaglutinantes/ml na indução e de 32 unidades hemaglutinantes/ml no pré-tratamento. As amostras foram diluídas em solução salina de Hanks, na concentração da amostra Texas-2, que apresentou a menor dose hemaglutinante. A melhor produção em total de unidades de interferon foi à das amostras Texas-2 e Roakin. Estas amostras também apresentaram um índice mais elevado quando feita a relação entre o total de unidades de interferon produzidas e a dose hemaglutinante. As amostras F₂ e Herts-33, ao contrário das outras amostras, como já havia sido observado anteriormente, induziram títulos mais altos de interferon em 48 horas. Estas amostras foram diluídas respectivamente a 1:16 e 1:8 para se obter a mesma dose hemaglutinante, podendo desta forma ter sido necessária a multiplicação do vírus para posterior indução de interferon.

Utilização de âmnios de diferentes doadoras – Os dados da Tabela 4, de diversos experimentos realizados, mostram as diferentes concentrações das amostras empregadas no pré-tratamento e indução e a variação e média de interferon produ-

zido por vários âmnios. Algumas das amostras apresentaram títulos superiores e maior constância na produção de interferon, quando foram utilizadas membranas amnióticas de diferentes doadoras.

As amostras Texas-2, Roakin, H595 e F₂ foram boas indutoras de interferon e as amostras L₁₂ e La Sota foram indutoras intermediárias, sendo que à amostra Herts-33 apresentou os títulos mais baixos de interferon.

DISCUSSÃO

A indução de interferon com várias amostras de vírus pode, freqüentemente, levar à indução de quantidades diferentes de interferon (10).

Dentre as amostras de NDV utilizadas neste trabalho, (Tabela 1), as amostras Texas-2, H595, F₂ e Roakin foram boas indutoras de interferon no sistema empregado, sendo que a amostra Texas-2 é velogênica, H595, F₂ e Roakin são mesogênicas e F₂ é lentogênica. Resultados conflitantes são descritos na literatura sobre a relação entre a produção de interferon e a virulência de diferentes amostras de NDV, conforme o tecido utilizado. Em ovos embrionados, as amostras avirulentas lentogênicas não produziram quantidades detectáveis de interferon (2), enquanto Lomniczi (11) obteve variações na produção de interferon entre as 26 amostras virulentas velogênicas e avirulentas que utilizou. Em galinhas, Solovyov et al (19) e Lomniczi (12) verificaram que as amostras víru-

lentas são as melhores indutoras de interferon, porém Lomniczi (11) utilizando fibroblasto de galinha não conseguiu reproduzir esses achados. Em camundongos, que são animais naturalmente insusceptíveis ao NDV, obtiveram-se maiores títulos de interferon com amostras virulentas (14). Portanto, não se pode relacionar a virulência das amostras com a produção de interferon.

Observando a Tabela 2, verificamos que quatro amostras de NDV - Roakin, Texas-2, H595 e La Sota - induziram maior quantidade de interferon, quando as amostras foram utilizadas na mesma dose infectante para 50% dos embriões, que foi de 2×10^7 IED₅₀/ml na indução. Verificou-se que determinadas amostras, com esta mesma dose, não produziram quantidades significativas, sendo a relação de unidades de interferon produzido por unidade infectante muito baixa. Solovyov et al (19) procurou explicar a melhor capacidade indutora das amostras virulentas, pela maior multiplicação destas amostras, pois verificou-se que poucos sistemas hospedeiros são permissivos para esse vírus (15).

É possível que a maior produção de interferon seja resultante de uma multiplicação mais eficiente no tecido utilizado. Outros fatores, como a diferente toxicidade das amostras para as células ou a formação mais eficiente de RNA de fita dupla, também poderiam alterar este processo de indução que deverão ser investigados.

As amostras Roakin e Texas-2 (Tabela 3) apresentaram títulos mais altos de interferon por unidade hemaglutinante. Entretanto, a quantidade de hemaglutinina não é preponderante na produção de interferon no sistema empregado, uma vez que as amostras com títulos hemaglutinantes elevados (Herts33, L₁₂) não se apresentaram como boas indutoras. Desta forma, não se encontrou relação entre partículas infectantes e unidades hemaglutinantes, nas diferentes amostras utilizadas.

Os dados da Tabela 4 apresentam o comportamento das amostras de NDV em diferentes âmnihos e as amostras Texas-2 e Roakin apresentaram maior constância na produção de interferon e a média de produção mais alta. A amostra F₂, apesar de produzir uma quantidade alta, foi incapaz de induzir interferon em determinadas membranas amnióticas, sendo por este motivo considerada uma amostra indutora intermediária. A amostra H595 apesar de produzir uma quantidade média menor de interferon, apresentou uma produção relativamente constante, sendo por isso classificada como uma boa indutora. As amostras L₁₂,

La Sota e Herts-33 apresentaram uma baixa produção de interferon, nas condições do ensaio.

A amostra Texas-2, em virtude de apresentar em diferentes âmnihos menor variação, maior produção média e títulos mais significativos na produção de interferon e, além disso, maior facilidade de multiplicação, associada a títulos maiores em ovos embrionados foi selecionada como a amostra indutora padrão para investigações posteriores sobre a produção de IFN-MA.

SUMMARY

The efficiency of eight strains of Newcastle disease virus (NDV) for the production of human amniotic membrane interferon (IFN-MA) was investigated. With egg allantoic fluids, higher titers of IFN-MA were obtained with the strains Texas-2, H595, F2 and Roakin; medium amounts were induced by Victoria and La Sota strains and lowest titers by the Herts and L-12 strains. When the viruses were diluted to the same egg infectious dose, the Roakin, Texas-2, and H595 strains were more effective in the production of IFN-MA. If the induction was performed with the same hemmagglutinating units, higher levels of IFN-MA derived from amniots infected with the Texas-2 and Roakin strains. In different amniots, the quantity of the IFN-MA produced varied less with the strains Texas-2, Roakin, H595 and F-2; the first two induced higher titers of IFN-MA. No relation was observed between hemmagglutinating units or virulence of NDV strains and the quantities of induced IFN-MA.

AGRADECIMENTOS

Ao corpo clínico e de enfermagem da Maternidade Otaviano Neves e do Hospital São Lucas pelas placenta fornecidas.

A João Rodrigues dos Santos, Maria Lúcia Trindade e a Bernadete de Jesus Martins pelo eficiente auxílio técnico e a Angela Sana Lopes pela datilografia.

Este trabalho foi auxiliado pela CAPES, CNPq (proc. 2222.0687/76) e convênios FINEP/Departamento de Microbiologia 324/CT e B/39/253/00/300.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bankowski, R.A. - Cytopathogenicity of Newcastle disease virus *In:* Hanson, R.P. ed. Newcastle disease virus. University of Wisconsin, Madison; p. 231-246, 1964.
2. Baron, S. - Relationship of interferon and temperature to virulence of Newcastle disease virus. *In:* Hanson, R.P. ed. Newcastle disease virus. University of Wisconsin, Madison, p. 205-230, 1964.
3. Cantell, K. & Hirvonen, S. - Preparation of human leukocyte interferon for clinical use. *Tex. Rep. Biol. Med.* 35:138-141, 1977.
4. Eagle, H. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science* 130:432, 1959.
5. Falcoff, E.; Falcoff, R.; Fournier, F. & Chany, C. - Production en masse, purification partielle et caractérisation d'un interferon destiné à des essais thérapeutiques humains. *Ann. Inst. Pasteur, Paris.* 111:562-584, 1966.
6. Ferreira, P.C.P.; Peixoto, M.L.P.; Silva, M.A.V. & Golgher, R.R. - Assay of human interferon in Vero cells by several methods. *J. Clin. Microbiol.* 9:471-475, 1979.
7. Goeddel, D.V.; Yelverton, E.; Ulrich, A.; Heyneker, H.L.; Mozzari, G.; Holmes, W.; Seeburg, P.H.; Dull, R.; May, L.; Stebbing, N.; Crea, R.; Maeda, S.; McCandliss, R.; Sloma, A.; Gross, M.; Familletti, P.C. & Pestka, S. - Human leucocyte interferon produced by *E. coli*, biological active. *Nature*, 287:411-416, 1980.
8. Grandi, T.S.M. - Produção de hemaglutininas de arbovírus do grupo C (Bunyaviridae) em células Vero. Tese de Mestrado. Belo Horizonte, 1978.
9. Hanks, J.H. & Wallace, R.E. - Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 71:196-200, 1949.
10. Ho, M. - Factors influencing interferon production. *Front. Biol.* 2:73-105, 1973.
11. Lomniczi, B. - Studies on interferon production and sensitivity of different strains of Newcastle disease virus. *J. Gen. Virol.* 21:305-313, 1973.
12. Lomniczi, B. - Systemic induction of interferon in chicks with various NDV strains. I. Relationship between virulence of the virus and mechanism of the interferon production. *Arch. gesamte Virusforsch.* 30:159-166, 1970.
13. Mentkevich, L.M. - Interferon formation and multiplication of virulent and avirulent strains of Newcastle disease virus in the chick embryos. *Acta Virol.*, 10:280, 1966.
14. Mentkevich, L.M. & Orlova, T.G. - Multiplication of Newcastle disease virus strains and interferon production in the mouse, an animal naturally insusceptible to this infection. *Acta Virol.* 10:226-229, 1966.
15. Nagai, Y.; Klenk, H.D. & Rott, R. - Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of the Newcastle disease virus. *Virology* 72:494-508, 1976.
16. Novo, M.A.S. & Golgher, R.R. - Produção de interferon por placenta humana. *Rev. Microbiol.* 19:190-195, 1988.
17. Oldham, R.K. - Biologicals and Biological response modifiers: new strategies for clinical trials. *In:* Interferon 4: In vivo and clinical studies, Rinter, N.B. e Oldham, R.K. Elsevier, Amsterdam, p. 235-249, 1985.
18. Scott, G.J. & Tyrrell, D.A.J. - Antiviral effects of interferon in man. *In:* Finter, N.B. & Oldham, R.K. ed. interferon 4: In vivo and clinical studies, Elsevier, Amsterdam, 181-215, 1985.
19. Solovyov, V.D.; Menitkevich, L.M.; Orlova, T.C. & Tatarinova, Y.U.N. - Multiplication of virulent and avirulent strains of Newcastle disease virus and interferon production in susceptible animals. *Acta Virol.*, 10:104-110, 1966.
20. Stewart, W.E. II - The interferon system. 2ed. Viena Springer Verlag, 1981.
21. Vilcek, J.; Havell, E.A.; Gradoville, M.L.; Mika-Johnson, M. & Douglas, W.H.J. - Selection of new human foreskin fibroblast cell strains for interferon production. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 110:101-110, 1978.
22. Zoon, K.C. & Buckler, C.E. - Large-scale production of human interferon in lymphoblastoid cells. *Texas Rep. Biol. Med.*, 35:145-149, 1977.

Recebido para publicação em 12/7/89

A PRODUÇÃO DE INTERFERON HUMANO DE MEMBRANAS AMNIÓTICAS (IFN-MA)

Erna Geessien Kroon¹

Maria Alice da Silva Novo¹

Paulo César Peregrino Ferreira¹

Romain Rolland Golgher¹

RESUMO

Foram investigadas variáveis na produção de interferon humano de membranas amnióticas (IFN-MA). A quantidade ótima de indutor foi determinada para as amostras: Victória (igual ou maior que $2,9 \times 10^8$ PFU/ml) e Texas-2 (igual ou maior que $0,3 \times 10^7$ PFU/ml) do vírus da doença de Newcastle. A cinética de produção de IFN-MA mostrou títulos semelhantes de 24 a 72 horas pós-indução e, após este período, uma queda acentuada nos níveis de IFN induzidos. Não foi observado aumento nos títulos de IFN após: pré-tratamento ("priming") com vírus ou IFN; por super-indução com actinomicina D e cicloheximida ou por irradiação ultravioleta do âmnio. A produção de IFN-MA quando comparada aos outros métodos de produção de interferon humano natural, mostrou ser de metodologia simples, de matéria prima de alta disponibilidade e as quantidades de IFN liberado por células similares aos interferons derivados de leucócitos e fibroblastos.

INTRODUÇÃO

Os interferons (IFN) constituem uma família de proteínas produzidas por células de vertebrados, com atividade biológicas diversificadas, das quais a mais bem estudada é a atividade antiviral.

Estas proteínas têm sido empregadas em ensaios terapêuticos em viroses e cânceres (18, 19). Para o seu emprego no homem, sua produção industrial foi desenvolvida, empregando-se leucócitos de sangue periférico (2), estirpes celulares derivadas de prepúcio humano, especialmente a FS-4 (20), a linhagem celular linfoblastóide Namalva (21) e mais recentemente, por técnicas de DNA recombinante em bactérias (7).

A placenta constitui outra fonte de células

para a obtenção de interferon humano. Das suas diferentes regiões, o córion e as vilosidades coriônicas são más produtoras de interferon (17) porém a membrana amniótica é capaz de fazê-lo (5, 17).

Levando-se em consideração que a matéria-prima-placenta é de fácil obtenção em nosso meio e o processo de produção de interferon em âmnio é de metodologia simples (5, 17), o sistema membrana amniótica-vírus da doença de Newcastle (NDV) foi investigado mais profundamente. Variáveis importantes do sistema foram pesquisada, tais como dose de vírus indutor, cinética de liberação e as possibilidades de aumentar os títulos do interferon humano de membranas amnióticas (IFN-MA) pela irradiação do tecido (14), pré-tratamento por interferon ou vírus indutor (12) e super-indução (9).

1. Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, MG, Brasil - C.P. 2486.

MATERIAL E MÉTODOS

Vírus – As amostras Victoria e Texas 2 de NDV foram multiplicadas em ovo embrionado de galinha de 9 a 11 dias. A infectividade foi determinada pela medida da dose infectante para 50% dos ovos (EID₅₀) e do número de unidades formadoras de placa (PFU) em células Vero (17).

Indução de IFN-MA – As placenta foram derivadas de parto cesáreo e colhidas em solução salina de Hanks (SSH) (8) com antibióticos. O âmnio foi separado, lavado em SSH e cortado em fragmentos de aproximadamente 1 cm². Cinco gramas de tecido foram colocados em um frasco Erlenmeyer e NDV foi adicionado, na proporção de 0,8ml por g de âmnio. Os frascos foram incubados por 2h a 37°C, sendo agitados de 30 em 30 minutos. O excesso de vírus foi drenado e adicionados 6ml de meio 199 por grama de tecido, suplementados com 2% de soro de carneiro inativado e antibióticos.

Após períodos de incubação variados, a 37°C, o sobrenadante foi colhido e dialisado contra tampão ácido clorídrico-cloreto pH 2,0; 0,06M, a 4°C, durante 72h, para eliminar o vírus residual e o meio substituído. O pH foi acertado para 7,2 por diálise contra PBS e os materiais foram guardados a 4°C (até 30 dias) ou a -20°C (tempos mais prolongados) até a titulação de interferon.

Titulação de IFN-MA – foi realizada em micrótécnica utilizando-se células Vero e vírus de encefalomielite de camundongo ou Sindbis como desafio (17). As unidades apresentadas neste trabalho são unidades do padrão interno do laboratório e equivalentes a aproximadamente 2,5 unidades do padrão internacional de interferon humano MRC 69/19.

RESULTADOS

Dose de vírus indutor – Dois estoques de NDV, amostra Victoria ($2,6 \times 10^9$ PFU/ml e $2,9 \times 10^9$ PFU/ml) foram acrescentados a fragmentos de âmnio "in natura" e diluídos 10 e 100 vezes para a indução de IFN-MA. O meio foi colhido após 24, 48 e 72 horas de incubação a 37°C e a atividade antivírica dos sobrenadantes foi titulada conforme detalhado em Material e Métodos.

Os resultados da Tabela 1 mostram que não houve diferenças significativas nos títulos de IFN-

Tabela 1 – Produção de interferon em âmnio humano com concentrações variáveis de vírus da doença de Newcastle (NVD), amostra Victoria.

NVD PFU ^a /ml	Interferon produzido-U/ml		
	24	48	72
$2,9 \times 10^9$	6.400	2.240	1.600
	1.600	1.600	400
$2,6 \times 10^9$	1.600	1.600	400
	1.600	1.600	800
$2,9 \times 10^8$	3.200	560	1.600
	1.600	1.120	1.600
$2,6 \times 10^7$	400	200	200
	400	400	200

a – Unidades formadoras de placa

MA produzidos nas doses iguais ou superiores a $2,9 \times 10^8$ PFU/ml. Com $2,6 \times 10^7$ PFU/ml, contudo, os níveis são significativamente inferiores.

Dados semelhantes foram obtidos com a amostra Texas - 2 (não mostrados). Âmnios infectados com quantidades iguais ou acima de $0,3 \times 10^7$ EOD₅₀/ml liberaram níveis similares de IFN-MA e, abaixo disto, a atividade antivírica produzida caía significativamente.

Cinética de produção de IFN-MA – Fragmentos de âmnio foram induzidos para sintetizar IFN-MA com a amostra Victoria de NDV. De 24 em 24 horas, até 5 dias, o meio foi colhido, tratado conforme Material e Métodos e substituído por novo volume.

As titulações dos diferentes materiais forneceram os dados da Figura 1. A produção de interferon manteve-se estável durante 72 horas, e depois de 4 e 5 dias houve uma queda significativa dos títulos.

Pré-tratamento – Como em vários sistemas de produção de IFN, a exposição das células a pequenas doses de vírus indutor ou a interferon antes da indução, leva a maiores títulos finais (12), este pré-tratamento ("priming") foi sistematicamente investigado utilizando-se vírus ou IFN-MA.

A amostra Texas de NDV foi diluída e adicionada a fragmentos de âmnio em quantidades

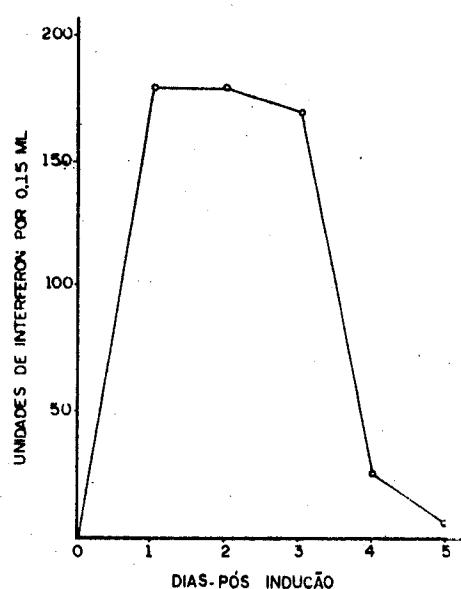


Figura 1. Cinética da produção de interferon de membranas amnióticas humanas infectadas com o vírus da doença de Newcastle, amostra Victória.

variáveis de 0,01 a 800×10^7 EID₅₀ (em 0,8ml) por grama de tecido. Após uma hora de absorção a 37°C, o excesso de vírus foi retirado e acrescentou-se 6 ml/g de tecido de meio mínimo (4) com 1% de soro de carneiro por uma hora. Depois deste pré-tratamento realizou-se a indução de IFN-MA, acrescentando-se ao tecido, após a drenagem de meio, o vírus sem diluição (2×10^9 EID₅₀/ml; 0,8ml/g de tecido) que permaneceu em contato com o âmnio por 2h a 37°C.

Transcorrido este tempo, a suspensão viral em excesso foi retirada e meio foi acrescentado conforme detalhado acima. Houve troca de meio após 24h de incubação e os títulos de determinados IFN produzidos após 24 e 48 horas de indução foram determinadas.

Os dados obtidos foram organizados na Tabela 2, mostrando não haver diferenças significativas nas quantidades de IFN-MA produzidos. Utilizando-se tempos variados para o pré-tratamento (2 a 4 horas) com a mesma amostra, em uma única dose (2×10^8 EID₅₀/ml), também não houve aumento de título de IFN-MA (dados não mostrados).

Para o pré-tratamento com interferon, o IFN-MA foi diluído em meio de concentrações

Tabela 2 – Produção de interferon de membrana amniótica humana: pré-tratamento com vírus da doença de Newcastle (Texas-2).

Concentração de vírus por grama de tecido ^(b)	Interferon produzido U/ml ^(a) Âmnio			
	A	B	C	D
0	6.700	700	2.800	2.800
0,01	NF ^c	NF	NF	3.400
1,6	5.600	NF	NF	3.600
8	NF	900	3.700	NF
80	NF	700	2.600	NF
160	NF	NF	NF	3.500
800	NF	1.800	2.600	NF

(a) Unidades de interferon produzidas nas coletas de 24 e 48 horas.

(b) Concentração do vírus em EID₅₀ $\times 10^7$.

(c) Não foi feito.

que variavam de 1 a 1000 unidades/ml e acrescentou-se meio, na proporção 6ml/g de tecido. Após 2h de incubação a 37°C, o meio foi removido e a indução foi realizada conforme descrito acima.

Os resultados da Tabela 3 indicam que não houve melhora quantitativa com o pré-tratamento. Dados obtidos com a exposição do âmnio a

Tabela 3 – Produção de interferon de membrana amniótica humana: pré-tratamento com diferentes concentrações de interferon homólogo.

Pré-tratamento Interferon U/ml	Interferon produzido U/ml	
	24h	48h
0	1.600	500
1	800	400
3	300	300
10	2.000	150
30	1.600	300
100	1.200	70
300	1.600	300
1.000	1.300	50

a – O tecido foi exposto durante 2 horas antes da indução com o vírus da doença de Newcastle, amostra Texas-2.

Tabela 4 – Efeito da actinomicina D e cicloheximida na produção de interferon humano de membrana amniótica.

Tempo de exposição à cicloheximida ^(a)	Tempo de exposição à actinomicina D ^(b)	Interferon produzido ^(c) U/ml
0	0	2.400
2 - 12	0	6.400
2 - 16	0	2.400
2 - 20	0	6.400
2 - 24	0	2.400
0	0 - 2	10
0	10 - 12	2.400
0	14 - 16	2.400
0	18 - 20	600
0	22 - 24	450
2 - 12	10 - 12	2.400
2 - 16	14 - 16	2.400
2 - 20	18 - 20	4.800
2 - 24	22 - 24	2.400

(a) Dose de cicloheximida-100 ug/ml

(b) Dose de actinomicina D-5 ug/ml

(c) Unidades interferon produzido 48 horas após o início da indução, feita com o vírus da doença de Newcastle, amostra Texas 2.

1000 U/ml de IFN-MA durante 0,2, 6 e 14h de pré-tratamento também não lograram aumentar os níveis de IFN-MA liberados (dados não mostrados).

Super-indução – Foi investigada a possibilidade de alcançar títulos superiores de IFN-MA com o emprego de inibidores metabólicos (actinomicina D e cicloheximida) conforme descrito por Vilcek et al (20) e por irradiação do tecido com luz ultravioleta (14).

Para o emprego dos inibidores metabólicos, experimentos preliminares foram realizados para acertar o tempo e a concentração adequadas de actinomicina D. Resultados mostraram que 5 μ g/ml desta droga inibiram os títulos de IFN-MA produzidos em 94%, quando aplicada por 2 horas até 8h após a indução.

Em seguida, os experimentos de super indução foram realizados conforme Vilcek et al (20). Membranas amnióticas foram infectadas com NDV (amostra Texas-2). Após a adsorção, os fragmentos de tecido foram lavados com SSH a 37°C,

foram acrescentados meio com soro e antibióticos a 37°C e os inibidores nos tempos conforme a Tabela 4, sendo a concentração de Actinomicina D de 5 microgramas por ml e a de cicloheximida de 100 microgramas por ml, capaz de inibir a incorporação de metionina S³⁵ de 98%, em células Vero. Após a exposição aos inibidores, as membranas foram lavadas cinco vezes com SSH a 37°C, colocadas em meio com soro e antibióticos e o sobrenadante colhido com 48 horas para titulação de interferon.

Como se pode depreender dos dados da Tabela 4, não houve aumento apreciável na produção de IFN-MA com o emprego dos anti-metabólicos.

O aumento da produção de IFN-MA por irradiação ultravioleta do tecido, conforme descrito por Lindner-Frimmel (14) também foi tentado. Fragmentos de âmnio foram expostos à luz ultravioleta por 0, 15, 90, 240 e 360 segundos e procedeu-se à indução de IFN-MA, conforme descrito em Material e Métodos. Não houve aumento na produção de IFN-MA (dados não mostrados).

DISCUSSÃO

A variação da dose de vírus NDV e a quantidade de IFN resultante produzido pelas amostras Victoria (Tabela 1) e Texas 2 mostraram títulos mais altos com o aumento da quantidade de vírus indutor. Contudo, a curva-dose resposta atinge um "plateau" no qual os níveis de interferon não se alteram mesmo com maiores concentrações de vírus. Os títulos mínimos de vírus para se obter bons níveis de interferon foram de 10^{8.3}EID₅₀/ml para a amostra Victoria e 10^{7.3}EID₅₀/ml para a amostra Texas 2. Para esta amostra a multiplicidade de infecção (vírus/célula) ótima variou de 300 a 30, pois cada grama de tecido amniótico contém cerca de 5 milhões de células (J.R. Santos, comunicação pessoal). A comparação destes dados com os obtidos em outros sistemas indica que, de modo geral, o aumento de vírus indutor traduz-se por uma elevação nos títulos de IFN (6,12), gerando curvas dose resposta da tipo $r \geq 1$ (15).

A cinética de produção de IFN-MA (Figura 1) é semelhante à descrita para o mesmo tecido (5) e para fibroblastos de prepúcio humano (1) e células L (13).

O pré-tratamento, como forma de aumentar as quantidades de IFN produzidas, funcionou sa-

tisfatoriamente em células L de camundongo (16); fibroblastos humanos (9); leucócitos (3). Isto, contudo, não é universal, conforme mostraram Johnston et al (10) e os nossos resultados (Tabelas 2 e 3).

A superindução por antimetabólitos observada em fibroblastos humanos (1, 20) assim como a causada por irradiação ultravioleta das células produtoras (14) não pôde ser observada no sistema NDV - membrana amniótica.

Comparados com outros sistemas de produção de IFN natural, usualmente empregados - leucócitos de sangue periférico e fibroblastos (células diplóides) pode-se afirmar que o sistema para a produção de IFN, baseado em cultivo de fragmentos amnióticos oferece vantagens, tais como: a grande disponibilidade de placenta; simplicidade do método; a economia de tempo e material consumido quando comparado com métodos que utilizam cultura de tecido; a obtenção de preparações de interferon sem a limitação de tamanho de recipientes para cultivo de monocamadas de células. Além disso, não é necessário o emprego de nitrogênio líquido, indispensável para o cultivo de células diplóides, nem de um local específico e equipe encarregada para a coleta da matéria-prima nem da organização complexa de banco de sangue, como ocorre na produção de interferon leucocitário.

Do ponto de vista quantitativo, como a membrana amniótica tem um peso de 34 g em média, pode-se obter 400 ml de interferon por âmnio em 48 horas, isto é, um litro de IFN, usando três membranas, com cerca de 500 UI/ml em condições usuais de indução. Aceitando-se as células que podem ser retiradas do âmnio por tripsinização como as produtoras de interferon, que são 150 milhões (J.R. Santos, comunicação pessoal), temos uma média de 1500 UI/ 10^6 células. Em leucócitos humanos, Kauppinen et al (11) conseguiram produzir 5000 UI/ 10^6 células; 3000 UI/ 10^6 células foram produzidas, a partir de fibroblasto de prepúcio (20); também em linhagem de células linfoblastoides o título de IFN foi de 3000 UI/ 10^6 células (10). Verificamos, assim, que o sistema MAH-NDV é viável, já que produz quantidades de IFN semelhantes àquelas produzidas por fibroblasto de prepúcio e células linfoblastoides.

Conclui-se que, tendo em vista estas características, que a produção de interferon humano em membranas amnióticas é um processo vantajoso e que deverão ser investigadas as possibilidades de se fazer um "scale-up" de volumes típicos de laboratório para a escala semi-piloto.

SUMMARY

Production of human amniotic interferon

Variables in the production of human amniotic interferon (IFN-MA) were investigated. Optimal concentrations of inducers were determined for two strains of Newcastle disease virus: Victoria (equal or greater than 2.9×10^8 PFU/ml) and Texas 2 (equal or greater than 0.3×10^7 PFU/ml). Kinetics of IFN-MA production showed similar titers from 24 to 72h post induction and after this period the amounts of IFN-MA produced decreased considerably. It was not possible to increase titers of IFN-MA by: priming with virus or IFN treatment, superinduction with actinomycin D and cycloheximide or ultraviolet irradiation of the amnion. When compared to the other methods of production of natural human interferons, the production of IFN-MA showed to be simpler, with an easily obtainable cell source and the levels of IFN produced per cell similar to those of leukocyte or fibroblast cultures.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi auxiliado pelo convênios FINEP-Departamento de Microbiologia 324/CT e B/39/79/253/00/00; CNPq (Proc. 222.0687/76) e pela CAPES.

Os autores agradecem a João Rodrigues dos Santos, Maria Lúcia Trindade e Bernadete de Jesus Martins o apoio técnico; ao corpo clínico e de enfermagem das Maternidades Otaviano Naves e Odete Valadares a coleta de placenta e a Angela Sana Lopes pela datilografia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bausek, G.H. & Merigan, T.C. - Simultaneous viral and non viral interferon production in human cell cultures. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 133:982-985, 1969.
2. Cantell, K. & Hirvonen, S. - Preparation of human leukocyte interferon for clinical use. Tex.Rep.Biol.Med. 35:138-141, 1977.
3. Cantell, K.; Strander, H.; Hadházy, G. & Nevanlinna, I.I.R. - How much interferon can be prepared in human leukocyte suspensions. In: Rita G. ed. The interferons: an international symposium. Academic Press, New York 223-232, 1968.
4. Eagle, H. - Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. Science 130:432, 1959.
5. Falcoff, E.; Falcoff, R.; Fournier, F. & Chany, C. - Production en masse, purification partielle et caractérisation d'un interferon destiné à des essais

- therapeutiques humains. Ann.Inst.Pasteur, Paris, 111:562-584, 1966.
6. Fleischmann, W.R.; Jr. & Simon, E.H. - Mechanism of interferon induction by Newcastle disease virus: a monolayer and single cell study. *J. Gen. Virol.*, 25:337-349, 1974.
 7. Goeddel, D.V.; Yelverton, E.; Ulrich, A.; Heyneker, H.L.; Mozzari, G.; Holmes, W.; Seeburg, P.H.; Dull, R.; May, L.; Stebbing, N.; Crea, R.; Macda, S.; Mc Candless, R.; Sloma, A.; Tabor, J.M.; Gross, M.; Familletti, P.C. & Petska, S. - Human leucocyte interferon produced by *E. coli* is biologically active. *Nature*, 287:411-416, 1980.
 8. Hanks, J.H. & Wallace, R.E. - Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 71:196-200, 1949.
 9. Havell, E.A. & Vilcek, J. - Production of high titred interferon in cultures of human diploid cells. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2:474-484, 1972.
 10. Johnston, M.D.; Fantes, K.H.; Finter, N.B. & Chir, B. - Factors influencing production of interferon by human lymphoblastoid cells. *Adv. Exp. Biol. Med.*, 110:61-74, 1978.
 11. Kauppinen, H.L.; Myllyla, G. & Cantell, K. - Large scale production and properties of human leukocyte interferon used in clinical trials. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 110:1-13, 1978.
 12. Kohase, M. & Vilcek, J. - Interferon induction with Newcastle disease virus in FS-4 cells: effect of priming with interferon and of virus inactivating treatments. *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, 32:281-293, 1979.
 13. Lancz, G.J. & Johnson, T.C. - Temporal relationship between virus and interferon biosynthesis in L cells infected with Newcastle disease virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 132:266-269, 1969.
 14. Lindner-Frimmel, S.J. - Enhanced production of human interferon by u.v. irradiated cells. *J. Gen. Virol.*, 25:147-150, 1974.
 15. Marcus, P.I. - Interferon induction by viruses: doublestranded ribonucleic acid as the common proximal inducer molecule. In: *Interferon 3: Mechanisms of production and action*. Friedman, R.M. ed. Elsevier Amsterdam p.113-175, 1984.
 16. Margolis, S.A.; Oie, J. & Levy, H.B. - The effect of interferon inducers or interferon induced virus resistance on subsequent interferon production. *J. Gen. Virol.*, 15:199-208, 1972.
 17. Novo, M.A.S. & Golgher, R.R. - Produção de interferon por placenta humana. *Rev. Microbiol.*, 19:190-195, 1988.
 18. Oldham, R.K. - Biologicals and biological response modifiers: new strategies for clinical trials. In: *Interferon 4: In vivo and clinical studies*, Finter, N.B. e Oldham, R.K. Elsevier Amsterdam. p.235-249, 1985.
 19. Scott, G.J. & Tyrrell, D.A.J. - Antiviral effects of interferon in man. In: Finter, N.B. & Oldham, R.K., ed. *Interferon 4, In vivo and clinical studies*. Elsevier, Amsterdam 181-215, 1985.
 20. Vilcek, J.; Havell, E.A.; Gradoville, M.L.; Mika-Johnson, M. & Douglas, W.H.J. - Selection of new human foreskin fibroblast cell strains for interferon production. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 110:101-110, 1978.
 21. Zoon, K.C. & Buckler, C.E. - Large-scale production of human interferon in lymphoblastoid cells. *Texas Rep. Biol. Med.*, 35:145-149, 1977.

Recebido para publicação em 14/7/89.

THE ISOLATION AND IDENTIFICATION OF THE CONTAGIOUS ECTHYMA VIRUS OF CAPRINES IN CELL CULTURES

Carlos Mazur¹
Raimundo Diogo Machado¹

SUMMARY

This work reports the isolation of the Contagious Ecthyma (CE) virus of caprines ovines in primary testis cells monolayers. Direct immunofluorescence assay, experimental inoculation in kids, and complement fixation test were used to confirm the identification of the virus.

INTRODUCTION

The Contagious Ecthyma (CE) is an epidermal disease of goats and sheep, transmissible to man. It is a poxvirus-caused disease that spreads fast, and it is very common in breedings over the world (13). CE is considered a low pathogenic disease, although it can be more severe and contagious than it is generally thought, causing great losses (12, 3). Nevertheless, there are only a few studies on the importance of CE virus in Brazil (2, 5, 9, 13).

Our finding shows the presence of this virus in Minas Gerais and Rio de Janeiro states and can be the basis for a large scale study on the epidemiology of the disease, focusing the necessity of immunoprophylaxy or the development of a vaccine strain.

MATERIAL AND METHODS

Sera

Immune anti-CE serum, kindly supplied by National Veterinary Services Laboratories

(Ames, USA), produced in ovine, was used as standard reference serum. The samples used in CF test were collected from inoculated kids, inactivated at 56°C, for 45 min. (8) and stored at -20°C.

Virus

Scabs were collected from lesions of affected goats and used as viral source. The specimen, named A, was collected in a severe outbreak, in Conselheiro Lafaiete, Minas Gerais state. Another specimen, named J, was sent by a veterinarian from Nova Friburgo, and specimen M was collected in a farm located in Guaratiba, both in Rio de Janeiro state. The specimens were stored at -20°C, without preservatives. The scabs were ground at 10% in phosphate-buffered saline (PBS) and the suspensions were clarified by centrifugation at 600 g for 15 min.. The supernatants were treated with antibiotics, overnight at 4°C.

Supernatants of some scabs suspensions were treated with freon (trichlorotrifluoroethane) for comparative analysis. The clarified supernatants were collected, decontaminated and used for the inoculations. Clarified supernatants were also ultracentrifuged at 35,000 g for 30 min. (11).

1. Depto. de Virologia, Instituto de Microbiologia - UFRJ, Centro de Ciências da Saúde, Bloco I, Ilha do Fundão, Cidade Universitária, 21944 Rio de Janeiro RJ, Brazil

Inoculations in cellular monolayers

The "in vitro" cultivation was carried out in cell monolayers grown in 13 x 100 mm glass tubes and in Leighton tubes. Primary goat testis cells were chosen for isolation and identification experiments (10).

Testicles were surgically collected from two months-old kids and kept at 4°C in sealed flask with MEM Eagle added of antibiotics, until the establishment of cell monolayers (4). Aliquots of the 10% scab suspensions A, J and M were diluted at 10⁻² and 10⁻³ in PBS for the inoculations.

Confluent cells monolayers seeded 48-72 hours before the experiments were washed twice with PBS added of antibiotics and inoculated with 0.1 ml of each dilution of scabs (suspensions A, J, M) per tube. After 60 min. - adsorption, the inocula were washed out with PBS and replaced with fresh maintenance medium. Monolayers were carefully examined during 28 days post inoculation (pi). Monolayers were frozen at -20°C, either when 50 - 70% of the cells detached from the glass or on the 28th day pi, in the presence of the cytopathic effect (CPE) (10). All clinical samples were passaged seven times.

Immunofluorescence assay (IA)

Inoculated monolayers prepared in Leighton tubes were tested with 12 hours intervals pi, during 21 days. Scab suspension dilutions (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³) were inoculated in duplicate. Coverslips were rinsed with PBS followed by fixation during 20 min., in acetone at -20°C. Fixed monolayers were incubated with anti-CE serum conjugated with fluorescein for 30 min. at 37°C in humid chamber, washed and observed on a UV Zeiss microscope.

Experimental inoculations in caprines

The caprines used in experimental inoculation were acquired from a property in Jacarepaguá, Rio de Janeiro state, without CE history.

Two five-day-old kids were inoculated, in scarified skin of inner tigh, with cellular lisates of the 7th passage (samples A and M) in cell cultures. The lisates were applied with swabs sticks.

Complement fixation test (CF)

The CF test was used for the serum of the inoculated kids, as described elsewhere (8), using

10% scab suspensions (samples A and M), as antigens. The first serum sample was collected before the inoculations and the others on the 2nd, 3, 4, 7, 10 and 14th week pi. This test was also used to titrate viral antigen in the 10% scab suspensions against the standard sera (14).

RESULTS

The inoculations of clarified scab suspensions (10⁻¹) promoted an abrupt detachment of approximately 80% of the monolayers in 4-5 days pi. The CPE began within 48-72 hours pi. Higher scab suspension dilutions promoted similar CPE, but later (10-12 days pi). Total cellular detachment was not observed until the 28th day pi. The alterations observed were foci of round, high-refractile cells.

Adversely, the CPE was observed only in the third week pi at the second passage and around the tenth day at the 7th passage. The lisates caused primary response in aleatory places of the monolayers, as foci of round and flat irregular cells that spread later in infection.

The treatment with freon in some supernatants apparently postponed in 24-48 hours the beginning of the effects, compared to non-treated supernatants. The supernatants which had their volumes reduced 50 times by ultracentrifugations reproduced CPE in varied, but longer periods than the 10⁻¹ scab suspension.

The IA showed a fluorescence in the cytoplasm and cytoplasmic membranes at 36 hours pi with the 10% scab suspension and later at higher dilutions. The batchs inoculated with freon-treated showed less inespecific fluorescence. In this case, the fluorescence was observed 4-5 days pi. Lisates of the first passage also promoted less inespecific fluorescence, and the effect was observed on the third week pi.

Inoculated kids developed epidermal lesion, clinically indistinguishable from the natural lesion. Slight reddenings could be observed in the affected area, 48 hours pi. The intensity of the reddenings increased turning into vesicles over the next six days. The vesicles became pustules 10-12 days pi, realeasing small amount of the fluid 14 days pi. Scabs were formed by dehydration of the exsudate around the third week and detached naturally on the following weeks (Figure 1).

The CF results of antibody titres are shown on table 1. CF antigen titres obtained were 1:40, 1:60 and 1:140 for the 10% scab suspensions A, J and M, respectively.

Table 1 – CF antibody titres

Weeks pi	Animals*	
	A	B
0	0	0
2	1:32	1:16
3	1:128	1:64
4	1:512	1:512
7	1:1024	1:512
10	1:256	1:256
14	1:256	1:128

* Inoculated with the lisates of 7th passage of A and M scab suspensions, respectively.

DISCUSSION

The characteristics of the virus growth in testis cells were similar to those described in literature, except the incubation period observed (15-21 days pi) at the second passage. Successive passages reduced the CPE appearance period signifi-

catively. Due to the high rate of the cellular detachment in primary inoculations, the characterization of the CPE was blurred at this stage.

IA of the infected cell did not antedate the diagnose, when compared to the production of CPE, but proved to be useful and efficient to detect viral growth. It is possible that earlier effect is attributable to the cytotoxicity of the scab suspensions caused by contaminants.

Kids were inoculated to verify the infectivity of cellular lisates and to study the lesions evolution. Scabs suspensions and cellular lisates inoculated proved to be highly infectious and elicited antibody response, but it can not be considered as a routine diagnostic technic.

Based on the literature, essentially for routine diagnose, due to the collection facility, transportation and conservation, added of the efficiency of electron microscopy (6) and CF, the scabs are satisfactory. Nevertheless, hemagglutination assay, isolation by fertile eggs, and rabbits inoculations resulted positive, when alternative clinical specimen (biopsies) or virus purified from scab suspensions were tested (1, 15, 16, 17). Oppositely the results in these methods were generally negative, when scabs suspensions were tested. So, it is possible the inadequation of the use of scabs suspensions directly, as virus source, for

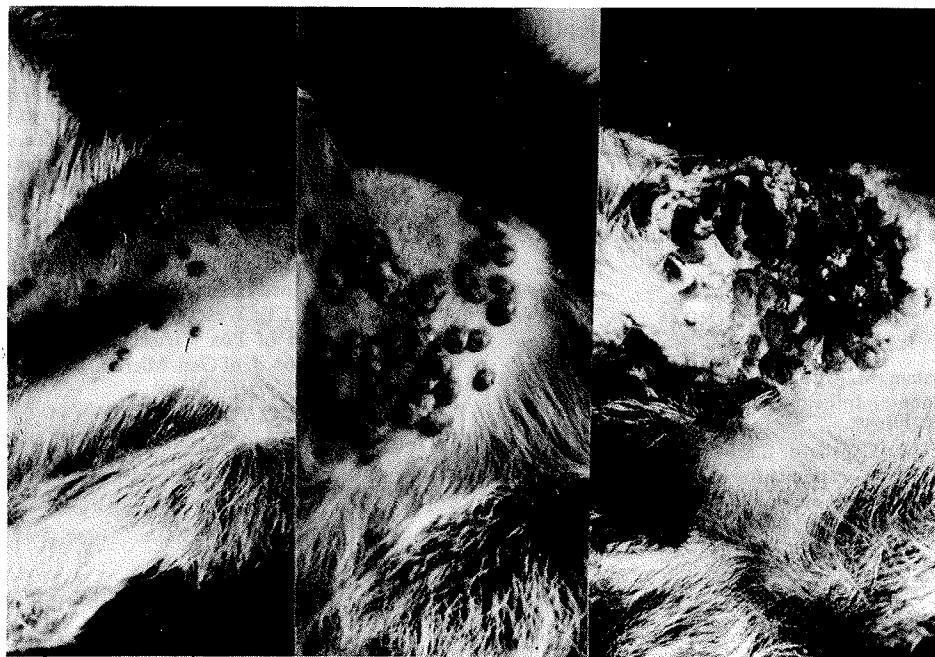


Figure 1 – Inoculated area of a kid on the 4, 10, 15th days pi.

biological studies without purifying. The observations of the growth in infected monolayers along with other technics, suggested cytotoxic effect and low infective titre. That would explain the difference between the primary inoculation and the subsequent passages. Freon treatment or ultracentrifugation of the supernatants supported this hypothesis.

Therefore it is important to suggest the choice of 3-6 days old lesion biopsies (stage of vesicles), as viral source, which can be concentrated or purified (7, 18) for further studies.

Few works on CE isolation were found in Brazil and this virus has not been considered an important problem in ovine and caprine breeding although, clinical specimen A were obtained from a severe outbreak. We thought that this outbreak together with the others, already described in S. Paulo, Rio Grande do Sul and Pernambuco states (13), demand a large scale epidemiological survey of CE virus in our country.

RESUMO

Este artigo reporta o isolamento do vírus do Ectima Contagioso dos caprinos ovinos em cultivos primários de células de testículo de caprino. Imunofluorescência direta, inoculação experimental em caprinos e prova de fixação de complemento foram usadas para confirmar a identificação.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. C.M. Nozawa for the excellent help in the preparation of this manuscript.

REFERENCES

1. Abdussalam, M. - Contagious pustular dermatitis. III. Experimental Infection. *J. Comp. Path. and Ther.*, 67:305-319, 1957.
2. Arita, G.M.; Capellaro, C.E.M.P.D.M.; Deak, J.G. & Souza, G.M. de - Isolamento e identificação de pox-vírus causando doença em ovinos no Estado do Ceará. *Biológico*, São Paulo, 52(1/3):23-26, 1986.
3. Darbyshire, J.H.A. - Fatal ulcerative mucosal condition of sheep associated with the virus of contagious pustular dermatitis. *Brit.Vet.J.*, 117:97-105, 1961.
4. Ferris, R.D. & Pocerights, W. - Simplified methods for the production of monolayers of testis cells from domestic animal, and for serial examination of the monolayer cultures. *J.Path.Bact.*, LXXV:313-318, 1958.
5. Guerreiro, M.G. - Ectima contagioso dos ovinos no Estado do Rio Grande do Sul. *Arq.Inst.Pesq.*, Desidério Finamor. Porto Alegre, Sulina:400-405, 1981.
6. Harkness, J.W.; Scott, A.C. & Herbert, C.N. - Electron microscopy in rapid diagnosis of Orf. *Br. Vet. Rec.* 133:81-87, 1977.
7. Joklik, K.K. - The purification of four strains of Poxvirus. *Virology* 18:9-18, 1962.
8. Machado, R.D. - Viroses respiratórias em recrutas no Rio de Janeiro. Tese de Mestrado. Instituto de Microbiologia da UFRJ, 1971.
9. Mayr, A.; Guerreiro, M.G. - Virologia Veterinária. 2a. ed. Rev. Ampl. Porto Alegre, Sulina:400-405, 1981.
10. Nagington, J. The growth of paravaccinia viruses in tissue culture. *The Vet. Rec.*, 82:477-482, 1968.
11. Nagington, J.; Newton, A.A. & Horne, R.W. - The structure of Orf Virus. *Virology*, 23:461-472, 1964.
12. Newson, I.E. & Cross, F. - Some complications of soremouth in lambs. *J.Am.Vet.Med.Ass.*, 78:539-544, 1931.
13. Piegas, N.S. & Nilsson, M.R. - Ectima Contagioso em ovinos no Estado de S. Paulo. *O Biológico de S. Paulo*, ano 34, 12:265-266, 1968.
14. Robinson, A.J.R. & Balassu, T.C. - *Contagius pustular dermatitis (orf)*. *The Vet. Bull.* 51, 10:771-782, 1981.
15. Romero-mercado, C.I. - Virus particles, antigens and antibodies in sheep infected with Orf, with special reference to diagnosis. Dissertation presented for the degree of master of science in the University of Edinburgh, 1969.
16. Sawhney, A.N. - Studies on the virus of Ecthyma Contagiosum. I. Attempts of the virus to grow on coroallantois of the growing chick embryo. *Izvestiva na Mikrob. Inst. Bulgaria*, 18:163-171, 1966a.
17. Sawhney, A.N. - Studies on the virus of ecthyma contagiosum. II. Demonstration of hemagglutinins. *Izvestiva na Mikrob. Inst. Bulgaria*, 18:173-177, 1966b.
18. Sawhney, A.N. - Studies on the virus of ecthyma contagiosum. III. Multiplicity of virus strains. *Izvestiva na Mikrob. Inst. Bulgaria*, 18:179-183, 1966c.
19. Zwartouw, H.T.; Westwood, J.C.N. & Appleyard, G. - Purification of Pox Viruses by Density Gradient Centrifugation. *J. of Gen. Microb.*, 29:523, 1962.

Recebido para publicação em 17/5/89.

RELAÇÃO ENTRE PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DO VÍRUS PARAINFLUENZA 1 E PRODUÇÃO DE INTERFERON HUMANO DE MEMBRANA AMNIÓTICA

Regina Maria Bringel Martins¹
Romain Rolland Golgher²

RESUMO

As atividades biológicas (hemaglutinação, hemólise, neuraminidase e infectividade) de amostras do vírus paraífluenza 1 "in natura" foram relacionadas com a produção de interferon (IFN) em amnio humano. Quando fluidos alantóicos foram empregados na indução de IFN, verificou-se que a amostra Mill Hill foi a melhor indutora, a amostra Z apresentou os menores títulos de IFN e a amostra Cantell títulos intermediários. Numa mesma dose infectante, entretanto, Cantell e Mill Hill mostraram a mesma capacidade de induzir IFN. Ao determinar as atividades hemolíticas, hemaglutinante e de neuraminidase, observou-se que as amostras Z e Cantell apresentaram valores mais elevados que a amostra Mill Hill. As propriedades hemaglutinante e hemolítica parecem estar relacionadas indiretamente com a produção de IFN. Amostras do vírus paraífluenza 1 mostraram-se diferentes na relação entre a atividade de neuraminidase e produção de IFN. O mesmo vírus requer um grande número de partículas infecciosas (amostra Mill Hill) ou não (amostra Cantell) para a produção de títulos altos de IFN. Amostras de um mesmo vírus apresentam características distintas na indução de IFN e investigações mais abrangentes são necessárias sobre este fenômeno.

INTRODUÇÃO

A maioria dos vírus induz interferon (IFN) em animais ou em culturas de células (19) mas ainda é desconhecida a natureza do(s) componente(s) vírico(s) responsável pela indução. Em alguns sistemas, o ácido ribonucléico de fita dupla parece ser a molécula responsável pela indução (12, 13, 18). Por outro lado, Ito & Hosaka (9) verificaram que um simples contato da glicoproteína hemaglutinina - neuraminidase do vírus paraífluenza 1 (Sendai) com células do baço de camundongo é suficiente para induzir IFN neste

sistema.

Amostras de um mesmo vírus podem diferir consideravelmente na sua eficiência de indução de IFN (7, 11). Várias amostras do vírus paraífluenza 1 ou do vírus da doença de Newcastle (VDN) foram testadas na produção de IFN em amnio com a finalidade de selecionar um bom indutor (4, 6, 11, 16).

No presente trabalho, com o objetivo de contribuir para o conhecimento do fenômeno de indução, compararamos amostras do vírus paraífluenza 1 relacionando as atividades hemaglutinante, de neuraminidase, hemolítica e a infectivi-

1. Laboratório de Virologia, Depto. de Microbiologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás
2. Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Caixa Postal 2486, 30161 Belo Horizonte MG, Brasil

dade da partícula vírica com produção de IFN humano de membrana amniótica.

MATERIAL E MÉTODOS

Células Vero – Linhagem derivada de rim de macaco verde (*Cercophitecus aetios*), fornecida pela ATCC (Rockville, Maryland, EUA), foi subcultivada em meio mínimo de Eagle, modificado em salina de Earle autoclavável, adicionado de 5% de soro fetal bovino, L glutamina e antibióticos.

Vírus – As amostras do vírus parainfluenza 1, Cantell (cedida pelo Dr. K. Cantell, Helsinque, Finlândia), Z (Dr. Y. Hosaka, Osaka, Japão) e Mill Hill (Dr. R.D. Machado, Rio de Janeiro), foram multiplicadas na cavidade alantóica de ovos embrionados de galinha. Os títulos dos estoques em dose infectante para 50% dos ovos embrionados (EID₅₀) e unidades hemaglutinantes (UHA) foram, respectivamente: Cantell, 10^{8,0} EID₅₀/ml e 2.560 UHA/ml; Z, 10^{8,3} EID₅₀/ml e 5.120 UHA/ml; Mill Hill 10^{9,3} EID₅₀/ml e 640 UHA/ml. Na relação de hemaglutinação, foram empregadas hemácias humanas do grupo "O" a 0,5%.

O vírus da encefalomielite de camundongo - EMC foi multiplicado em células L (Clone 929).

Produção de interferon – Foi realizada conforme o procedimento descrito por Kroon (11). Fragmentos de âmnio humano (5,0g por frasco) foram induzidos com as preparações do vírus parainfluenza 1 sem diluir (fluidos alantóicos "in natura") ou diluídos de acordo com o experimento, acrescentando-se 2,0ml da suspensão de vírus. Após uma hora de incubação, adicionou-se 40ml de fluido pseudoamniótico (17), acrescido de 0,1% de plasma humano inativado e antibióticos. As preparações foram incubadas a 37°C por 48 horas, com coleta e reposição de meio após 24 horas. Os meios tiveram o pH acertado para 2,0 e foram guardados a -20°C.

Titulação de interferon – Os fluidos acima foram titulados quanto a sua atividade antivírica, no sistema células Vero - vírus EMC, em microtécnica (5). Os títulos de interferon foram expressos em unidades laboratoriais (uma unidade corresponde a 0,1 U.I. de IFN alfa - Medical Council Research - MCR 69/19).

Dosagem de hemólise – A atividade hemolítica das amostras do vírus parainfluenza 1 foi quantificada segundo Abidi & Yeagle (1). Os fluidos alantóicos foram diluídos em salina tamponada fosfato - STF (pH 7,2), na razão de dois, de 1:2 até 1.024, num volume final de 0,5ml. As suspensões de hemácias humanas do grupo 0 a 1%,

Tabela 1 – Produção de interferon em âmnio humano por amostras do vírus parainfluenza 1 "in natura".

Amostras	Experimentos ^a	IFN produzido (U/ml) ^b		UIFN/UHA ^c	UIFN/EID _{50d} (x 10 ⁻⁴)
		24h	48h		
Z	A	600	100	2,7	0,7
	B	600	200	3,1	0,8
	C	300	100	1,5	0,4
Cantell	A	2.400	600	23,4	6,0
	B	1.600	400	15,6	4,0
	C	1.600	150	13,6	3,5
Mill Hill	A	12.800	3.200	500,0	1,6
	B	12.800	3.200	500,0	1,6
	C	12.800	400	412,5	1,3

a – Âmnios de placenta diferentes; b – Unidades laboratoriais; c – Relação entre o total de unidades de interferon produzidas por unidade hemaglutinante; d – Relação entre o total de unidades de interferon produzidas por dose infectante para 50% dos ovos embrionados.

utilizadas nos ensaios, foram padronizadas para uma densidade ótica de 0,2 em 540 nm, quando hemolisadas com água destilada na diluição 1:10.

Dosagem de neuraminidase – A atividade de neuraminidase foi medida conforme o método descrito por Aminoff (2), sendo empregada a fetuña de soro fetal bovino (Sigma, St. Louis, EUA) como substrato. Os fluidos alantóicos foram diluídos em STF, na razão de dois, de 1:4 até 1:512, e incubados com igual volume (0,05ml) de fetuña (10mg/ml) em tampão acetato de sódio (0,2 M; pH 5,0).

RESULTADOS

Produção de IFN por amostras do vírus parainfluenza 1 – Quando fluidos alantóicos “in natura” foram empregados na indução de IFN em âmnio (Tabela 1), observou-se que a amostra Mill Hill foi a melhor indutora. Já a amostra Z apresentou os menores títulos e a amostra Cantell títulos intermediários de IFN. Na relação entre o total de unidades de IFN produzidas e unidade hemaglutinante, verificou-se que a amostra Mill Hill mostrou valores mais altos. Resultados semelhantes foram observados nos experimentos realizados com as amostras numa mesma dose hemaglutinante (1.280 UHA, dados não mostrados).

Por outro lado, a amostra Cantell produziu mais unidades de IFN por EID₅₀ que as outras amostras (Tabela 1).

Relação entre dose infectante e produção de IFN – Numa mesma dose infectante ($10^{8.3}$ EID₅₀), as amostras Cantell e Mill Hill induziram quantidades semelhantes de IFN (Tabela 2). E, com a amostra Z, os títulos de IFN foram inferiores. Resultados similares foram obtidos quando feita a relação entre o total unidades de IFN produzidas e EID₅₀.

Atividade hemolítica das amostras do vírus parainfluenza “in natura” – Verificou-se que as amostras Z e Cantell apresentaram valores máximos de hemólise até as diluições 1:32 e 1:8, respectivamente (Figura 1). Entretanto, no intervalo entre as diluições 1:32 e 1:1.024, as percentagens de hemólise da amostra Z foram duas vezes superiores às apresentadas pela amostra Cantell. A amostra Mill Hill exibiu a menor atividade hemolítica. O fluido alantóico de ovos não inoculados com vírus (controle) não apresentou atividade hemolítica (dados não mostrados).

Atividade de neuraminidase do vírus parainfluenza 1 “in natura” – A amostra Cantell apresentou a maior atividade de neuraminidase nas diluições de 1:4 até 1:64 e, após este intervalo, mos-

Tabela 2 – Produção de interferon em âmnio humano por amostras do vírus parainfluenza 1 com a mesma dose infectante ($10^{8.3}$ EID₅₀)

Experimentos ^a	Amostras	Interferon produzido (U/ml) ^b 24h	Interferon produzido (U/ml) ^b 48h	UIFN/EID ₅₀ c ($\times 10^{-4}$)
A	Z	100	50	0,3
	Cantell	1.600	300	3,8
	Mill Hill	1.600	100	3,4
B	Z	100	50	0,3
	Cantell	800	200	2,0
	Mill Hill	800	200	2,0
C	Z	600	300	1,8
	Cantell	6.400	3.200	19,2
	Mill Hill	4.800	1.600	12,8

a – Âmnios de placenta diferentes; **b** – Unidades laboratoriais; **c** – Relação entre o total de unidades de interferon produzidas por dose infectante para 50% dos ovos embrionados.

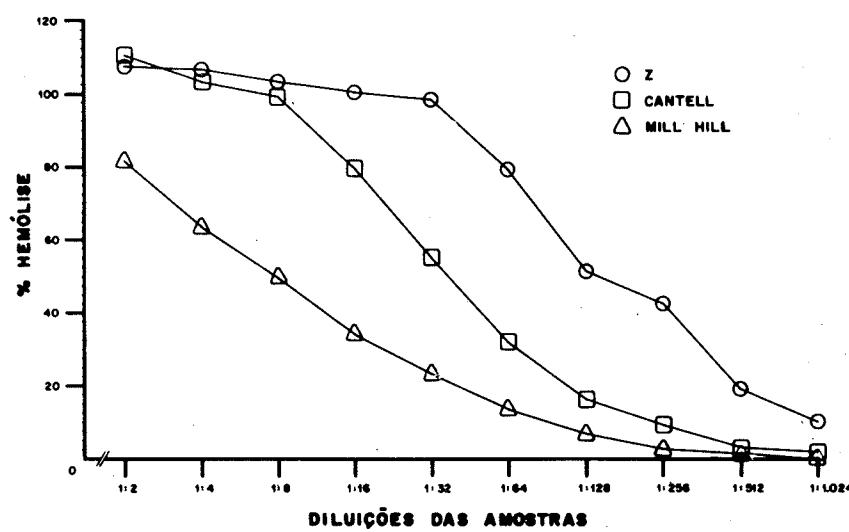


Figura 1. Atividade hemolítica de amostras do vírus parainfluenza 1 "in natura".

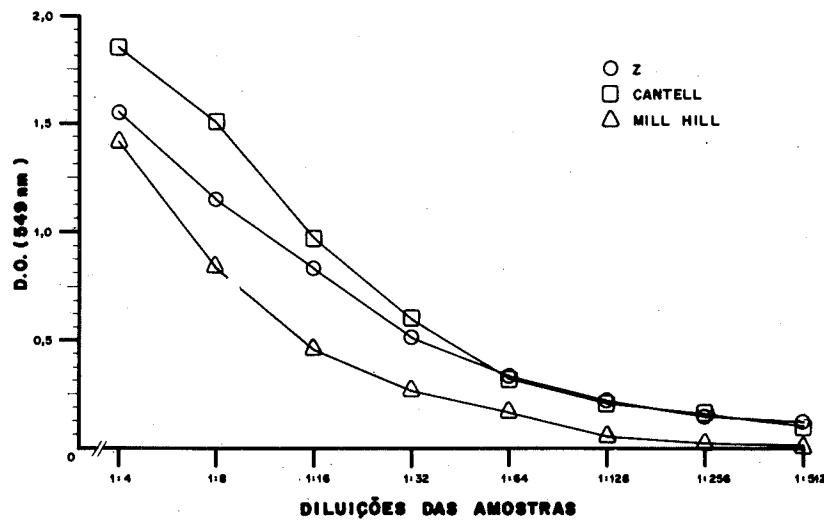


Figura 2. Atividade de neuramínidase de amostras do vírus parainfluenza 1 "in natura".

trou-se semelhante a amostra Z. Já a amostra Mill Hill revelou a menor atividade (Figura 2). Ácido N-Acetylneuramínico livre não foi detectado no fluido alantóico de ovos controle (dados não mostrados).

DISCUSSÃO

Quando fluidos alantóicos "in natura" foram utilizados na indução de IFN em âmnio, observou-se que a amostra Mill Hill induziu maiores quantidades de IFN (Tabela 1). Em leucócitos, a amostra Mill Hill mostrou-se também mais efetiva na indução de IFN que a amostra Cantell (Santos et al, J. IFN. Res., em publicação), sendo esta largamente empregada na indução de IFN em leucócitos e em células linfoblastoides (3, 10, 14, 15).

A quantidade de hemagglutininas parece estar relacionada indiretamente com a indução de IFN em âmnio, uma vez que a amostra Mill Hill com o menor título hemagglutinante (640 UHA/ml) se apresentou como a melhor indutora e as amostras Z e Cantell com títulos hemagglutinantes elevados (5.120 e 2.560 UHA/ml, respectivamente) induziram quantidades inferiores de interferon (Tabela 1). Resultados similares foram verificados por Kroon (11) com amostras de VDN. Entretanto, em células de baço de camundongo, a produção de IFN é maior com o aumento do número de unidades hemagglutinantes do vírus parainfluenza 1 (9).

As amostras Cantell e Mill Hill, quando utilizadas numa mesma dose infectante, apresentaram a mesma capacidade de induzir IFN. Para amostras Mill Hill, o número de unidades infectivas presentes nos fluidos alantóicos é importante na indução, uma vez que esta, com uma dose infectante elevada (Tabela 1), apresentou-se como boa indutora, notando-se, no entanto, com a redução da dose infectante, uma queda nos títulos de IFN (Tabela 2). Já a amostra Cantell, após passagens seriadas numa alta multiplicidade de infecção, dá origem a partículas desfeitas (DI) que são preponderantes na indução de IFN (10).

A amostra Z (má indutora) apresentou a maior atividade hemolítica. Já a amostra Mill Hill (boa indutora) mostrou percentagens inferiores de hemólise (Figura 1). Observou-se, então, uma relação indireta entre atividade hemolítica e indução de IFN em âmnio. Ito et al (8) constataram que o aumento da atividade hemolítica, através da clivagem de F. por tripsina, não altera a capacidade indutora de amostras do VDN em células do

baço de camundongo, verificando, entretanto, em células L, uma relação direta entre tais atividades.

A liberação de partículas víricas presentes na superfície celular parece não ser determinante na indução de interferon em âmnio com a amostra Mill Hill, pois esta com a menor atividade de neuraminidase apresentou-se como a melhor indutora "in natura". entretanto, uma relação direta parece ocorrer entre a atividade de neuraminidase e produção de interferon com a amostra Cantell "in natura".

Os dados do presente trabalho indicam que há uma relação indireta entre as atividades hemagglutinante e hemolítica do vírus parainfluenza 1 e produção de IFN em âmnio humano. Quanto à atividade de neuraminidase, as amostras do vírus parainfluenza 1 apresentaram comportamentos distintos. Partículas infectuosas são preponderantes na indução de IFN com a amostra Mill Hill, não ocorrendo o mesmo com as outras amostras. Estas diferenças deverão ser investigadas para o melhor conhecimento do fenômeno complexo que é a indução de IFN.

SUMMARY

Biological properties of parainfluenza 1 virus and human amniotic interferon production

The biological activities (hemagglutination, hemolysis, neuraminidase and infectivity) of three parainfluenza 1 virus strains "in natura" were compared with the human amniotic interferon (IFN) production. In the IFN induction with alantoic fluids "in natura", the Mill Hill strain presented the highest titres of IFN followed by the Cantell and Z strains. However, similar titres were observed when the same infective doses of Cantell and Mill Hill were used. The Z and Cantell strains had higher hemagglutination, hemolytic and neuraminidase activities than the Mill Hill strain. Hemagglutination and hemolytic properties seem to have an inverse relationship with IFN production. However, no clear pattern could be seen in relation to neuraminidase activity. We have also shown that the same virus requires higher number of infective particles (Mill Hill strain) or not (Cantell strain) to produce maximal yields of IFN. Strains of the same virus show different characteristics to induce IFN and this behaviour deserves further investigation.

AGRADECIMENTOS

Ao Alex Fiorini de Carvalho, a Bernadete de Jesus Martins, a Maria Cristina Anunciação e a Maria Lúcia Trindade, pelo auxílio técnico.

Aos médicos e enfermeiras da Maternidade Odete Valadares e do Hospital Mater Dei, pelo fornecimento de placenta.

Este trabalho teve o apoio financeiro da CAPES e convênios com a FINEP (4/3/0526/00, 4/3/84/0797/00 e 4/3/86/0210/00) e do Fundo de Incentivo à Pesquisa Científica do Banco do Brasil (FIPEC). RRG É bolsista do CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abidi, T.F. & Yeagle, P.L. – Surface properties of Sendai virus envelope. *Biochim. Biophys. Acta*, 775:419-425, 1984.
2. Aminoff, A. – Methods for quantitative estimation of N-Acetyl-neuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. *Biochem. J.*, 81:384-392, 1961.
3. Cantell, K.; Hirvonen, S.; Kauppinen, H. & Militya, G. – Production of interferon in human leukocytes from normal donors with the use of Sendai virus. In: Methods in Enzymology. Colowick, S.P. & Kaplan, N.O. eds. London, Academic Press p.29, 38, 1981.
4. Chany, C.; Fournier, F. & Falcoff, E. – A simple system for the mass production of human interferon: the human amniotic membrane. In: Interferon. Wolstenholme, G.E.W. & O'Connor, M. eds. Boston, Little, Brown and Company, p. 64, 67, 1967.
5. Ferreira, P.C.P.; Peixoto, M.L.P.; Silva, M.A.V. & Golgher, R.R. – Assay of human interferon in Vero cells by several methods. *J. Clin. Microbiol.*, 9:471-475, 1979.
6. Fournier, F.; Falcoff, E. & Chany, C. – Demonstration, mass production and characterization of a heavy molecular weight human interferon. *J. Immunol.*, 99:1036-1041, 1967.
7. Ho, M. – Factors influencing interferon production. *Front. Biol.*, 2:73-105, 1973.
8. Ito, Y.; Nagai, Y. & Maeno, K. – Interferon production in mouse spleen cells and mouse fibroblasts (L cells) stimulated by various strains of Newcastle disease virus. *J. Gen. Virol.*, 62:349-352, 1982.
9. Ito, Y. & Hosaka, Y. – Component(s) of Sendai virus that can induce interferon in mouse spleen cells. *Infec. Immun.*, 39:1010-1023, 1983.
10. Johnston, M.D. – The characteristics required for Sendai virus preparation to induce high levels of interferon in human lymphoblastoid cells. *J. Gen. Virol.*, 56:175-184, 1981.
11. Kroon, E.G. – Produção de interferon de membrana amniótica humana induzido pelo vírus da doença de Newcastle. Belo Horizonte. Tese de Mestrado, 65p., UFMG, 1980.
12. Marcus, P.I. & Sekellick, M.J. – Defective interfering particles with covalently linked (α) RNA induce interferon. *Nature*, 266:815-819, 1977.
13. Marcus, P.I. – Interferon induction by viruses: double-stranded ribonucleic acid as the common proximal inducer molecule. In: Interferon - Mechanisms of production and action. Friedman, R.M. ed. Amsterdam, Elsevier Science, p. 144-175, 1984.
14. Matsumoto, K.; Nakamura, Y.; Akashi, K. & Yamaguchi, H. – HVJ (Sendai virus) stimulates release of interferon from leukocytes used once for interferon production. *J. Gen. Virol.*, 67:809-812, 1986.
15. Mizrahi, A. – Production of human interferons - on overview. *Process Biochem.* Aug: 9-12, 1983.
16. Novo, M.A.S. – Produção de interferon em placenta humana. Belo Horizonte. Tese de Mestrado, 70p., UFMG, 1980.
17. Schwartz, A.L.; Forster, C.S.; Smith, P.A. & Liggins, G.C. – Human amnion metabolism. I - in vitro maintenance. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 127(5):470-474, 1977.
18. Stewart II, W.E. – The interferon system. New York, Springer-Verlag, 1979.
19. Stewart II, W.E. – The interferon system. 2nd. ed. Viena, Springer-Verlag, 1981.

Recebido para publicação em 20/9/89

INFORMAÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS

Microbial mats - Physiological Ecology of Benthic Microbial Communities. Ed. Yehuda Cohen & Eugene Rosenberg. American Society for Microbiology - Washington D.C. 1989, 494p.

Os editores, com a colaboração de mais de 90 autores provenientes de Universidades e Institutos de Pesquisa de diferentes países da Europa, América do Norte e Austrália, enfocam estas comunidades microbianas fascinantes - os "tapetes microbianos".

Os "tapetes microbianos" constituem, provavelmente, as mais antigas formas de vida do planeta, como atestam os "estromatólitos", os mais antigos microfósseis descritos, datando de 3,5 milhões de anos. Estes "tapetes" constituem comunidades microbianas estratificadas que se desenvolvem na interface da água e substratos sólidos formando biofilmes. Uma grande variedade de microrganismos, principalmente cianobactérias, Beggiatoa, bactérias metanogênicas, são constituintes destas comunidades. O livro apresenta discussões sobre a diversidade e flexibilidade destas comunidades e suas interações metabólicas. Uma série de ambientes extremos, como fontes termais e fumarolas submarinas, ambientes hipersalinos e ambientes naturais são descritos. Capítulos sobre filogenia e evolução, bem como metodologia de estudos são introduzidos.

É um livro importante para consulta dos especialistas de ecologia de microrganismos e microbiologia ambiental.

Dra. Maria Therezinha Martins
Laboratório de Microbiologia Ambiental
Dept. de Microbiologia
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
Instituto de Ciências Biomédicas •
Universidade de São Paulo.

Biotechnologies and Development. A. Sasson, UNESCO - Technical Centre for Agricultural and Rural Cooperation (CTA), Paris, 1988. 360p.

O autor, doutor em Ciências Naturais, pela Universidade de Paris, apresenta um panorama de

biotecnologia quanto ao melhoramento de culturas vegetais, fermentação, produção de vários substratos a partir da fermentação, aplicações da biotecnologia em Medicina e Saúde Pública, produção de energia, controle de poluição, etc.

Trata-se de uma publicação para consulta, apenas visando obtenção de informações genéricas sobre o que foi desenvolvido na área.

Não apresenta um estudo profundo sobre cada tópico, inclusive não está bem atualizado.

Dra. Maria Therezinha Martins
Laboratório de Microbiologia Ambiental
Dept. de Microbiologia
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
Instituto de Ciências Biomédicas
Universidade de São Paulo

Microbial Products: New Approches. Symposium 44. The Society for General Microbiology. Ed. S. Baumberg, I.S. Hunter & P.M. Rhodes. Cambridge University Press, Cambridge, 1989. 383p.

Trata-se de uma coletânea de contribuições de renomados autores sobre: produção de aminoácidos por microrganismos eucariotos e procariontes e, em especial, por corinebactérias; controle do crescimento microbiano e produtividade; processo da fisiologia de produção de metabólitos secundários; genética molecular da produção de antibióticos; biossíntese de B-lactâmicos; proteínas recombinantes como produtos farmacêuticos; formação da enzima oligomérica rubisco em *E. coli*; secreção de hemolisinas e outras proteínas de bactérias Gram-negativas; engenharia para secreção de proteínas por bactérias; secreção de proteínas estrangeiras, por leveduras; perspectivas para a engenharia de proteínas; importância da farmacologia e biologia molecular na obtenção de produtos microbianos; pesquisa de actinomicetos de importância industrial.

As técnicas de engenharia genética dos processos são discutidas e a bibliografia citada é ampla e atual.

É uma obra de grande interesse a quem atua no campo.

Dra. Maria Therezinha Martins
Laboratório de Microbiologia Ambiental
Dept. de Microbiologia
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
Instituto de Ciências Biomédicas
Universidade de São Paulo

Transplante de embriões de bovinos.

Por superovulação, a fêmea doadora produz no mínimo cinco embriões, que são congelados ou injetados em diferentes receptoras, possibilitando uma seleção a partir da qualidade.

O transplante de embriões de bovinos oferece muitas possibilidades de aplicação:

- aperfeiçoamento dos programas de seleção genética executados pelas Uniões de Cooperativas de Inseminação Artificial;
- multiplicação das melhores fêmeas de um rebanho;
- preservação das raças em extinção;
- aumento da produção de carne, pela obtenção de vitelos gêmeos.

Há vários anos o INRA (Instituto Francês de Pesquisas Agronômicas) vem trabalhando na criação de métodos simples, sem intervenção cirúrgica, que possibilitem a utilização do transplante em benefício da pecuária.

A fêmea doadora é submetida a um tratamento hormonal: em vez de um único ovócito ela produz em média dez, que são fecundados por inseminação artificial. Sete dias após a inseminação, um técnico especialmente treinado utiliza uma sonda para recuperar cinco a dez embriões por doadora, de acordo com a raça e com as condições de exploração. Em seguida os embriões de boa qualidade são reimplantados um a um diretamente no útero de várias fêmeas receptoras, por via natural, com a pistola tradicionalmente utilizada para inseminação.

Também podem ser congelados para transplante posterior.

Anualmente realizam-se na França mais de 10.000 transplantes, com um rendimento (índice de gestação) de aproximadamente 60%. Persistem porém algumas dificuldades que ainda limitam o desenvolvimento e a eficácia dessa técnica:

– Ainda não se consegue uma produção regular de embriões por superovulação. Prosseguem ativamente as pesquisas sobre o mecanismo de ação dos hormônios da ovulação.

– É possível determinar o sexo do embrião antes do transplante. Estão em andamento trabalhos de adaptação do método às condições de uso

corrente, para se obterem vitelos machos ou fêmeas, de acordo com as necessidades.

Dentro em breve, com o aproveitamento máximo das reservas de ovócitos contidas nos ovários de cada fêmea doadora, a fecundação *in vitro* possibilitará a produção de embriões em grande quantidade. Além disso, as pesquisas sobre manipulações genéticas de embriões abrem caminho para a produção de animais com novas características.

Centro Franco-Brasileiro de Documentação Técnica e Científica.
Avenida Waldemar Ferreira, 204
05501 São Paulo SP, Brasil

A inoculação da soja

No plano francês para o desenvolvimento da cultura de proteaginosa, a inoculação da soja é tema de uma pesquisa aplicada e integrada cujo sucesso deveu-se à estreita colaboração entre um organismo de pesquisa (INRA), um instituto de desenvolvimento (CETIOM), produtores de sementes (AMSOL) e indústrias (LIPHA e BIOPROX).

A soja é uma leguminosa que fixa o nitrogênio do ar graças a uma bactéria do solo, a *Bradyrhizobium japonicum*, que se associa a ela para formar nódulos fixadores de nitrogênio. Nessa simbiose, os *Bradyrhizobium* fornecem o nitrogênio, enquanto a planta é responsável pela proteção mecânica e pelos açúcares que suas folhas sintetizam.

Os *Bradyrhizobium japonicum* não existem naturalmente nos solos franceses. Para cultivar a soja é preciso introduzi-los, através da prática da inoculação.

Para isso foi necessário selecionar cepas de *Bradyrhizobium* que se adaptassem bem às condições francesas: solos, climas, variedades cultivadas. Os critérios de seleção são os seguintes:

- capacidade para fixar o nitrogênio do ar;
- ausência de interação com a variedade de soja;
- aptidão para sobreviver no solo, o que, a longo prazo, dispensará a inoculação das sementes;
- aptidão para a produção industrial.

O INRA atua em todas essas etapas do processo:

1. seleciona e conserva as cepas de *Rhizobium*;
2. após controle, fornece as cepas (G 49) aos fabricantes, que as multiplicam em fermentadores;

3. Controla então o produto dessas fermentações, verificando especialmente a abundância de germes e a ausência de contaminantes;
4. finalmente, pesquisa técnicas de inoculação mais eficientes.

Existem atualmente duas técnicas:

- inoculação das sementes por intermédio de turfa úmida contendo o inóculo;
- inoculação sob forma de microgranulados, que no momento do emprego são envolvidos com o inóculo total e depositados no solo com as sementes.
- Estão em estudo outras técnicas, de utilização mais simples.

A inoculação da soja com a cepa de *Bradyrhizobium japonicum* G 49 apresenta resultados espetaculares em termos de rendimento (10 - 39 qx/ha), e pode beneficiar as culturas posteriores.

Centro Franco-Brasileiro de Documentação Técnica e Científica.
Avenida Waldemar Ferreira, 204
05501 São Paulo SP, Brasil.

IUMS Congress: Bacteriology & Mycology-Osaka, Japan, 1990.

Será realizado, de 16 a 22 de setembro de 1990, o IUMS Congress: Bacteriology & Mycology, em Osaka, Japão. Maiores informações entrar em contato com Dr. Yoshifumi Takeda, *Secretary General, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Kyoto University, Yoshida, Konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606* (tel: 81-75-753-4448, Fax: 81-75-753-4446).

THE DESIGN OF A NEW ILLUMINATOR FOR LISTERIA RESEARCH

Sônia Maria Moura
Maria Teresa Destro
Bernadette D.G.M. Franco

Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental
Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP
Caixa Postal 30.786
01051 São Paulo, SP

& Rogério Marcos Brancaccio

Setor de Óptica - FUNBEC
Caixa Postal 2089
Cidade Universitária
Sao Paulo SP

INTRODUCTION

One of the most important parameters on the *Listeria* identification is the colonies typical blue-grayish color when examined under 45° transillumination. Usually this is achieved by a strong converging light beam (AO653-Reichert 653) inciding on a concave or plane mirror at 45°, reflecting in a plate and being observed through a stereoscope (Fig. 1a). A low power inverted microscope (25x) can also be used to obtain the same color (Fig. 1b) (1).

Since in Brazil there are difficulties to obtain reliable equipments in this paper we report the development of a low cost and effective alternative apparatus.

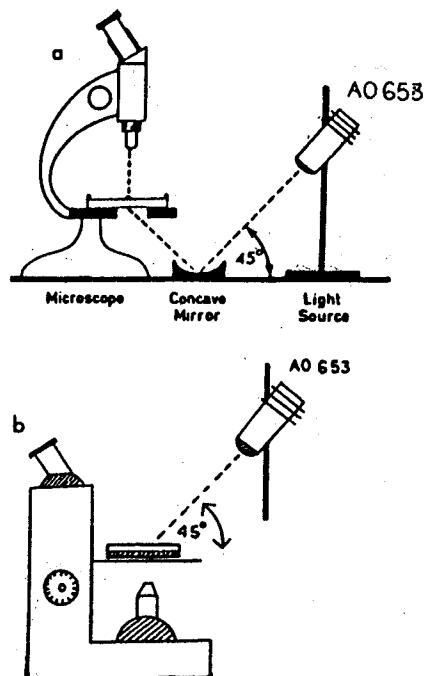


Figure 1 - (a) CDC concave mirror arrangement and (b) inverted microscope arrangement to observe *Listeria* colonies with 45° transillumination.

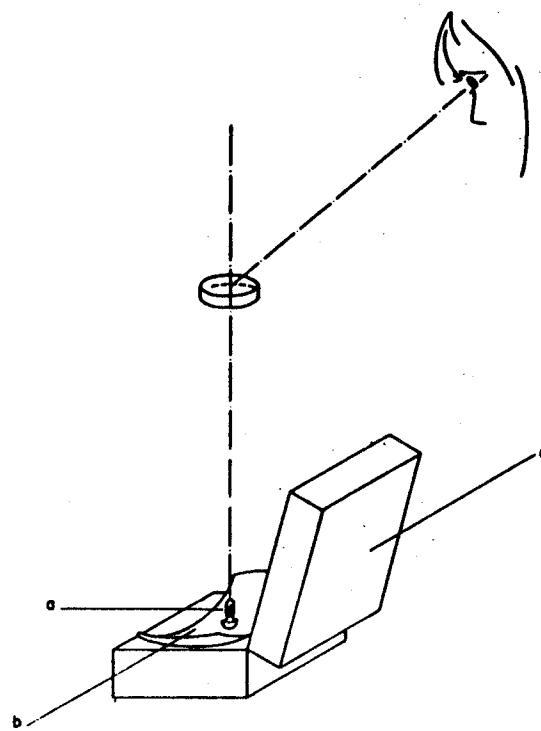


Figure 2 - Desing of the illuminator. The symbols are described in the text.

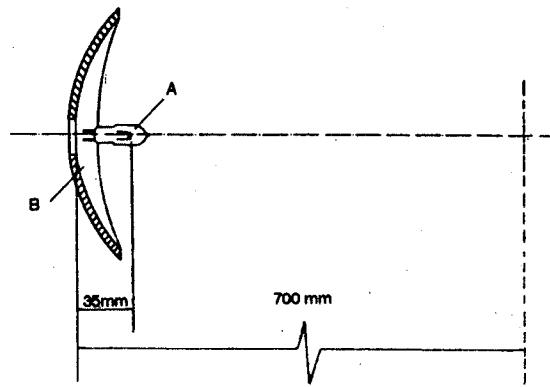


Figure 3 - Lamp and reflector focal distances: A - lamp; B - reflector.

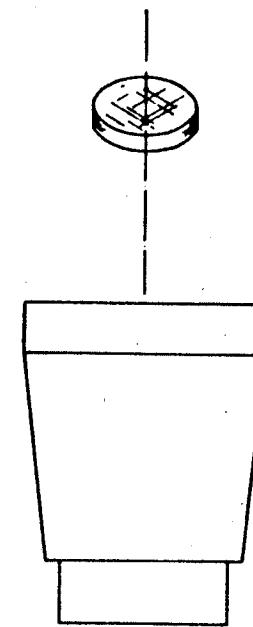


Figure 4 - Equipment frontal view and plate position.

Atlas^(R) reflector was used (b). The set was put together in a covered wood box. The wood cover is important to protect the observer eyes (c). A AC 110-220v, 60HZ, DC 13,8v, 10A Nodaji^(R) stabilizer was connected to the device.

In the Figure 3 one can see the lamp and reflector focal distances.

The Figure 4 shows the equipment frontal view clarifying the plate position.

Various *Listeria* spp strains isolated from food as well as a FDA strain (*L. monocytogenes* Scott A.) were used on testing the apparatus, giving the microorganism characteristic color.

ACKNOWLEDGEMENT

Research supported by grants from CNPq.

Illuminator description

The illuminator design can be seen in the Fig. 2. The used light source was a halogen lamp H-3, 12v, 55w Polamp^(R) (a) with similar day light color temperature. To be closer to day light a chromatic coordinates $x=0,3$ and $y=0,3$ dielectric dicroic

REFERENCES

- McClain, D. & Lee, W.H. – Development of USDA-FSIS method for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat and poultry. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 71(3):660-664, 1988.