

Revista de Microbiologia



SBM

REGINA T.
**Sociedade
Brasileira de
Microbiologia**

São Paulo — Brasil

Volume 21 Número 4 Out. - Dez. 1990

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Revista de Microbiologia (editada pela Sociedade Brasileira de Microbiologia) publica artigos **originais**, **notas breves** e ocasionalmente, **revisões**, abrangendo todos os aspectos da Microbiologia. Um artigo original é uma contribuição substancial a um assunto; a nota breve é um achado restrito de uma descoberta nova e significativa e uma revisão é um apanhado crítico feito por um especialista que já tenha se destacado no assunto da revisão.

Todos os trabalhos submetidos devem ser escritos em português ou preferencialmente, em inglês. A decisão de aceitar o manuscrito é feita por um corpo de Revisores.

A submissão de um trabalho a esta Revista implica que o mesmo não foi previamente publicado e nem foi enviado concomitante para publicação em outra revista.

ORGANIZAÇÃO E FORMATO DOS MANUSCRITOS: Datilografe com espaço duplo, deixando margens de 2,0 cm e as páginas devem ser numeradas sequencialmente. Os **artigos originais** estão restritos a um máximo de 15 páginas impressas incluindo figuras e tabelas (isto corresponde a aproximadamente 25 páginas datilografadas). A primeira página deve incluir o título, nome(s) do(s) autor(es), instituição e endereço completo do(s) autor(es). Três a cinco palavras chaves devem ser incluídas. O artigo deve ser dividido em: Resumo e Summary, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos e Referências Bibliográficas. Resultados e Discussão podem ser combinados num título só. O Resumo deve conter no máximo 250 palavras, mas se o artigo for redigido em português, o Summary (Resumo) deve ser mais extenso, 300 palavras no mínimo.

Abreviaturas e símbolos devem seguir as recomendações da IUPAC-IUB e as medidas, o sistema métrico.

Cite cada referência por número, no texto. As referências deverão ser numeradas e ordenadas alfabeticamente, de acordo com os exemplos abaixo:

Ingram, L.O. & Conway, T. – Expression of different levels of the ethanologenic 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.

Somente aquelas fotografias que são estritamente necessárias para o entendimento do trabalho é que devem ser incluídas. O material utilizado para este fim deve ser de qualidade suficientemente boa para assegurar boa reprodução. Devem ser numeradas no verso, a lápis e identificadas com o nome dos autores. As legendas de gráficos e tabelas devem ser datilografadas em folhas separadas. Gráficos, figuras e tabelas devem ser apresentados de tal forma que possam ser reduzidos, se necessário. Não são aceitas ilustrações coloridas. Indicar no texto o local aproximado onde devem ser inseridos tabelas, figuras e gráficos.

As **Notas** devem conter no máximo seis páginas datilografadas. Devem ser escritas de acordo com as instruções dadas acima, porém sem as divisões em capítulos e o resumo não deve exceder 50 palavras. Figuras ou tabelas estão restritas a duas, no máximo, podendo no entanto ser uma tabela e uma figura.

As **Revisões** devem ser de assuntos amplos e de interesse geral. Somente especialistas devem apresentar este tipo de publicação. Além do Resumo, pode conter um índice do conteúdo da revisão.

Uma vez aceito o trabalho, uma prova tipográfica será remetida ao autor principal a fim de corrigir os erros. As provas devem ser devolvidas no prazo máximo de dez dias. Em caso de atraso, as provas serão corrigidas pelos editores e publicadas. Modificações que impliquem em recomposição do texto não serão permitidas.

Quinze separatas de cada artigo serão fornecidas gratuitamente. Cópias adicionais poderão ser requisitadas mas os Autores deverão pagá-las.

Os artigos deverão ser remetidos em triplicata e enviados para o Diretor Executivo.

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

Regina Toledo



Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo — Brasil

Filiado à IUMS — INTERNATIONAL UNION OF MICROBIOLOGICAL SOCIETIES

Diretor Executivo: FLÁVIO ALTERTHUM

Conselho Editorial

Adauto Ivo Milanez	José Alberto Neves Candeias
Alcides Serzedello	Leda Cristina Santana Mendonça Hagler
Allen Norton Hagler	Leon Rabinovitch
Ana Clara G. Schenberg	Luiz Rachid Trabulsi
Andrejus Korolkovas	Marcelo Magalhães
Antonio Fernando Pestana de Castra	Maria Aparecida Shikanai Yasuda
Aramis Augusto Pinto	Maria Lucia B.O. RácZ
Arlete Emily Cury	Maria Regina Fernandes Toledo
Astrea Mennuci Giesbrecht	Maria Therezinha Martins
Augusto Cezar Montelli	Mauro Faber de Freitas Leilão
Caio Marcio Figueiredo Mendes	Milton de Uzeda
Carlos da Silva Lacaz	Myrna Sabino
Carmo Elias A. Melles	Moacyr Alcojarado Rebello
Celeste Fava Netto	Paulo Hideki Yasuda
Claudete Rodrigues Paula	Paulo Suyoshi Minami
Daison Olzany Silva	Romain Rolland Golgher
Edmar Chartone de Souza	Sebastião Timo Iaria
Ernesto Hofer	Sérgio Olavo Pinto da Costa
Flavio Alterthum	Sérgio Eduardo Longo Fracallanza
Galba Maria Campos Takaki	Silvio Arruda Vasconcelos
Hermann Gonçalves Schatzmayr	Sumie Hoshino Shimizu
Homero Fonseca	Vera Lucia Garcia Calich
Ises de Almeida Abrahanson	Waldemar Francisco
João Lúcio de Azevedo	Walderez Gambale
Johanna Dobreiner	Willibaldo Schmidell Netto
	Zoilo Pires Camargo

Secretária Executiva: Maria Helena Colón Silva

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 Nautchnoi 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.

Produzido pela TEC art Editora: fone (011)255-7531.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

AV. Prof. Lineu Prestes, 1374

05508 - São Paulo - S.P.

Brasil

Fone (011) 813-9647

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

Filiada a IUMS - INTERNATIONAL UNION OF MICROBIOLOGICAL SOCIETIES

Diretoria Presidente
Maria Therezinha Martins
Inst. de Ciências Biomédicas - USP
Dept.º de Microbiologia
Av. Prof. Lineu Prestes, 1.374
05508 - São Paulo - SP

Vice-Presidente
Walderez Gambale
Inst. de Ciências Biomédicas - USP
Deptº de Microbiologia
Av. Prof. Lineu Prestes, 1.374
05508 - São Paulo - SP

Secretária Geral
Lúcia Martins Teixeira
Inst. de Microbiologia - UFRJ
Centro de Ciências da Saúde - Bl.1
Ilha do Fundão
21944 - Rio de Janeiro - RJ

1º Tesoureiro
Leonardo Perego Jr.
Fac. de Ciências Farmaceuticas - USP
Conjunto das Químicas
Cidade Universitária
05508 - São Paulo - SP

Conselho Fiscal Paulo S. Minami (FCF/USP)
Claudete R. Paula (ICB/USP)
Sebastião Timo Laria (ICB/USP)

2º Tesoureiro
Roberto M. Yanaguita
Inst. de Ciências Biomédicas - USP
Deptº de Microbiologia
Av. Prof. Lineu Prestes, 1.374
05508 - São Paulo - SP

Coordenadores de Programas da SBM Microbiologia de Alimentos (Sebastião Timo Laria - ICB/USP-SP);
Microbiologia Clínica (Sergio E. Longo Fracalanza - UFRJ-RJ);
Microbiologia Industrial (Rosana L. Vazoller - UFS Carlos);
Microbiologia Ambiental (Maria Therezinha Martins - ICB/USP-SP);
Microbiologia de Solo (Ely Nahas - UNESP - Jaboticabal - SP)
Micologia (Benedito Corrêa - ICB/USP-SP);
Micotoxinas (Mirna Sabino - IAL-SP);
Infecções Hospitalares (Carlos Emílio Levy - FMRP/USP).
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; e manter intercâmbio, a cada dois anos, na última semana do mês de julho, o Congresso Brasileiro de Microbiologia e edita a Revista de Microbiologia, com distribuição trimestral. Para informações sobre a SBM, escrever para qualquer membro da Diretoria.

Endereço Av. Prof. Lineu Prestes, 1.374
05508 - São Paulo - SP
Brasil
Fone: (011) 813-9647
TELEX 11 35085
FAX 8879875

IN MEMORIAM

O recente falecimento do Professor **Gobert Araujo Costa**, ocorrido na cidade do Rio de Janeiro em 14 de novembro próximo passado é um acontecimento que não pode escapar ao pesar daqueles que militam no campo da Microbiologia, particularmente, na Bacteriologia médica. Nesta área dedicou a maior parte de sua atenção e realização nos seus 74 anos de existência.

O Prof. Gobert Araujo Costa nasceu aos 22 de abril de 1916 em Penedo, estado de Alagoas, diplomando-se em medicina pela Escola de Medicina e Cirurgia do Rio de Janeiro em 1938, onde desde 1937 exercia a monitoria da cadeira de Microbiologia e, rapidamente, obtendo a posição de assistente em 1939. Iniciou-se no campo da pesquisa através da realização do Curso de Aplicação do Instituto Oswaldo Cruz, no biênio 1938-1939, vinculando-se a seguir às atividades da Seção de Bacteriologia desta instituição como biologista em 21/03/1941. A partir desse momento até 1949, se dedicou com afinco nas pesquisas sobre as várias facetas ligadas aos representantes do gênero *Clostridium*, mas já revelando algumas outras incursões no campo das enterobactérias, principalmente salientando-se a tese apresentada no concurso de biologista do Instituto Oswaldo Cruz em 1945, versando sobre "Contribuição ao diagnóstico da peste nos ratos".

Durante este período, exerceu atividades de magistério nos Cursos de Técnicas de Laboratório do Departamento Nacional de Saúde e de Aplicação do Instituto Oswaldo Cruz. A partir de 1950, concentrou sua atenção basicamente nas enterobactérias, publicando uma série de trabalhos fundamentais, quer de ponto de vista etiológico, quer sobre aspectos etiopatogênicos e epidemiológicos das enterobacterioses na população do Rio de Janeiro. É importante destacar seu espírito pioneiro e a forma dedicada na propagação de conhecimentos sobre o tema para outros setores fora de Manguinhos, como durante a fase em que foi responsável pelo Laboratório de Enterobactérias da cadeira de Microbiologia da Faculdade Nacional de Medicina e Faculdade Nacional de Farmácia da antiga Universidade do Brasil e, que, posteriormente, com a reunião de outros laboratórios, originou o Instituto de Microbiologia. Da mesma forma, repercutiu de modo incisivo sua passagem pelo Instituto de Puericultura da Universidade do Brasil, atual Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Em março de 1959, passou a ocupar a chefia da Seção de Bacteriologia da Divisão de Microbiologia e Imunologia do Instituto Oswaldo Cruz, acumulando em caráter interino também a responsabilidade da Divisão, até a sua aposentadoria em 1973. Esta fase profissional foi marcada pela participação ativa em congressos nacionais e internacionais, na implementação do tópico Microbiologia e Imunologia nos diversos cursos de especialização oferecidos pela Escola Nacional de Saúde Pública, assim como, em outros cursos de aperfeiçoamento desenvolvidos no Brasil e outros países.

O outro grande marco de suas lides profissionais se situou em 1964, com o início das atividades como Professor Titular de Microbiologia e Imunologia da Escola Médica do Rio de Janeiro, Universidade Gama Filho, onde gradativamente, alcançou diferentes postos de realce. Assim, ocupou as direções do Departamento de Patologia, do Instituto de Pesquisas Gonzaga da Gama Filho, atingindo, finalmente, ao decanto do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, em março de 1981.

É importante ressaltar os títulos obtidos nesta fase, como a presidência da "American Society for Microbiology", ramo local, a eleição e a recondução como presidente da Sociedade Brasileira de Microbiologia nos dois biênios de 1974 a 1978, bem como, o prêmio "Oswaldo Cruz" de 1972, concedido pelo Instituto Oswaldo Cruz ao melhor trabalho de pesquisa científica do ano e sua indicação como membro efetivo do Conselho Técnico-Científico da Fundação Oswaldo Cruz.

Como homem o que distinguia o Prof. Gobert era a sua autenticidade e sua extraordinária retidão de caráter, exteriorizada pela ausência de concessão em seu modo de pensar ou de agir, para agradar a quem quer que fôsse, se não fôsse ela a verdadeira expressão de seu sentimento. Tinha firmes convicções filosóficas aliado à nobreza de um espírito reto, destacando-se pela firmeza com que sempre defendia suas idéias e os princípios de justiça, de liberdade e de dignidade humana.

A Sociedade Brasileira de Microbiologia agradece ao Dr. Ernesto Hofer pela elaboração deste "In Memoriam" e externa seu pesar pelo passamento do Prof. Gobert de Araujo Costa.

EDITORIAL

Ao final do ano de 90, gostaria de fazer uma breve retrospectiva sobre a Revista de Microbiologia.

Recebemos ao longo deste ano, 95 trabalhos novos para serem submetidos a publicação. Publicamos 64 trabalhos e 34 foram recusados e nestes casos, solicitamos aos autores que re-apresentem em outra oportunidade. Lembro que a qualidade de uma revista depende, principalmente, da rigidez com que os revisores julgam os trabalhos e temos procurado, paulatinamente, atingir um padrão cada vez mais elevado. Agradecemos aos colegas citados abaixo que colaboraram ao longo deste ano fazendo esta importante tarefa de analisar e discutir criticamente os trabalhos submetidos a publicação na Revista de Microbiologia.

A. N. Hagler	C. Faccioti
A. Korolkovas	C. V. F. de Godoy
A. F. P. de Castro	C. E. O. de Campos
A. A. Pinto	C. A. Jurgensen
A. E. Cury	C. E. Levy
A. M. Giesbrecht	C. Granato
A. C. Montelli	C. M. F. Mendes
A. C. Linhares	C. Parmuti
A. A. Vieira	D. do Nascimento
A. C. Paulillo	D. Gelli
A. M. Serrano	D. de Angellis
A. F. Eira	D. O. Silva
A. Craveiro	E. Hofer
A. Serzedello	E. N. Mós
A. A. P. Kleiner	E. O. C. F. Guimarães
A. Panek	E. Nahas
A. A. T. Vargas	E. Nepomuceno
A. Bonomi	E. M. Mamizuka
A. C. Schenberg	E. C. de Souza
B. Corrêa	F. Alterthum
B. Fernandes	F. P. de França
B. M. Grisi	G. M. C. Takaki
B. V. Kilirian	H. G. Schatzmayr
B. A. da Cunha	H. Fonseca
B. D. G. M. Franco	H. E. Kolm
B. Ceballos	H. A. P. A. M. de Souza
C. R. Paula	H. R. Barbosa
C. Fava Netto	I. Suassuna
C. L. Cardoso	I. R. Cruz
C. M. Harsi	I. Wenty
C. Bueno Netto	I. M. de Mancilha
C. E. M. Bicudo	I. Y. Ito
C. E. A. Melles	J. K. Sugai

J. L. de Azevedo
J. E. Thiemann
J. G. C. Pradella
J. Veta
J. S. Goldoni
J. Dobereiner
J. O. F. de Moraes
J. R. Modolo
J. A. N. Candeias
K. E. Stewien
L. J. Richtzenhoin
L. R. Trabulsi
L. Zambolin
L. Vermes
L. F. da Silva
L. Rabinovitch
L. M. Teixeira
L. M. Hagler
L. A. de Queiroz
M. de Uzeda
M. L. Racz
M. Homechin
M. F. Leitão
M. L. Carvalho
M. P. Alves
M. L. Scrofermeker
M. I. Z. Sato
M. R. M. Cruz
M. L. Monteiro
M. A. Vargas
M. Magalhães
M. H. T. Liberal
M. Sabino

M. R. L. Toledo
M. J. M. Gianini
M. B. Martinez
M. L. Campos
M. T. Shimizu
O. F. Gompertz
P. P. Gontijo Filho
P. G. Robbs
P. S. Sanchez
P. H. Yasuda
R. Ishak
R. M. S. T. de Carlis
R. A. F. da Cunha
R. Musumesi
R. H. S. F. Vieira
R. A. Machado
R. Yanaguita
S. M. Furlanetto
S. F. B. Trufen
S. O. P. da Costa
S. E. L. Fracalanza
S. T. Iaria
T. Yoneda
T. C. V. Penna
T. Higuchi
T. Vidor
V. L. G. Calich
V. L. de Oliveira
V. P. Canhos
V. R. Linardi
W. Fransisco
W. Schmidell Netto
W. P. de Araujo
Y. K. Park

Enviem seus melhores trabalhos a nossa Revista e apresentem-nos em língua inglesa, pois a partir de 1992, pretendemos que *todos* sejam publicados nesta língua. Lembro que este fato irá contribuir para a divulgação de nossos trabalhos no exterior.

FLÁVIO ALTERTHUM
Diretor Executivo

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
 PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA
 VOLUME 21 OUTUBRO-DEZEMBRO 1990 NÚMERO 4
 REV. MICROBIOL. (S. PAULO), 21(4)

CONTEÚDO-CONTENTS

PÁG

✓ Magalhães, M.; Silva, G.P. da; Magalhães, V.; Antas, M.G.; Andrade, M.A.; Tatenó, S. <i>Vibrio fluvialis</i> e <i>Vibrio furnissii</i> associados a diarreia aguda infantil <i>Vibrio fluvialis</i> and <i>Vibrio furnissi</i> associated with infantile diarrhea.....	295
✓ Gilio, A.E.; Moreira, A.F.; Baldacci, E.R.; Okay, Y.; Manissadjian, A.; Nascimento Mós, E. do; Santos, M.A.; Carpio, J.P.H.; Durigon, E.L. Pesquisa de <i>Clostridium difficile</i> em fezes de crianças internadas em enfermaria geral pediátrica Detection of <i>Clostridium difficile</i> in stools of children in a pediatric ward.....	299
Oliveira Santos, B.M. de; Tanaka, A.M.U. <i>Staphylococcus aureus</i> em portadores sãos de diferentes categorias de enfermagem do HC - FMRPUSP: Fagótipos e resistência a antibióticos. <i>Staphylococcus aureus</i> among healthy carriers working in different nursing categories at HC - FMRPUSP: phagotypes and resistance to antibiotics.....	304
Oliveira Santos, B.M. de; Aguillar, O.M.; Takakura, M.S. Colonização simultânea de <i>Staphylococcus aureus</i> na cavidade nasal e mãos de portadores sãos de um hospital-escola Behavior of <i>Staphylococcus aureus</i> strains from simultaneous areas of healthy carriers working in different nursing category in a general teaching hospital.....	309
Queiroz de Freitas, M.A.; Magalhães, H. Enterotoxigenicidade de <i>Staphylococcus aureus</i> , isolados de vacas com mastite Enterotoxigenicity of <i>Staphylococcus aureus</i> isolated from Mastitic Cows.....	315
Carmo, L.S. do; Bergdoll, M.S. Toxinfecção alimentar por <i>Staphylococcus</i> em Belo Horizonte (Brasil) Staphylococcal food poisoning in Belo Horizonte (Brazil).....	320
Rossi Jr., O.D.; Iaria, S.T.; Santos, I.F. dos; Berchieri Jr., A. Carne mecanicamente separada de origem bovina. I - Influência de dois sistemas de desossa manual sobre as características microbiológicas do produto recém obtido Mechanically separated beef. I - Influence of two deboning systems on the microbiological characteristics of the newly obtained product.....	324
Calderon, D.F.; Furlanetto, S.M.P. Análise bacteriológica de carnes suínas comercializadas em açougues da cidade de São Paulo Bacteriological quality of fresh pork.....	331
Mayer, M.P.A.; Zelante, F.; Simionato, M.R.L. Efeito das condições de cultura na produção de mutacina Effect of culture conditions on mutacin production.....	337

Tauk, S.M.; Malagutti, E.N.; Medeiros, A.M. Nutrientes, atividades enzimáticas e microrganismos do solo tratado com vinhaça e ou torta de filtro em cultura de cana-de-açúcar Nutrients, enzymatic activities and microorganisms of soil treated with vinasse and/or filter cake in sugar cane culture.....	342
Nahas, E.; Assis, L.C. de; Silva, A.P. Sensibilidade do <i>Aspergillus niger</i> ao thiram Sensitivity of <i>Aspergillus niger</i> to thiram.....	350
Aguero, J.M.Z.; Macêdo, G.R. de; Facciotti, M.C.R.; Schimidell, W. Influência do pH na síntese e liberação de glicoamilase por <i>Aspergillus awamori</i> NRRL 3112 e <i>Aspergillus niger</i> NRRL 337 Influence of pH on glucoamylase synthesis and secretion by <i>Aspergillus awamori</i> NRRL 3112 and <i>Aspergillus niger</i> NRRL 337.....	355
Rosa, C.A.; Novak, F.R.; Almeida, J.A.G.; Mendonça-Hagler, L.C.; Hagler, A.N. Leveduras de leite humano coletado na cidade do Rio de Janeiro, Brasil Yeasts from human milk collected in Rio de Janeiro, Brazil.....	363
✓ Ceccarelli, V.R.S.M.; Schmidt, C.; Trabulsi, L.R. Isolamento de <i>Yersinia enterocolitica</i> em um laboratório particular da cidade de São Paulo Isolation of <i>Yersinia enterocolitica</i> in São Paulo, Brazil.....	364
Smania Jr., A.; Gil, M.L.; Smania, E.F.A. Um novo meio para a conservação de <i>Neisseria</i> A new medium (MSE) for the preservation of <i>Neisseria</i>	366

Lilacs

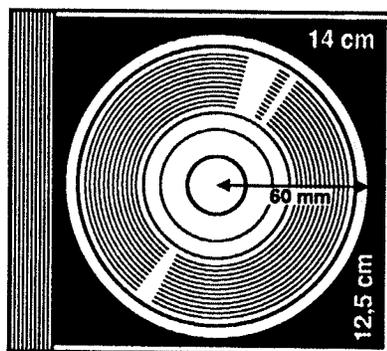
CD-ROM

Esta revista
está indexada na
Base de Dados
LILACS

*Esta é a maior área útil da saúde
BRASILEIRA, LATINO-AMERICANA e
do CARIBE.*

LILACS CD-ROM: a mais completa e atualizada base de dados já produzida para registrar e difundir mundialmente a produção intelectual do profissional de saúde do Brasil, da América Latina e do Caribe.

Graças a uma tecnologia avançadíssima, a **BIREME** conseguiu reunir, em um único Compact Disc, citações bibliográficas e resumos de documentos, desde 1982, num esforço conjunto com os países da Rede Latino-americana e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde. E mais: além de **LILACS**, cada disco ainda traz a base de dados **REPIDISCA**, com documentos das ciências do



ambiente e engenharia sanitária coletados pelo Centro Panamericano de Engenharia Sanitária e Ciências do Ambiente. Para penetrar neste universo de informações você só precisa de um micro compatível com o PC -XT ou AT e

um equipamento de leitura de **CD-ROM**.

A **BIREME** fornece o software para acessar **LILACS CD-ROM**.

Entre hoje mesmo em contato com a **BIREME** e receba, de 3 em 3 meses, um novo CD que traz, além do conteúdo anterior, os últimos artigos analisados e indexados. O preço da assinatura anual é apenas US\$ 120,00* no câmbio oficial.

BIREME

Centro Latino-americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde

Rua Botucatu, 862 - 04023 - São Paulo - Brasil - Telex: 1122143 OPAS BR - Tel.: (011) 549-2611 - Fax.: (011) 571-1919

Organização Panamericana da Saúde - OPAS



OMS - Organização Mundial da Saúde

(*) Preço válido para a América Latina e Caribe. Para os demais países US\$ 250,00.

VIBRIO FLUVIALIS AND VIBRIO FURNISSII ASSOCIATED WITH INFANTILE DIARRHEA

Marcelo Magalhães*
Gisélia P. da Silva**
Vera Magalhães***
Maria G. Antas*
Marlene A. Andrade*
Seiki Tateno*

SUMMARY

During a recent investigation on the etiology of infantile diarrhea in Recife, a city situated on the Northeast Coast of Brazil, eight (5%) strains of *Vibrio* were identified. Five strains were classified as *V. fluvialis* and the three others as *V. furnissii*. In six patients, *Vibrio* might have been the primary agent of the diarrhea.

Key words: *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissii*, diarrhea

INTRODUCTION

Vibrio fluvialis and *V. furnissii* are two new species of halophilic vibrios recognized in the 1980s (1,7). Both have been associated with extensive outbreaks of human diarrhea (2,3,6), but their role in human disease is still accepted with some restriction (5,6,7). During a recent investigation on the etiology of infantile diarrhea carried out in Recife, a tropical city situated in Brazil Northeast, five strains of *V. fluvialis* and three strains of *V. furnissii* were isolated. The clinical features and the microbiology of the cases from whom vibrios were identified are now reported.

MATERIAL AND METHODS

Children studied - One hundred sixty in-

fants under one year of age, from a low socioeconomic background, with a history of three or more loose stools in the previous 24h, were selected. Patients were clinically examined by a pediatrician, who also collected and noted the characteristics of the stool specimen. The study was carried out between February and June 1990.

Microbiologic methods - Recognized methods were used to identify *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., enteropathogenic *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloidis*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium* spp., and rotavirus (8). Strains of *E. coli* belonging to the classic enteropathogenic serovars were tested for adherence to HeLa cells by using a previously described technique (10). For recovering *Vibrio*, fecal samples were enriched in alkaline peptone water (pH 8.5) supplemented with 2% NaCl and subcul-

* Laboratório Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife 50730, Brasil.
** Departamento Materno Infantil, UFPE;
*** Departamento de Medicina Tropical, UFPE.

tured to thiosulphate-citrate-bile salts-sucrose agar (Difco Laboratories, Detroit, Mich.). *Vibrio* were biochemically classified by using accepted criteria (1,7,8). Sugar breakdown were carried out in bromothymol blue liquid medium (1% tryptone amended with 1% NaCl; pH7) distributed in test tubes, and closed with cotton corks. Tests were scored after 48 h of incubation at 37°C.

Leukocytes were searched on Gram stained fecal smears.

Serologic testing - Antisera were prepared against strain 84 of *V. fluvialis*, and against the strain 19 of *V. furnissii* by injecting albino rabbits with five 1 ml doses of stationary-phase cultures at

7 days intervals. Blood was drawn 7 days after the last injection. The slide agglutination titer of the antiserum against the homologous strains 84 was 1:64, and against the homologous strain 19 was 1:32. The antisera 84 and 19 were respectively tested against the other strains of *V. fluvialis* and *V. furnissii* by slide agglutination using live cultures.

RESULTS

Vibrio were isolated from eight (5%) of the patients. The age of these patients ranged from one to eight months. Of the *Vibrio* strains, five were classified as *V. fluvialis* and the others as *V. furnissii*. On TCBS their colonies were large, mucoid and deeply yellow. Within the same species, there was an uniform biochemical behaviour of the various strains, concerning the tests employed (Table 1).

No serologic cross-reactions were observed between the strains 84 and 19, and the other strains studied.

In two cases, one infected with *V. furnissii* and the other with *V. fluvialis*, vibrio was the only enteropathogen identified whereas in all the other patients mixed infections were observed: *Campylobacter jejuni*, two cases; *Shigella dysenteriae*, *S. flexnerii*, *Escherichia coli* 055:H-, and *E. coli* 086:H34, each one case (Table 2).

Clinical features of the patients from whom vibrios were isolated included watery diarrhea (100%); vomiting (62.5%); dehydration (12.5%); blood in feces (25%); and fever (50%). The length of diarrhea ranged from four to 19 days, and 62.5 per cent of the patients presented on microscopical examination leukocytes in their stools. The two patients who furnished only vibrios were well hydrated, despite their watery diarrhea with fecal leukocytes. The length of the disease in the patient

Table 1 - Biochemical behaviour of 8 *Vibrio* strains

Test ^a	% of isolates positive	
	<i>V. fluvialis</i> n = 5	<i>V. furnissii</i> n = 3
Growth in:		
0% NaCl	0	0
8% NaCl	100	100
Lysine decarboxylase	0	0
Arginine dchydrolase	100	100
Omithine decarboxilase	0	0
ONPG	100	100
Voges-Proskauer	0	0
Gas in TSI	0	100
Acid from:		
Sucrose	100	100
Arabinose	100	100
Lactose	0	0
Salicin	100	0
Glycerol	0	100
Esculin	60	0

All tests were done in culture media supplemented with 1% NaCl. Except ONPG, tests were evaluated at 48 h.

Table 2 - Laboratory and patient data related to isolation of *Vibrio* species

Case	Age (months)	Length of diarrhea (days)	<i>Vibrio</i> species	Other enteropathogen	Neutrophils in feces
19	1	6	<i>V. furnissii</i>		No
36	1	12	<i>V. fluvialis</i>	<i>C. jejuni</i>	No
62	5	6	<i>V. fluvialis</i>	EPEC* 055:H-	No
80	6	5	<i>V. fluvialis</i>	<i>S. flexnerii</i>	No
83	6	4	<i>V. fluvialis</i>	<i>C. jejuni</i>	No
84	5	18	<i>V. fluvialis</i>	EPEC 086:H18	No
121	8	7	<i>V. furnissii</i>	None	Yes
155	5	19	<i>V. furnissii</i>	None	Yes
				<i>S. dysenteriae</i>	Yes

* EPEC, Enteropathogenic *E. coli*.

infected with *V. fluvialis* was of 18 days, and in the other infected with *V. furnissii* was of 7 days.

DISCUSSION

V. fluvialis and *V. furnissii* are two related species of *Vibrio* which are easily separated, from the biochemical viewpoint, because *V. furnissii* is aerogenic. Other tests, such as esculin, salicin, and glycerol breakdown, have shown discrepant results depending on the authors (1,7). However, using the methods here described in the section Materials and Methods, and a larger number of strains (results not yet published), we found that acid production from glycerol and salicin are also useful tests for distinguishing the two strains. Concerning the hydrolysis of esculin our results are similar to those obtained by Lee & col (7), and different of others (1). Discrepancy of results have been clarified before and was attributed to test technical differences (1).

Although *V. fluvialis* and *V. furnissii* have clearly been associated with some cases of infantile diarrhea, we do not know with confidence, except in two cases, whether they were, in fact, the primary agent of the disease. Indeed, in developing countries mixed infections and the high prevalence of many enteropathogens among asymptomatic children difficult interpretation on the etiology of infantile gastroenteritis (4). This situation is still more complicated because a control group was not included in this survey. In this vein, however, during the same period of 1989 we carried out a case control study involving 252 infants under two years of age. This investigation revealed no *V. fluvialis* or *V. furnissii*, but one strain of *V. cholerae* non 01 and another belonging to an unclassified halophylic vibrio (Magalhães, M. & col., Rev. IMIP, in press). Then, it is a tough question to answer why in 1989, though using the same methodology to isolate vibrio as that used now, we did not recover any strain of *V. fluvialis* or *V. furnissii*. Patients studied in both surveys belonged to the same low socio-economic background and were seen at the same hospital. The lack of serologic similarity between the strains 84 and 19 with other *V. fluvialis* and *V. furnissii* strains, respectively, suggested that the cases of vibrio diarrhea now presented were not acquired from a common source or derived from a single bacterial clone. This finding did not support our initial feeling about the occurrence of a small outbreak of vibrio linked infantile diarrhea in Recife.

As have previously been discussed (4) it is hard to decide in mixed infantile diarrheal infection which is, in fact, the microorganism responsible for the current clinical episode. However, if we take into account that vibrios are rare or absent among healthy humans (7) and that campylobacters are frequently found among ill and healthy children in Recife (9), vibrio would have been, in reality, the responsible for the diarrhea in the cases where both microorganisms were simultaneously isolated. Furthermore, the same thing might have occurred in the case where vibrio was isolated jointly with *E. coli* 055:H - since this strain did not adhere to HeLa cell as did the pathogenic ones (10). Concerning the patients who furnished *Vibrio* and *Shigella*, the question of which is the actual pathogen rests to be seen. In this connection, one of these patients did not present leukocytes in the stools. Leukocytes in the stools are a hallmark of the *Shigella* enteric infections (11). In contrast, patients infected with *V. fluvialis* may or not present fecal leukocytes during their gastroenteritis (6).

In conclusion, these data suggest that clinical microbiologists should be aware of the possibility to recover vibrio during infantile enterobacteriologic work. Special attention must be given to *Aeromonas*, mainly in laboratories that do not use thiosulphate-citrate-bile salts-sucrose agar. Approximately one-third of the anaerobic, lysine-decarboxylase negative strains maintained in the collection of an English Public Health laboratory were in fact *V. fluvialis* and not members of the genus *Aeromonas* (7). Both microorganisms, however, could easily be distinguished because *V. fluvialis* does not grow in the absence of sodium chloride and generally does in 8% salt concentration.

RESUMO

Vibrio fluvialis e *Vibrio furnissii* associados à diarreia aguda infantil

Durante recente investigação sobre a etiologia da diarreia aguda infantil realizada no Recife, cidade situada na Costa Nordeste do Brasil, identificaram-se oito (5%) amostras de *Vibrio*. Destas, cinco foram classificadas como *V. fluvialis* e as outras três como *Vibrio furnissii*. Em seis pacientes vibrio poderia ter sido o agente primário da diarreia.

Palavras chaves: *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissii*, diarreia.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil (Proj. 500301/88), and Japan International Cooperation Agency (JICA).

REFERENCES

1. Brenner, D. J.; Hickman-Brenner, F. W.; Lee, J. V.; Steigerwalt, A. G.; Fanning, G.R.; Hollis, D.G.; Farmer III, J.J.; Weaver, R.E.; Joseph, S.W. & Seidler, R.J. *Vibrio furnissii* (formerly aerogenic biogroup of *Vibrio fluvialis*), a new species isolated from human feces and the environment. *J. Clin. Microbiol.*, 18:816-824, 1983.
2. Center for Disease Control. - An outbreak of acute gastroenteritis during a tour of the Orient-Alaska. *Morbid. Mortal Weekly Rep.*, 18:150, 1969.
3. Center for Disease Control. - Acute gastroenteritis among tour groups to the Orient-United States. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.*, 18:301-303, 1969.
4. Echeverria, P.; Taylor, D.N.; Leksomboon, U.; Bhaibulaya, M.; Blacklow, N.R.; Tamura, K. & Sakazaki, T. - Case-control study of endemic diarrheal disease in Thai children. *J. Infect. Dis.*, 159:543-548, 1989.
5. Farmer, J.J., III; Hickman-Brenner, F.W. & Kelly, M.T. - *Vibrio*. In: - Lennette, E.H.; Balows, A.; Hausler, Jr., W.J. & Shadomy, H.J., eds. - Manual of Clinical Microbiology, 4th ed. Washington, D.C., American Society for Microbiology, p.282-301, 1985.
6. Huq, M. I.; Alam, A.K.M.J.; Brenner, D.J. & Morris, G.K. - Isolation of *Vibrio*-like group, EF-6, from patients with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.*, 11:621-624, 1980.
7. Lee, J.V.; Shread, P.; Furniss, A.L. & Bryant, T.N. Taxonomy and description of *Vibrio fluvialis* sp. nov. (synonym group F vibrios, group EF6). *J. Appl. Bacteriol.*, 50:73-94, 1981.
8. Lennette, E.H.; Balows, A.; Hausler, Jr.; W.J. & Shadomy, H.J. - Manual of Clinical Microbiology, 4th ed. Washington, D.C., American Society for Microbiology, 1985.
9. Magalhães, M.; Andrade, M. A. & da Silva, G. P. - Simple and inexpensive method for culturing *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*. *Rev. Microbiol.*, 13:124-125, 1982.
10. Scaletsky, I.C.A.; Silva, M.L.M. & Trabulsi, L.R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect. Immun.*, 41:1340-1351, 1984.
11. Trabulsi, L.R. - *Shigella*. In: Trabulsi, L.R., ed. Microbiologia das infecções intestinais. São Paulo, Livraria Atheneu, p.59-65, 1981.

Received for publication in 29/08/90

PESQUISA DE *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* EM FEZES DE CRIANÇAS INTERNADAS EM ENFERMARIA GERAL PEDIÁTRICA

Alfredo Elias Gilio¹
Arnaldo Fleury Moreira¹
Evandro Roberto Baldacci²
Yassuhiko Okay²
Antranik Manissadjian²
Eduardo do Nascimento Mós³
Manuel Antonio Santos³
Juan Pastor Herrera Carpio³
Edison Luiz Durigon³

RESUMO

Pesquisamos, nas fezes de 86 crianças internadas em enfermarias gerais de pediatria, a presença de *Clostridium difficile*. As crianças foram divididas em 4 grupos: Grupo I - 23 crianças sem diarreia e sem uso prévio de antimicrobianos; Grupo II - 33 crianças sem diarreia e com uso prévio de antimicrobianos; Grupo III - 13 crianças com diarreia e sem uso prévio de antimicrobianos; e Grupo IV - 17 crianças com diarreia e com uso prévio de antimicrobianos. O *C. difficile* foi identificado em 4/23 crianças do Grupo I (17,3%), em 5/33 do Grupo II (15,1%), em 3/13 do Grupo III (23%) e em 5/17 do Grupo IV (29,4%). A comparação entre grupos não mostrou diferença estatisticamente significativa entre si. Do mesmo modo, a frequência do não mostrou diferença estatisticamente significativa quando comparamos todas as crianças com uso prévio de antimicrobianos (Grupos II e IV) versus Grupo I e todas as crianças com diarreia (Grupos III e IV) versus Grupo I.

Concluimos que o *C. difficile* pode ser encontrado nas fezes de crianças sem patologias gastrointestinais e sem uso prévio de antimicrobianos (Grupo I) em 17% dos casos e que o uso prévio de antimicrobianos e/ou presença de diarreia não altera de modo significativo o encontro do germe nas fezes das crianças.

Palavras chaves: *Clostridium difficile*, fezes, crianças, pediatria.

INTRODUÇÃO

O *Clostridium difficile* foi descrito, em 1935, por HALL e O'TOOLE, nas fezes de recém-nascidos normais (9). Outros trabalhos vieram cor-

roborar, posteriormente, estes achados (1,5). Mais recentemente, vários estudos têm registrado presença do *C. difficile* em fezes de crianças normais, principalmente naquelas com menos de um ano de idade. As taxas de isolamento da bactéria variam de

1. Divisão de Pediatria do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo.
2. Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
3. Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Endereço para correspondência: YASSUHIKO OKA Instituto da Criança "Prof. Pedro de Alcântara" Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 647 CEP: 05403 - São Paulo - SP.

17 a 90%, dependendo do local e da população estudada. Em crianças com mais de dois anos de idade, esta taxa situa-se ao redor de 4%, aproximando-se dos valores encontrados em adultos de 1 a 3% (4,6,16,18,20).

Aceita-se, atualmente, que o *C. difficile* e/ou suas toxinas estejam implicados na gênese da colite pseudo-membranosa, dadas as múltiplas evidências clínicas e experimentais existentes (2,3,11,12,13,16,18,19,21). No entanto, parece claro que a presença do *C. difficile* e/ou sua toxina, embora necessária, é insuficiente por si só para explicar o aparecimento da doença.

Entre os dois extremos acima mencionados, isto é, crianças com presença de *C. difficile* nas fezes, porém assintomáticas, e crianças com colite pseudo-membranosa, situam-se as crianças com diarreia aguda após utilização de antimicrobianos, com presença de *C. difficile* e/ou suas toxinas nas fezes, na ausência de outros agentes patogênicos habitualmente responsáveis por diarreia aguda. Não se sabe, nestes casos, qual o papel do *C. difficile* e suas toxinas (2, 4,8,14,15,17,20).

Se é verdade que, em um percentual significativo de crianças normais, se identifica o *C. difficile* em suas fezes, objetivamos, neste trabalho, avaliar se a utilização prévia de antimicrobianos e/ou presença de diarreia aumentam a frequência do encontro de *C. difficile* nas fezes destes grupos de crianças.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

a. Casuística

Analisamos, em estudo prospectivo, 86 amostras individuais de fezes de crianças internadas de julho de 1987 a março de 1988, na Enfermaria de Pediatria do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo. Das 86 crianças, 69 eram lactentes e 17 pré-escolares. Estas foram divididas em 4 grupos: Grupo I: constituído de 23 crianças sem diarreia e que não haviam recebido antimicrobianos nas duas últimas semanas (Grupo controle); Grupo II: constituído de 33 crianças sem diarreia, e que haviam recebido antimicrobiano há pelo menos 24 horas (os antimicrobianos utilizados foram: penicilina - 12, cloranfenicol - 8, sulfametoxazol-trimetoprim - 6, oxacilina - 3, cefalotina - 2, ácido nalidíxico - 1, cefoxitina 1); Grupo III: constituído de 13 crianças com diarreia aguda e que não haviam recebido antimicrobiano nas últimas duas semanas; Grupo IV: constituído de 17 crianças com diarreia aguda e que haviam recebido antimicrobiano há

pelo menos 24 horas (os antimicrobianos utilizados foram: penicilina - 5, sulfametoxazol-trimetoprim - 4, cloranfenicol - 3 e amicacina - 3).

A diarreia aguda foi definida pela presença de 3 ou mais evacuações semilíquidas ou líquidas por dia, com duração nunca superior a 3 semanas.

b. Coleta e processamento das fezes

Todas as amostras de fezes com consistência semipastosa ou pastosa foram colhidas com espátulas de madeira, após evacuação espontânea. As fezes líquidas ou semilíquidas foram colhidas em coletor plástico descartável, após evacuação espontânea. Aproximadamente 1 g de fezes foi adicionada a 10 ml de solução tampão fosfato pré-reduzida, que serviu como meio de transporte. A semeadura das amostras foi realizada em tempo nunca superior a uma hora após a coleta. A seguir, foram realizadas diluições seriadas e decimais a partir da amostra de transporte (10^{-1}), até a diluição 10^{-7} , com a solução tampão fosfato pré-reduzida, sob fluxo de CO₂.

As amostras foram semeadas, posteriormente, em meio seletivo diferencial contendo cicloserina, cefoxitina, frutose, gema de ovo e água, conforme as indicações de GEORGE colab. (7). As placas foram, então, incubadas em jarra de anaerobiose, a 37°C, durante 48 a 72 horas. Após o período de incubação, observou-se a morfologia das colônias presentes no meio de cultura, com a ajuda de um microscópio estereoscópico. Caldo BHI, pré-reduzido, suplementado, foi utilizado para se realizar a transferência das colônias suspeitas.

Após o período de incubação de 24 horas, foi realizado o teste de respiração e preparação do esfregaço em lâminas.

Duas placas de ágar-sangue de carneiro a 5% e uma de ágar-sangue suplementado com hemina e menadiona foram semeadas e incubadas, respectivamente em aerobiose, microaerofilia e anaerobiose.

Para observar as características morfológicas e tintoriais e presença e localização do esporo, foram empregados o método de coloração de Gram, Kopeloff modificado e Ziehl-Neelsen.

As colônias consideradas anaeróbias estritas pelo teste da respiração, com crescimento em ambiente de anaerobiose, que se apresentavam como bacilos Gram positivos esporulados, foram submetidas à identificação presuntiva. Seguiu-se a identificação definitiva através de testes bioquímicos. Os testes bioquímicos utilizados foram: hidrólise da gelatina, produção de indol, hidrólise da esculina, redução do nitrato, fermentação de carboidratos (frutose, glicose, lactose, maltose, mani-

tol e sacarose), produção de lipase e lecitinase segundo descrição de HÖLDEMAN e colab. (10).

As amostras de *C. difficile*, identificadas nas fezes das crianças, foram submetidas também à titulação da toxina B em cultura de tecido (12).

Utilizamos o teste do qui-quadrado para estabelecer comparações entre os grupos. Fixamos o nível de significância em 5% para estabelecer diferenças entre os grupos.

RESULTADOS

A tabela 1 mostra a frequência do *C. difficile* nas fezes das crianças dos 4 grupos estudados.

O *C. difficile* foi identificado nas fezes de 4/23 crianças do Grupo I (crianças sem diarreia e sem uso prévio de antimicrobianos), correspondendo a um percentual de 17,3%. Não identificamos a toxina B em nenhuma destas 4 crianças. No Grupo II (crianças sem diarreia, porém com uso prévio de antimicrobianos), o *C. difficile* foi identificado nas fezes de 5/33 crianças (15,1%). Neste grupo a toxina B foi identificada em uma das 5 crianças. No Grupo III (crianças com diarreia, sem uso prévio de antimicrobianos) identificamos o *C. difficile* em 3/13 crianças (23%) e a toxina B em uma das 3 com presença do germe nas fezes. No Grupo IV (crianças com diarreia e com uso prévio de antimicrobianos) o *C. difficile* foi identificado em 5/17 crianças (29,4%) e em 3 das 5 crianças com *C. difficile* positivo foi identificada a toxina B.

A comparação entre grupos, isto é, I x II, I x III, I x IV, II x III, II x IV e III x IV, não mostrou diferença estatisticamente significativa a nível de 5%.

TABELA 1 – Frequência do *Clostridium difficile* nas fezes das crianças dos 4 grupos estudados.

Grupos de crianças	Número de culturas positivas para <i>C. difficile</i> / total de amostras analisadas	%
Grupo I	4/23	17,3
Grupo II	5/33	15,1
Grupo III	3/13	23,0
Grupo IV	5/17	29,4

Obs: Foi analisada uma amostra de fezes para cada criança.
 Grupo I: crianças sem diarreia e sem uso de antimicrobianos (grupo controle).
 Grupo II: crianças sem diarreia e que haviam recebido antimicrobianos há pelo menos 24 horas.
 Grupo III: crianças com diarreia aguda e que não haviam recebido antimicrobianos.
 Grupo IV: crianças com diarreia aguda e que haviam recebido antimicrobiano há pelo menos 24 horas.

Comparando a frequência de *C. difficile* dos grupos que receberam antimicrobianos previamente (Grupos II e IV) com o Grupo I obtivemos 10/50 (20%) versus 4/23 (17,3%); a diferença não é estatisticamente significativa.

Comparando a frequência de *C. difficile* dos grupos com diarreia (Grupos III e IV) com o Grupo I obtivemos 8/30 (26,6%) versus 4/23 (17,3%) e também a diferença não foi estatisticamente significativa.

DISCUSSÃO

Identificamos, no Grupo I (grupo controle), o *C. difficile* em 4/23 crianças (17,3%). Estes valores sobrepõem-se aos obtidos por vários autores (6,17,20) e corroboram os dados da literatura que mostra que o *C. difficile* pode ser encontrado na microbiota intestinal de crianças normais e assintomáticas (1,4,5,14,17,20). A literatura também afirma que a toxina B pode ser identificada nas fezes de crianças normais e assintomáticas (4,5,14,17,18,20). Nossos dados, contrariamente aos da literatura, mostram que em pelo menos nas 4 crianças normais e assintomáticas, com presença de *C. difficile* nas fezes, a toxina não foi identificada. Das 86 crianças estudadas, 5 eram recém-nascidos e pertenciam aos Grupos II, III e IV. Contrariamente ao relatado na literatura, nenhum dos recém-nascidos apresentou *C. difficile* nas fezes, mesmo pertencendo, teoricamente, a grupos com maior probabilidade de apresentá-lo. Uma possível explicação para o fato prende-se ao número exíguo de recém-nascidos.

O grupo de crianças sem diarreia e com uso prévio de antimicrobianos (Grupo II) e os grupos de crianças com uso prévio de antimicrobianos com ou sem diarreia (Grupos II e IV) comparados com o Grupo I não mostraram diferença estatisticamente significativa em relação à frequência nas fezes. Embora vários autores tenham relatado resultados semelhantes (4,6), é preciso lembrar que as fezes das crianças foram coletadas nas primeiras 48 horas de internação e que, portanto, o curto tempo de utilização de antimicrobianos poderia não ter interferido, efetivamente, a nível de flora intestinal das crianças no sentido de fazer emergir um percentual maior de crianças com *C. difficile* nas fezes. O Grupo III isoladamente e os Grupos III e IV em conjunto, comparados com o Grupo I, também não mostraram diferença estatisticamente significativa mostrando que a presença de diarreia isoladamente, ou associado ao uso prévio de antimicrobianos, não interferiu na frequência de *C. difficile* nas fezes

destes grupos de crianças. Estes achados são semelhantes aos de alguns autores (17,20), porém são contrariados por outros autores que obtiveram, nestas circunstâncias, frequência mais elevada (8,15) ou menor (6). Estas discrepâncias talvez reflitam diferenças nas populações analisadas ou mesmo variações regionais.

O aspecto relacionado à toxina B merece um breve comentário. Ela só foi pesquisada nas culturas positivas para *C. difficile* e portanto os resultados não podem ser extrapolados até o nível dos grupos. Do mesmo modo, a presença da toxina B em 4/8 crianças com presença de *C. difficile* nas fezes e pertencentes aos grupos com diarreia não nos autoriza a relacionar a diarreia à presença da toxina, embora a coprocultura para *Escherichia coli* enteropatogênica e enteroinvasiva, *Shigella sp*, *Salmonella sp*, e pesquisa para Rotavírus tenham sido todas negativas em 3 das crianças e apenas em uma delas encontramos *E. Coli* O₁₁₁.

Podemos portanto concluir, deste trabalho, que o *C. difficile* pode ser encontrado em fezes de crianças sem patologias gastrintestinais e sem uso prévio de antimicrobianos e que o uso prévio de antimicrobianos associado ou não à presença de diarreia não elevou a frequência de identificação do *C. difficile* nas fezes das crianças destes grupos.

SUMMARY

Detection of *Clostridium difficile* in stools of children in a pediatric ward.

Stool specimens of 86 children admitted to a general pediatric ward were cultured for *Clostridium difficile*. The children were divided in 4 groups: Group I - 23 children without diarrhea and with no previous exposure to antibiotics. Group II - 33 children without diarrhea but previously exposed to antibiotics. Group III - 13 children with diarrhea, without previous antibiotic exposure. Group IV - 17 children with diarrhea and previously submitted to therapy with antibiotics.

C. difficile was isolated from stool specimens of 4/23 children in Group I (17.3%), 5/33 children in Group II (15.1%), 3/13 children in Group III (23%) and 5/17 children in Group IV (29.4%).

Statistical analyses showed prevalence of *C. difficile* among the four groups to be comparable. Similar patterns of prevalence of *C. difficile* were found when Group I was compared either with all the children previously exposed to antibiotics or also with all the children with gastroenteritis.

We conclude that *C. difficile* can be found in 17% of stool samples of children without diarrheal illnesses and without previous antibiotic therapy (Group I). The presence of diarrhea and/or antibiotic therapy does not enhance significantly the possibility of isolation this organism from children's stool specimens.

Keywords: *Clostridium difficile* - stool, children, pediatry.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Al-Jumaili, I.J.; Shibley, M.; Lishmann, A.H. & Record, C.O. - Incidence and origin of *Clostridium difficile* in neonates. *J. Clin. Microbiol.* 19: 77-78, 1984.
2. Bartlett, J.G.; Chang, T.W.; Gurwith, M.; Gorbach, S.L. & Onderdout, A.B. - Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. *N. Engl. J. Med.*, 298: 531-534, 1978.
3. Bartlett, J.G.; Taylor, N.S.; Chang, T. & Dzink, J. - Clinical and laboratory observations in *Clostridium difficile* colitis. *Am. J. Clin. Nutr.*, 33: 2521-2526, 1980.
4. Collignon, A.; Cotte-Lafitte, J.; Quero, A.M.; Torlotin, J.C.; *Clostridium difficile* and its cytotoxin in stools of hospitalized infants - influence of antibiotic treatment. *Pathol. biol.* 34: 977-982.
5. Donta, S.T. & Myers, M.G. - *Clostridium difficile* toxin in asymptomatic neonates. *J. Pediat.*, 100: 431-434, 1982.
6. Garcia, L.B. & Uzeda, M. - Ocorrência de *Clostridium difficile* nas fezes de crianças no Rio de Janeiro. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 30: 419-423, 1988.
7. George, W. L.; Sutter, W.L.; Citron, D. & Finegold, S.N. - Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.*, 14: 26-31, 1979.
8. Gilligan, P. H.; Mac Carthy, L.R. & Genta, W. M. - Relative frequency of *Clostridium difficile* in patients with diarrheal disease. *J. Clin. Microbiol.*, 14: 26-31, 1981.
9. Hall, I.C. & O'Toole, E. - Intestinal flora in newborn infants. *Am. J. Dis. Child*, 49: 390-402, 1935.
10. Holdeman, L.V.; Cato, E. P. & Moore, W.E.C. - Anaerobe laboratory manual 4^o ed. Blacksburg, Virginia Polytechnic, Institute & State University, 1977.
11. Kasper, D. - Clindamycin associated colitis due to a toxin producing species of *Clostridium* in hamsters. *J. Infect. Dis.*, 136: 701-705, 1977.
12. Larson, H.E.; Parvi, J.V.; Price, A.B.; Davies, D.R.; Boby, J. & Tyrrel, D.A.J. - Undescribed toxin in pseudomembranous colitis. *Br. Med. J.*, 1: 1246-1248, 1977.
13. Larson, H.E. & Price, A.B. - Pseudomembranous colitis presence of clostridial toxins. *Lancet*, 2: 1312-1314, 1977.
14. Libby, J.M.; Donta, S.T. & Wilkins, T.D. - *Clostridium difficile* toxin A in infants. *J. Infect. Dis.*, 148: 606, 1983.
15. Luzzi, I.; Caprioli, A.; Galbo, B.; Guarino, A.; Capa-

- no, G.; Alessio, M.; Malamisura, B. & Gianfrielli, P. - Detection of clostridial toxin in stools from children with diarrhoea. *J. Med. Microbiol.*, 22: 29-31, 1986.
16. Lyerly, D.M.; Krivan, H.C. & Wilkins, T.D. - *Clostridium difficile*: Its disease and toxins. *Clinical Microbiology Reviews*. 1: 1-18, 1988.
17. Mardh, P.A.; Helin, I.; Colleem, I.; Oberg, M. & Holst, E. - *Clostridium difficile* toxin in faecal specimens of healthy children and children with diarrhea. *Acta Paediatr. Scand.*, 71: 275-280, 1982.
18. Nash, J.G.; Chattopadhyay, B.; Courbe, J.H. & Tagbagchali, S. - *Clostridium difficile* and cytotoxin in routine faecal specimens. *J. Clin. Path.*, 35: 561-565, 1982.
19. Shemano, I.; Hitchers, J.T. & Beiler, J.M. - Paradoxical intestinal inhibitory effects of staphylococcal enterotoxin. *Gastroenterology*, 53: 71-77, 1967.
20. Torres, J.G.; Cedillo, R.; Sanchez, J.; Dillman, C.; Giono, S. & Munor, O. - Prevalence of *Clostridium difficile* and its cytotoxin in infants in Mexico. *J. Clin. Microbiol.*, 20: 274-275, 1984.
21. Willey, S.H. & Bartlett, J.G. - Cultures for *Clostridium difficile* in stools containing a cytotoxin neutralized by *C. sordelli* antitoxin. *J. Clin. Microbiol.*, 10: 880-884, 1979.

Recebido para publicação em 21/05/90

STAPHYLOCOCCUS AUREUS EM PORTADORES SÃOS DE DIFERENTES CATEGORIAS DE ENFERMAGEM DO HC-FMRPUSP: FAGÓTIPOS E RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS.

Branca Maria de Oliveira Santos¹
Ana Maria Uthida Tanaka²

RESUMO

O reconhecimento da identidade de 499 amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas da cavidade nasal, orofaringe e mãos de 324 portadores sãos de diferentes categorias de enfermagem do HC-FMRPUSP foi obtido por meio da determinação da sensibilidade a antibióticos e da fagotipagem. A maioria das amostras caracterizou-se por modelos com resistência a, no máximo, dois antibióticos. Os modelos de reação a três ou mais antibióticos demonstraram uma possível tendência na mão esquerda, concentrando-se entre os elementos de enfermagem dos grupos A e B. Da coleção de amostras fagotipáveis, 54 (13,4%) foram lisadas pelos complexos epidêmico-hospitalares - "52, 52A, 80, 81" e "83A, 84, 85"; 78 (19,3%) por um e/ou mais fagos do complexo "94,96" associado(s) ou não a fagos de outros grupos e 91 (22,6%) pelos fagos do complexo "3A, 3C, 55, 71". A correspondência entre os resultados do antibiograma e da fagotipagem permitiu a detecção de alguns portadores com amostras "epidêmicas hospitalares"

Palavras chaves: *Staphylococcus aureus*, portadores sãos, fagotipagem, resistência a antibióticos, hospitalar, enfermagem

INTRODUÇÃO

Em trabalho anterior (8) procurou-se verificar a prevalência de portadores sãos de *Staphylococcus aureus* na cavidade nasal, orofaringe e mãos (direita e esquerda) entre os elementos de diferentes categorias de enfermagem do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP (HC-FMRPUSP) e relacioná-la com as atividades desenvolvidas pelas categorias nos diferentes serviços do Hospital (Clínico, Cirúrgico e Ambulatorial).

Os resultados mostraram importante participação do *S. aureus* entre o pessoal examinado, inde-

pendentemente das atribuições de cada grupo de categorias. Do mesmo modo, a prevalência de estafilococo entre os grupos, em todas as áreas anatômicas, se comportou de maneira semelhante, não evidenciando associação entre as variáveis. Por outro lado, a diferença de prevalência de portadores entre os serviços do hospital foi estatisticamente significativa, indicando que a presença do *S. aureus* está associada ao tipo de serviço em que o pessoal de enfermagem atua.

Com o objetivo de apreciar o possível papel epidemiológico desses portadores de *S. aureus* como fonte de infecção e o provável risco a que estão expostos em função das atividades desenvol-

1. Depto. de Enfermagem Geral e Especializada da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto - USP. - Campus de Ribeirão Preto - 14.049 - Ribeirão Preto - SP, Brasil.
2. Depto. de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

vidas nos diferentes serviços do hospital é que se buscou o reconhecimento da identidade das amostras isoladas através do espectro de resistência aos antibióticos (antibiograma) e da utilização de fagos (fagotipagem). Esse conhecimento contribuirá não só para a elucidação epidemiológica da problemática do portador são como também para a localização de eventuais focos de disseminação e definição de medidas efetivas para o controle.

MATERIAL E MÉTODO

Foram examinadas 499 amostras de *S. aureus* isoladas da cavidade nasal, orofaringe e mãos de 324 portadores são entre os elementos de enfermagem de diferentes categorias, frente à ação de alguns antibióticos e da fagotipagem.

Como no estudo anterior (8), os elementos de enfermagem foram agrupados em três grupos de categorias: A (Atendentes); B (Auxiliares e Técnicos de Enfermagem) e C (Enfermeiros, Enfermeiros-Chefes e Diretores de Serviço). Do mesmo modo, os diversos locais de trabalho foram agrupados em três Serviços do Hospital (Clínico, Cirúrgico e Ambulatorial), considerando-se o tipo de atendimento, de tratamentos e de rotinas instituídos em cada um.

O antibiograma foi realizado segundo técnica de Kirby-Bauer (3), recomendada pela Sociedade Brasileira de Microbiologia (7), frente à ação da Penicilina - 10U; Lincomicina - 2mcg; Eritromicina - 15 mcg; Tetraciclina - 30 mcg e Oxacilina - 5 mcg.

Com a finalidade de conhecer melhor a identidade das amostras isoladas constituiu-se, com as reações de resistência e sensibilidade frente aos antibióticos (sempre na seqüência de apresentação acima), um "modelo de resistência", a exemplo do empregado por outros pesquisadores. Cada modelo foi designado, portanto, pelo conjunto de cinco letras, combinação de R (resistente) e S (sensível) frente ao antibiótico.

A identidade através da fagotipagem foi obtida por meio de técnica recomendada (4), que se baseia em expor as amostras de *S. aureus* à ação de bacteriófagos. Utilizou-se os fagos do Conjunto Básico recomendados pelo "Sub Committee on Phage Typing of *S. aureus*" e os fagos experimentais em uso no Laboratório de Referência Nacional de Fagotipagem*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fato de não se ter evidenciado diferença de prevalência de portadores são de *S. aureus* entre os grupos de categorias estudados anteriormente (8) não invalida uma reflexão a respeito do cuidado direto como importante fonte de propagação de microrganismos. A ele é inerente uma proximidade física entre o executor e o receptor do cuidado, um tempo de permanência variável para a sua execução e, não raras vezes, um esforço físico por parte do prestador do mesmo, expondo ambos a determinados riscos de aquisição de microrganismos.

Pelo fato dos atendentes, auxiliares e técnicos de enfermagem (grupos A e B) rotineiramente se responsabilizarem pelas atividades manuais e instrumentais ligadas diretamente ao cuidado do paciente, em todos os serviços do hospital em estudo, surge o questionamento sobre uma possível diferença entre as amostras isoladas dos elementos pertencentes a esses grupos, no que se refere à patogenicidade e comunicabilidade, com as isoladas do grupo C (enfermeiros, enfermeiros-chefes e diretoras de serviço) que se responsabilizam pelas atividades de gerência das unidades.

Considerando que a cavidade nasal foi a área anatômica mais frequentemente positiva (8), o portador nasal se constituir em uma importante fonte de disseminação do estafilococo e as mãos serem um dos instrumentais mais utilizados pelo pessoal de enfermagem nas atividades por ele executadas, procurou-se inicialmente comparar os modelos de resistência aos antibióticos das amostras isoladas dessas áreas, por grupos de categorias (Tabelas 1, 2 e 3).

A análise da distribuição dos modelos de antibiograma das amostras mostrou um comportamento semelhante, caracterizado por cepas do tipo **extra-hospitalar** (com resistência a no máximo dois antibióticos) e uma possível tendência de modelos exibindo resistência a três ou mais antibióticos na cavidade nasal e mão esquerda e entre os elementos dos grupos A e B.

Esses achados reforçam as argumentações anteriores relacionadas ao **cuidado direto** como fonte de propagação e aquisição de microrganismos, inclusive o *S. aureus* devendo, portanto, merecer atenção especial quando da implementação de medidas preventivas e de controle das infecções hospitalares.

A análise da identidade das 403 (80,8%) amostras lisadas pelos fagos do Conjunto Básico e das 34 (6,8%) amostras fagotipadas pelos fagos experimentais 86, 88, 90, D11, Hk2 possibilitou o re-

* Laboratório de Fagotipagem de *Staphylococcus aureus*, junto ao Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP; Laboratório Oficial do Brasil

TABELA 1 - Distribuição dos modelos de antibiograma das 262 amostras da cavidade nasal dos elementos de enfermagem, por grupos de categorias.

Modelos de Antibiograma	Grupos de Categorias			Total
	A	B	C	
SSSSS	16	9	7	32
RSSSS	60	48	28	136
SRSSS	3	0	1	4
SSRSS	1	0	1	2
RRSSS	14	9	3	26
RSSRS	6	13	1	20
RSSRS	8	9	2	19
SRRSS	0	1	0	1
RSRSR	2	3	1	6
RSRRS	2	2	1	5
RRRSS	1	2	0	3
RRSRS	2	0	1	3
RRSSR	1	0	0	1
RRRRS	1	1	1	3
RRRSR	0	1	0	1
Total	117	98	47	262

S = Sensível
R = Resistente

TABELA 2 - Distribuição dos modelos de antibiograma das 73 amostras isoladas da mão direita dos elementos de enfermagem, por grupos de categorias.

Modelos de Antibiograma	Grupos de Categorias			Total
	A	B	C	
SSSSS	6	2	0	8
RSSSS	20	13	6	39
SRSSS	0	1	0	1
RSSRS	5	1	1	7
RRSSS	3	3	0	6
RSSSR	0	1	0	1
RSRSS	0	1	0	1
RSRSR	0	5	0	5
RRRSS	0	2	0	2
RSRRR	0	1	1	2
RRRSR	0	1	0	1
Total	34	31	8	73

S = Sensível
R = Resistente

TABELA 3 - Distribuição dos modelos de antibiograma das 92 amostras da mão esquerda dos elementos de enfermagem, por grupos de categorias.

Modelos de Antibiograma	Grupos de Categorias			Total
	A	B	C	
SSSSS	4	4	0	8
RSSSS	24	15	8	47
SRSSS	1	0	1	2
SSRSR	0	1	0	1
RRSSS	4	2	3	9
RSSRS	3	1	1	5
RSRSS	2	2	0	4
RSRSR	2	4	0	6
RSRRS	1	2	0	3
RRRSS	1	2	0	3
RRSRS	1	0	1	2
RRSSR	0	1	0	1
RRRRR	0	1	0	1
Total	43	35	14	92

S = Sensível
R = Resistente

conhecimento de 128 padrões bacteriofágicos diferentes.

Ainda que se tenha isolado uma variedade de fagótipos diferentes é conveniente considerar que apenas alguns têm sido responsáveis por graves infecções nos hospitais e por isso são classificados como epidêmicos hospitalares. Podemos destacar entre eles, as amostras lisadas pelo complexo "52, 52A, 80, 81" ou pelo "83A, 84, 85", caracterizadas epidemiologicamente pela capacidade de se espalharem (comunicabilidade), de produzirem doença franca (virulência) e de sobreviverem em ambiente hospitalar.

Dentre as amostras lisadas pelos fagos do Conjunto Básico, 54 (13,4%) o foram por esses "complexos". Dessas, 24 (44,4%) originaram-se dos elementos do grupo A, 23 (42,6%) dos elementos do grupo B e 7 (13,0%) dos do grupo C. Observando a distribuição dessas amostras por área anatômica, 29 (53,7%) foram isoladas da cavidade nasal, 11 (20,4%) da mão direita, 9 (16,7%) da mão esquerda. Em relação à procedência por serviços do hospital, 27 (50,0%) encontravam-se no Clínico, 17 (31,5%) no Cirúrgico e 10 (18,5%) no Ambulatorial.

De interesse atual, há também as cepas sensíveis aos fagos do complexo "94, 95 e 96" que têm apresentado algumas propriedades biológicas distintas, elevada resistência à penicilina e tetraciclina e relacionamento com vários surtos epidêmicos de infecção estafilocócica hospitalar. Habitualmente, sofrem lise pelo fago 94 ou pelo 96, isoladamente, ou por ambos, sendo em geral resistentes à lise por outros fagos do Conjunto Básico (2).

Das amostras fagotipadas, 78 (19,3%) foram lisadas por um ou mais desses fagos, associado (s) ou não a fagos de outros grupos. Dentre elas, 38 (48,7%) reagiram com os fagos 94 e/ou 95 e/ou 96, sendo que dessas, 28 (73,7%) exclusivamente com o fago 95.

Dentre os fagos experimentais o que mais identificou amostras foi o fago 89; classificou 50% das amostras lisadas pelo grupo e sua atuação se deu isoladamente.

Ressalta-se também, pela sua elevada frequência, as amostras com reação aos fagos do grupo II: 3A, 3C, 55, 71, as quais apresentam características próprias, colonizando habitualmente a pele, onde podem ser responsáveis por uma variedade de processos infecciosos cutâneos (1). Ainda que essas amostras tenham sido referidas usualmente como comunitárias, sua frequência entre aquelas encontradas como causa de infecções, tem aumentado em alguns hospitais. Foram encontradas 91 (22,6%) amostras lisadas por esse fagogrupo. Dessas, 26 (28,6%) foram isoladas de elementos de enfermagem que atuam nas unidades de Pediatria, Ginecologia, Obstetrícia e Berçários que, no hospital em estudo, se caracterizam pela proximidade de localização física e pelo relacionamento e intercâmbio no que diz respeito às especificidades e atividades de seus funcionários, sendo: 12 (46,2%) isoladas de elementos de enfermagem das enfermarias de Obstetrícia e Ginecologia, 8 (30,8%) de elementos das enfermarias de Pediatria, 5 (19,2%) do Berçário Normal e Prematuro e 1 (9,3%) do Berçário Patológico. Tais achados devem ser considerados como fonte potencial de eventuais epidemias de impetigo nos recém-nascidos do hospital, trazendo a preocupação da necessidade de erradicação dessas cepas dos portadores sãos.

Esses resultados fornecem subsídios acerca da distribuição das amostras consideradas de "identidade perigosa" (alta comunicabilidade, alta virulência e boa capacidade de sobreviver em ambiente hospitalar) entre os elementos de enfermagem. Nesse sentido, buscou-se, então, uma possível correspondência entre o fagótipo e a resistência à penicilina e a outros antibióticos através

TABELA 4 - Distribuição dos modelos de antibiograma das 62 amostras de *Staphylococcus Aureus* não tipáveis, por grupos de categorias.

Modelos de Antibiograma	Grupos de Categorias			Total
	A	B	C	
SSSSS	4	2	0	6
RSSSS	13	13	9	35
SRSSS	1	0	0	1
RRSSS	2	0	1	3
RSRSS	1	3	0	4
RSSRS	3	0	0	3
RSRSS	0	1	0	1
SRRSS	0	1	1	2
RRRSS	1	3	0	4
RSRRR	1	1	0	2
RSRRS	0	1	0	1
RRRRS				
Total	26	25	11	62

S = Sensível
R = Resistente

da correlação entre os resultados do antibiograma e da fagotipagem.

As amostras que apresentaram maiores índices de resistência aos antibióticos foram normalmente membros do grupo I e/ou III de fagótipos, destacando-se entre elas as do complexo "83A, 84, 85", com modelos de resistência a três ou mais antibióticos. Essas foram isoladas de três atendentes do denominado Serviço Clínico, sendo um das enfermarias de Neurologia e Dermatologia que albergava o *S. aureus* na cavidade nasal, com modelo de antibiograma RRRRS, um da Unidade de Moléstias Infecto-Contagiosas, com *S. aureus* de origem nasal (RSRRR) e na mão esquerda (RRRRR) e outro das enfermarias de Clínica Médica, com localização nasal (RSRRR) e mão esquerda (RSRRR).

No Serviço Cirúrgico, destacam-se um auxiliar de enfermagem do Centro de Terapia Intensiva que portava amostra do complexo "83A, 84, 85" na mão direita (RSRSR), outro das enfermarias de Clínica Cirúrgica, com amostra na cavidade nasal e modelo de resistência RSRRS e o atendente das enfermarias de Clínica Cirúrgica, com amostra na mão esquerda (RRRSS).

Até mesmo no Serviço Ambulatorial, foram localizados quatro elementos pertencentes ao grupo B, que estavam colonizados com estafilococo do referido complexo epidêmico-hospitalar: um portador nasal (RSRRS) e na mão direita (RSRRR); outro

portador da amostra na cavidade nasal (RSRSR); outro na mão direita (RSRSR) e outro portador na mão esquerda (RSRRS).

Em relação ao complexo "52, 52A, 80, 81", apenas um portador, uma enfermeira da Clínica de Neurologia e Dermatologia, apresentou amostra com resistência a três antibióticos (RSRRS), na cavidade nasal.

Do mesmo modo, apenas um portador, atendente do ambulatório, estava colonizado por amostras do complexo "94, 96" na cavidade nasal e mão esquerda, com modelo de antibiograma com resistência a três antibióticos (RSRRS).

Das amostras lisadas pelos fagos do grupo II, com frequência importante entre as unidades hospitalares, apenas uma apresentou resistência à penicilina, lincomicina e oxacilina; foi a isolada de um auxiliar de enfermagem, que prestava assistência direta às crianças internadas na Pediatria. Este mereceria ser submetido a um tratamento visando a erradicação da bactéria, uma vez que estafilococos sensíveis a fagos do grupo II e penicilinase - resistentes, podem ser agentes causais da Síndrome da Pele Escaldada Estafilocócica (S.S.S.S.) (5, 6).

Na tentativa de conhecer e definir a identidade das 62 (12,4%) amostras "não tipáveis" (N.T.) procurou-se observar seu comportamento frente aos antibióticos testados. A tabela 4 reflete que a maioria (85,5%) das amostras de *S. aureus* não tipáveis foi caracterizada por modelos de antibiograma com resistência a, no máximo, dois antibióticos. A reação de resistência a três ou mais antibióticos apareceu em apenas 9 (14,5%), oito dos quais estão entre os elementos dos grupos A e B. Esses resultados levam a admitir que as amostras N.T. da coleção se caracterizam por cepas do tipo extra-hospitalar.

AGRADECIMENTO

Agradecemos à MARLY DE CASTRO, técnica do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, pela colaboração durante a realização dos métodos laboratoriais.

SUMMARY

Staphylococcus aureus among healthy carries working in different nursing categories at HC - FMRPUSP: phagotypes and resistance to antibiotics.

A total of 499 *Staphylococcus aureus* strains isolated from the nasal cavity, oropharynx and hands of 324 healthy carriers working in different nursing categories at HC-FMRPUSP were identified by the action of different antibiotics and by phagotyping. Most strains were characterized by antibiograms with resistance to a maximum of two antibiotics. Models of reaction to three or more showed a possible tendency to occur in the left hand and were concentrated among nursing workers of groups A and B. Of the strains that could be phagotyped, 54 (13,4%) were lysed by the epidemic-hospital complexes "52, 52A, 80, 81" and "83A, 84, 85"; 78 (19,3%) by one more phages of the "94, 96" complex associated or not with phages from other groups, and 91 (22,6%) by phages of the "3A, 3C, 55, 71" complex. Joint analysis of the antibiogram and phagotyping data revealed correspondence between phagotype and resistance to antibiotics, as well as the detection of carriers with "epidemic-hospital" strains.

Key words: *Staphylococcus aureus*, phagotyping, antibiotic resistance, healthy carriers, nursing.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Albert, S. et alii - Bullows impetigo due to group II *Staphylococcus aureus*. An epidemic in a normal newborn nursery. *Am.J.Dis.Chil.*, 120:10-3, 1970.
2. Asheshov, E.H. et alii - Properties of strains of *Staphylococcus aureus* in the 94, 96 complex. *J.Med.Microbiol.*, 10:171-78, 1977.
3. Bauer, A. W. et alii - Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am.J.Clin.Path.*, 45:493-96, 1966.
4. Blair, J.E. & Williams, M.D. - Phage typing of *Staphylococci*. *Bull.Wordl Hlth. Org.*, 24: 771-84, 1961.
5. Dajani, A.S. - The Scalded - skin syndrome: relation to phage - group II staphylococci. *J.Infect.Dis.*, 125: 548-51, 1972.
6. Melish, M.E. et alii - The staphylococcal epidermolytic toxin: its isolation, characterization and site of action. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 236: 317-42, 1974.
7. Montelli, A.C. - Projeto COBA: Análise preliminar de resultados. Informação técnico-científico - Série diagnóstico. São Paulo. Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1981. 13p.
8. Oliveira Santos, B.M. & Uthida Tanaka, A.M. - Prevalência de portadores sãos de *Staphylococcus aureus* em pessoal de diferentes categorias de enfermagem de um hospital geral escola. *Medicina*, Ribeirão Preto, 22: 11-18, 1989.

Recebido para publicação em 04/05/90.

COLONIZAÇÃO SIMULTÂNEA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* NA CAVIDADE NASAL E MÃOS DE PORTADORES SÃOS DE UM HOSPITAL-ESCOLA

Branca Maria de Oliveira Santos¹
Olga Maimoni Aguillar¹
Maura Santesso Takakura¹

RESUMO

Ao se pretender estabelecer as vias de propagação de *Staphylococcus aureus* a partir de uma fonte de colonização já reconhecida, a cavidade nasal, procurou-se observar o comportamento dessa colonização simultaneamente com a das mãos em portadores sãos entre pessoas de diferentes categorias de enfermagem de um hospital geral escola. A análise dessa associação simultânea foi feita sob o critério do antibiograma e da fagotipagem. Os resultados mostraram uma maior porcentagem de elementos de enfermagem dextros e com positividade para o *S. aureus* com idêntico fagótipo na cavidade nasal e mãos (direita e/ou esquerda), sugerindo que a colonização foi feita pela mesma cepa de *S. aureus*, provavelmente de origem nasal. O isolamento de cepas na(s) mão(s) diferente(s) daquela(s) da cavidade nasal, levou a se considerar a possibilidade de aquisição a partir de fonte externa.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, colonização nasal e mãos.

INTRODUÇÃO

Em trabalho anterior procurou-se estabelecer a identidade de 499 amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas da cavidade nasal, orofaringe e mãos de 324 portadores sãos em pessoal de diversas categorias de enfermagem de um hospital-escola (Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP), por meio do antibiograma e da fagotipagem, relacionando os dados obtidos com as atividades desenvolvidas pelas categorias nos diferentes serviços do hospital (14).

O conjunto dos dados mostrou uma positividade significativamente maior na cavidade nasal (52,5%) área anatômica já reconhecida como a mais importante fonte de *S. aureus* (9, 11, 12) e a mais frequentemente positiva entre os portadores dessa bactéria (13,17,19). Convém ressaltar que o

fato de ser o *S. aureus* um dos melhores exemplos de microrganismo patogênico de virulência multifatorial, capaz de produzir infecções graves, quer como agente etiológico primário, quer secundário, a sua localização na cavidade nasal entre o pessoal atuante em ambiente hospitalar tem preocupado vários estudiosos. Essa preocupação se fundamenta no fato de que, rotineiramente, nenhuma proteção adequada, como medida de controle na propagação de microrganismos, costuma ser aplicada na prática, bem como a função respiratória não pode ser interrompida.

O isolamento de 165 (33,1%) amostras das mãos, direita e esquerda, (14) também chamou a atenção para a possibilidade de propagação da bactéria de um paciente infectado para outro susceptível (1,6,18), do prestador dos cuidados rotineiros de enfermagem para o paciente, bem como

1. Departamento de Enfermagem Geral e Especializada da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto - USP - Campus de Ribeirão Preto 14049 - Ribeirão Preto - SP.

deste para aquele (5, 10, 18). Essa preocupação encontra respaldo no fato das mãos serem um dos instrumentais mais utilizados pelo pessoal de enfermagem em muitas das atividades executadas, principalmente nas que requerem um contato direto com os pacientes. Além disso, são consideradas uma importante área para obtenção de amostras ambientais e refletem exposição a vários microrganismos (4, 5, 16).

Outro aspecto a se considerar é a possibilidade da contaminação manual no transporte do agente para outras portas de entrada. Os estudos de Noble et alii (11) e Polakoff et alii (15), além de mostrarem a alta porcentagem de portadores sãos de *S. aureus* nas mãos, possibilitaram ainda, através da fagotipagem, a indicação de que a maioria desses era de origem nasal, demonstrando uma possível relação entre as amostras isoladas da cavidade nasal e das mãos, de um mesmo indivíduo.

A conjugação dos resultados do antibiograma e da fagotipagem do estudo anterior (14) revelou a correspondência entre fatótipo e resistência aos antibióticos e a detecção de alguns portadores com amostras "epidêmicas hospitalares", nas diferentes áreas anatômicas e serviços do hospital. O conjunto desses dados despertou o interesse em conhecer o comportamento da colonização simultânea por *S. aureus* na cavidade nasal e mãos entre os portadores sãos estudados, considerando o fato da cavidade nasal ser uma importante fonte de *S. aureus* e o emprego das mãos pelos elementos de enfermagem ser habitual, quando da prestação de cuidados ao paciente.

MATERIAL E MÉTODO

Os 324 elementos de enfermagem do estudo foram reunidos em 3 grupos de categorias, assim representados:

Grupo A...Atendentes

Grupo B...Auxiliares e Técnicos de Enfermagem

Grupo C...Enfermeiros, Enfermeiros-Chefes e Diretoras de Serviço, considerando o conjunto de atividades e responsabilidades pertinentes a cada categoria, segundo o Regimento da Divisão de Enfermagem do hospital em estudo (7).

O reconhecimento da identidade individual das amostras de *S. aureus* isoladas por meio do antibiograma, segundo técnica de Kirby-Bauer (2), recomendada pela Sociedade Brasileira de Microbiologia (8), frente à ação da Penicilina-10U, Lincomicina-2mcg, Eritromicina-15mcg, Tetraciclina-30mcg e Oxacilina-5mcg foi designado por um "modelo", combinação de R (resistente) e S

(sensível) frente a cada antibiótico.

A análise da identidade individual das amostras isoladas por meio da fagotipagem foi realizada segundo técnica recomendada por Blair & Williams (3) e adotada no Laboratório de Fagotipagem de *Staphylococcus aureus* da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao se pretender estabelecer as vias de propagação de *S. aureus* a partir de uma fonte de colonização já reconhecida, a cavidade nasal, procurou-se observar o comportamento dessa colonização simultaneamente com a das mãos, fundamentando-se nos resultados obtidos por outros autores (11, 15) que demonstraram uma possível relação entre as amostras isoladas dessas áreas, em um mesmo indivíduo.

Não se pode também perder de vista a possibilidade da contaminação manual no transporte do agente para outras portas de entrada. Diante disso, as mãos do pessoal de enfermagem, quando do desempenho de muitas atividades, podem representar um dos mais importantes meios de propagação de bactérias de um paciente infectado para outro susceptível, de um paciente infectado para o prestador dos cuidados, como também do prestador dos cuidados para o paciente susceptível. Essas considerações levaram à reflexão e ao questionamento sobre:

- as amostras isoladas da mão direita são diferentes das da mão esquerda?

- as amostras da mão direita e/ou esquerda são iguais ou diferentes das da cavidade nasal?

Assim sendo, há de se considerar o fato de o prestador dos cuidados ser dextro ou sinistro. Isso porque, habitualmente, na execução do cuidado, o prestador dextromanual, geralmente destina a mão direita à apreensão do material necessário à execução do cuidado ou tratamento e a esquerda para expor determinada região anatômica, para apoiar o paciente, para fixar uma determinada região, caracterizando assim um contato direto com o receptor do mesmo. O inverso é verdadeiro para os indivíduos que demonstram preferência pela utilização da mão esquerda (sinistromanual).

Dos 324 elementos de enfermagem com resultado positivo para o *S. aureus*, 306(94,4%) eram dextros e apenas 18(5,6%) se identificaram como sinistros.

Procurou-se então observar o comportamento da positividade na cavidade nasal associada à positividade em uma ou duas mãos, nos indivíduos dextromanuais.

Dos 306 elementos de enfermagem que se identificaram como dextros, 125 (40,8%) apresentaram positividade ao *S. aureus*, em uma ou nas duas mãos.

A Tabela 1 permite verificar que desses, 55 (44,0%) apresentaram positividade somente na mão esquerda, 40(32,0%) só na direita e 30(24,0%) em ambas as mãos, mostrando uma tendência à maior positividade da mão esquerda, entre os elementos dextros.

Ao se confrontar a simultaneidade de positividade na cavidade nasal e mãos (direita e/ou esquerda), observou-se que a proporção de indivíduos que apresentaram positividade simultânea nas áreas envolvidas foi maior nos três grupos, totalizando 94 (75,2%) daqueles com positividade nas mãos. Esses dados vem reforçar o considerado na literatura de que o portador nasal é quase sempre portador também nas mãos.

Retomando as argumentações anteriores quanto a importância da cavidade nasal como fonte reconhecida de colonização do *S. aureus*, a possibilidade de propagação de microrganismos pelas mãos do pessoal de enfermagem e o uso habitual que ele faz das mãos quando da prestação de cuidados aos pacientes, restaria agora, conhecer as identidades das amostras isoladas através do antibiograma e da fagotipagem, o que permitiria encontrar respostas às questões levantadas anteriormente.

O pequeno número de elementos (8) sinistro-manuais e que apresentou positividade ao *S. aureus* na cavidade nasal e mãos, não permitiu a análise da simultaneidade de amostras.

Correlação entre as amostras de *S. aureus* simultaneamente isoladas de um mesmo indivíduo, sob o critério do antibiograma.

Utilizou-se os resultados dos antibiogramas, das amostras da cavidade nasal e mão direita e/ou esquerda dos indivíduos dextros, como critério para reconhecimento da igualdade de duas ou mais cepas de um mesmo portador.

A análise da figura nº 1 demonstra que entre os 26 elementos de enfermagem que apresentaram positividade ao *S. aureus* na cavidade nasal e mão

Figura 1 — Distribuição do pessoal de enfermagem dextro, com amostras de *Staphylococcus aureus* simultâneas de cavidade nasal e mão direita, por grupos de categorias, quanto aos modelos de antibiograma.

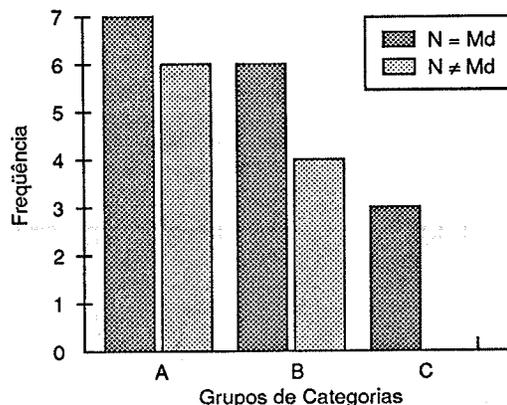


TABELA 1 - Distribuição do pessoal de enfermagem dextromanual com positividade para o *Staphylococcus aureus* na mão direita e/ou esquerda, associada à cavidade nasal, por grupos de categorias.

Grupos de Categorias	Positividade para o <i>Staphylococcus aureus</i>					
	Mão direita		Mão esquerda		+	Mão esquerda
	N+	N-	N+	N-		
	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)
A	13 (65,0)	7 (35,0)	20 (80,0)	5 (20,0)	12 (80,0)	3 (20,0)
B	10 (58,8)	7 (41,2)	18 (78,3)	5 (21,7)	9 (81,8)	2 (18,2)
C	3 (100,0)	0 -	5 (71,4)	2 (28,6)	4 (100,0)	0 -
Total	26 (65,0)	14 (35,0)	43 (78,2)	12 (21,8)	25 (83,3)	5 (16,7)

N+ = Cavidade nasal positiva para o *S. aureus*

N- = Cavidade nasal negativa para o *S. aureus*

Figura 2 — Distribuição do pessoal de enfermagem dextro, com amostras de *Staphylococcus aureus* simultâneas de cavidade nasal e mão esquerda, por grupos de categorias, quanto aos modelos de antibiograma.

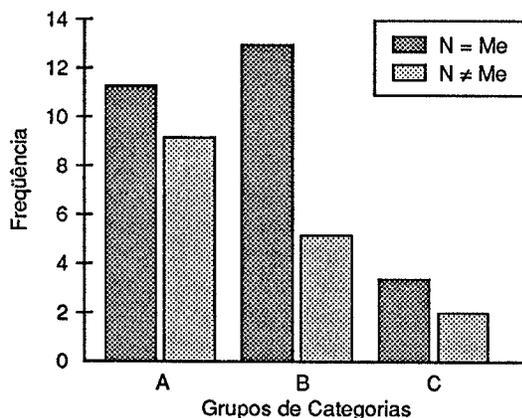
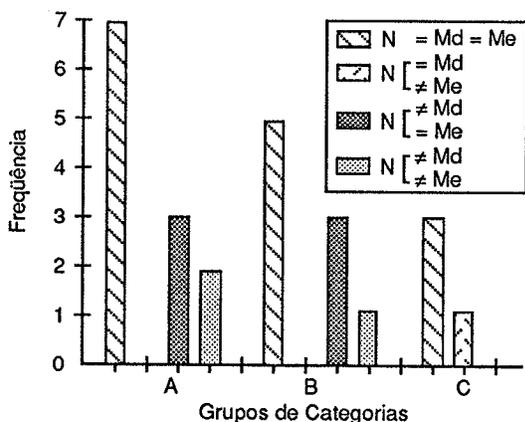


Figura 3 — Distribuição do pessoal de enfermagem dextro, com amostras de *Staphylococcus aureus* simultâneas de cavidade nasal, mão direita e mão esquerda, por grupos de categorias, quanto aos modelos de antibiograma.



direita, 16(61,5%), distribuídos nos três grupos de categorias, onde 7 no grupo A (atendentes), 6 no grupo B (auxiliares e técnicos de enfermagem) e 3 no grupo C (enfermeiros, enfermeiros-chefes e diretoras de serviço), tiveram o mesmo modelo de antibiograma nas amostras da cavidade nasal e mão direita. Os outros 10 elementos (38,5%) apresentaram modelos distintos para cada área amostrada dos quais esteve ausente o grupo C.

A figura nº 2, refere-se aos resultados das amostras simultâneas da cavidade nasal e mão esquerda, entre os 43 elementos de enfermagem dextros. Desses, 16(37,2%) apresentaram modelos de

antibiograma diferentes entre as áreas estudadas. Em 27(62,8%) houve concordância de modelos para a cavidade nasal e mão direita, entre os elementos dos grupos de categorias, A,B e C.

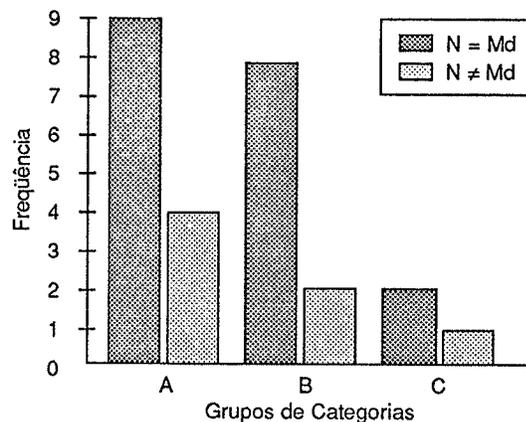
Pela figura nº 3, verifica-se que 15 (60,0%) dos 25 elementos de enfermagem, distribuídos pelas categorias A,B e C, com isolamento simultâneo na cavidade nasal e mãos, direita e esquerda, exibiram o mesmo modelo de antibiograma. Em outros 6 elementos, das categorias A e B, os modelos foram diferentes para a cavidade nasal e mão direita enquanto que o modelo da mão esquerda concordou com o da narina. Apenas 1 (um) apresentou modelos iguais para amostras da cavidade nasal e mão direita. Com modelos diferentes para cada uma das áreas estudadas, tivemos 3 (três) casos dentro dos grupos A e B.

Fagotipagem como critério de correlação entre amostras de *S. aureus* simultaneamente isoladas de um mesmo indivíduo.

A análise da identidade das amostras simultaneamente isoladas da cavidade nasal e mão direita e/ou esquerda de um mesmo indivíduo por meio da fagotipagem, encontra-se nas figuras 4,5 e 6.

Na figura nº 4 observa-se que de 26 elementos de enfermagem com positividade para a cavidade nasal e mão direita, 19(73,1%) tiveram idêntico fagótipo nas duas áreas; portanto, a colonização foi feita pela mesma cepa de *S. aureus*, provavelmente de fonte nasal. A distribuição pelos grupos de categorias foi: 9(47,4%) casos no grupo A (aten-

Figura 4 — Distribuição do pessoal de enfermagem dextro, por grupos de categorias, quanto aos fagótipos das amostras simultâneas de cavidade nasal e mão direita.



dentos), 8(42,1%) no grupo B (auxiliares e técnicos de enfermagem) e 2(10,5%) no grupo C (enfermeiros, enfermeiros-chefes e diretoras de serviço). Em 7 indivíduos (26,9%) não houve concordância entre os fagótipos das amostras simultâneas da cavidade nasal e mão direita.

A figura nº 5 refere-se à distribuição de fagótipos idênticos ou não das amostras simultaneamente isoladas da cavidade nasal e mão esquerda (negativas na mão direita) dos 43 indivíduos dextros, dos quais 31(72,1%) tiveram concordância e 12 (27,9%) discordância de fagótipos.

Entre os 25 elementos que apresentaram positividade ao *S. aureus* na cavidade nasal, mão direita e mão esquerda (figura 6), 14(56,0%) apresentaram fagótipos idênticos nas três áreas anatômicas, o que

está de acordo com os dados de literatura (11) sobre a colonização em mais de uma área anatômica, em um mesmo indivíduo, por um único fagótipo de *S. aureus*. Apenas um elemento apresentou o mesmo fagótipo colonizando a cavidade nasal e mão direita com fagótipo diferente na mão esquerda e dois elementos apresentaram fagótipos idênticos na cavidade nasal e mão esquerda com amostra da mão direita de tipo fágico diferente. Em 8 indivíduos as amostras das três áreas anatômicas, simultaneamente, foram cada uma diferente das demais.

Esses resultados demonstraram que, habitualmente, amostras simultâneas de um mesmo indivíduo são idênticas e a colonização deve ter se originado da cavidade nasal. Por outro lado, em alguns elementos, os *S. aureus* isolados das mãos diferiram daqueles da cavidade nasal, o que leva à consideração da possibilidade de aquisição dos mesmos a partir de uma fonte externa, quando da prestação do cuidado ao paciente ou do contato com materiais e equipamentos. Ressalta-se ainda que o isolamento de cepas diferentes nas áreas anatômicas foi observado, na sua maioria, entre os elementos de enfermagem dos grupos A e B, responsáveis pelas atividades técnicas de cuidado ao paciente.

Diante dos resultados obtidos mostrando uma maior porcentagem de elementos de enfermagem dextros e com positividade para o *S. aureus* na cavidade nasal e mãos (direita e/ou esquerda) com idêntico fagótipo sugerindo que a colonização foi feita pela mesma cepa de *S. aureus* (provavelmente de origem nasal) o isolamento de cepas na(s), mão(s), diferente(s) daquela(s) da cavidade nasal, leva a considerar a possibilidade de aquisição a partir de uma fonte externa.

Essa situação, aliada à especificidade e complexidade de um hospital-escola e às características das cepas identificadas entre os elementos de enfermagem das diferentes categorias, parece evidenciar a necessidade e a importância de se buscar caminhos alternativos para a sensibilização de todos os que estão envolvidos diretamente com a assistência ao paciente. Em especial o pessoal do Serviço de Enfermagem, responsável pelo maior volume de ações na assistência prestado ao paciente. Nesse sentido, o estudo mostrou também a necessidade de se considerar a categoria de pessoal de enfermagem, quando se leva em conta o risco de aquisição e propagação de microrganismos, como o *S. aureus*.

Figura 5 — Distribuição do pessoal de enfermagem dextro, por grupos de categorias, quanto aos fagótipos das amostras simultâneas de cavidade nasal e mão esquerda.

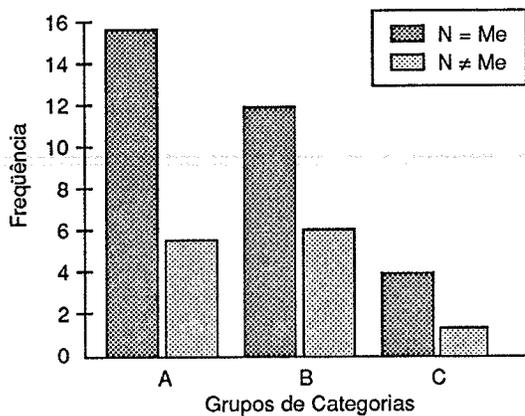
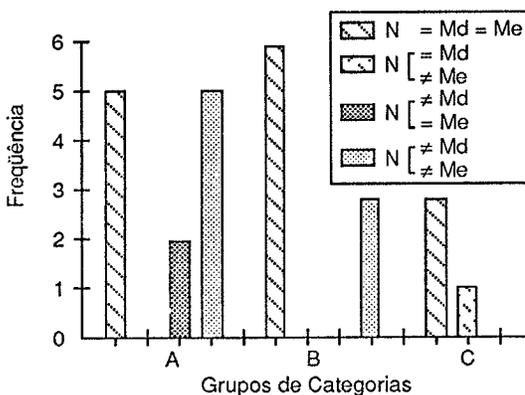


Figura 6 — Distribuição do pessoal de enfermagem dextro, por grupos de categorias, quanto aos fagótipos das amostras simultâneas de cavidade nasal e mão direita e mão esquerda.



SUMMARY

Behavior of *Staphylococcus aureus*

strains from simultaneous areas of healthy carriers working in different nursing category in a general teaching hospital.

With the objective of determining the propagation of *Staphylococcus aureus* from a recognized source of colonization, the nasal cavity, the behavior of this colonization was observed simultaneously with that of the hands in healthy carriers working in different nursing categories in a general teaching hospital. Analysis of this simultaneous association was done using antibiograms and phagotyping as criteria. The results showed a higher percentage of right-handed nursing workers with positivity for *S. aureus* in the nasal cavity and hands (right and/or left) with identical phagotypes in the anatomical areas, suggesting that the areas were colonized by the same *S. aureus* strain, probably of nasal origin. The isolation of strains from the hand(s) differing from that (those) from the nasal cavity led us to consider the possibility of acquisition from external source.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adams, B.C. & Marris, T.J. Hand carriage of aerobic gram-negative rods may not be transient. *J.Hyg.*, **89**: 36-46, 1982.
2. Bauer, A.W. et alii - Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J.Clin.Path.*, **45**: 493-96, 1966.
3. Blair, J.E. & Williams, M.D. - Phage typing of staphylococci. *Bull.Worl Hlth. Org.*, **24**: 771-84, 1961.
4. Bruun, J. & Solberg, C.D. Hand carriage of gram-negative bacilli and *Staphylococcus aureus*. *Brit. Med.J.* **2**: 580-2, 1973.
5. Dineen, P - The exchange of skin bacteria between patients hand hospital personnel. *Surg.Gynec.Obstet.*, **125**: 979-82, 1967.
6. Knittle, M.A. et alii - Role of hand contamination of the perssnnel in the epidemiology of gram-negative nasocomial infections. *J.Pediat.*, **86**: 433-37, 1975.
7. MANUAL DA DIVISÃO DE ENFERMAGEM. Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, 1985.
8. Monteli, A.C. - Projeto COBA: Análise preliminar de resultados. Informação técnico-científico - Série diagnóstico. São Paulo, Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1981. 13p.
9. Montes, L.F. & Wilborn, W.H. Anatomical location of normal skin flora. *Arch. Derm.*, **101**: 145-59, 1970.
10. Mortimer, E.A. et alii - Transmission of staphylococci between newborns: importance of the hands of personnel. *Am.J.Dis.Child.* **104**: 289-95, 1962.
11. Noble, W.C. et alii - Carriage of *Staphylococcus aureus* in random samples of a normal population. *J.Hyg.*, **65**: 567-73, 1967.
12. Noble, W.C. & Somerville, D.A. Micrococcaeae as pathogens. In: Microbiology of human skin. London, W.B. Saunders Company, 1974. p. 144-59.
13. Oliveira Santos, B.M. Prevalência de portadores são de *Staphylococcus aureus* em pessoal de diferentes categorias de enfermagem de um hospital geral escola. Ribeirão Preto, USP, 1987. 201 p.
14. Oliveira Santos, B.M. & Uthida Tanaka, A.M. *Staphylococcus aureus* em portadores são de diferentes categorias de enfermagem do H.C.F.M.R.P. - USP: fagótipos e resitências a antibióticos. Trabalho apresentado no XV Congresso Brasileiro de Microbiologia da Sociedade Brasileira de Microbiologia, realizado em Ribeirão Preto de 16 a 20 de julho de 1989.
15. Polakoff, S. et alii - Nasal and skin carriage of *Staphylococcus aureus* by patients undergoing surgical operation. *J.Hyg.*, **65**: 559-66, 1967.
16. Solé Vernin, C. & Uthida Tanaka, A.M. A prova de Moore conjugada ao antibiograma na identificação das amostras não hospitalares de *Staphylococcus aureus*. *O Hospital*, **75**: 2043-86, 1969.
17. Uthida Tanaka, A.M. Prevalência do *Staphylococcus aureus* em áreas de pele de indivíduos sem afecção cutânea piogênica. Ribeirão Preto. Tese de doutoramento. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1967, 58p.
18. Weinstein, R.A. Multiply resistant strains: epidemiology and control. In: Bennett, J.V. et alii - *Hospital infections*. Boston, Broun Little e Co. 1986. p. 151-69.
19. Williams, R.E.O. - Healthy carriage of *Staphylococcus aureus* its prevalence and importance. *Bact.Rev.*, **27**: 56-71, 1963.

Recebido para publicação em 04/05/90

ENTEROTOXIGENICIDADE DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, ISOLADOS DE VACAS COM MASTITE

Maria do Amparo Queiroz de Freitas¹
Helena Magalhães²

RESUMO

A prevalência da mastite subclínica foi de 48%, através da reação leucocitária pela prova do "California Mastitis Test" (CMT) em 2.317 vacas em lactação de 86 produtores de uma bacia leiteira no Estado do Rio de Janeiro. Do total de 2.725 lactoculturas, provenientes de 692 vacas, 1.026 (37,65%) apresentaram CMT positivos e 546 (53,22%) foram exame bacteriológico positivo. O *Staphylococcus aureus* foi o agente mais encontrado, sendo isolado de 229 (41,94%) amostras de leite em todos os rebanhos trabalhados. A possibilidade de contaminação de produtos de origem láctea, por *S. aureus* e sua enterotoxina induziu a pesquisa da mesma em algumas amostras desse agente. As cepas de *S. aureus* isoladas de tetas com forte reação leucocitária, evidenciada através do CMT, foram semeadas em caldo cérebro coração com glicerina em partes iguais e mantidas no "freezer" a menos 16°C. A termonuclease foi determinada pelo método de Lachica et al. (1971). A pesquisa de enterotoxina dos tipos A, B, C, D e E foi feita pela técnica utilizada por Robbins et al. (1974) no Instituto de Microbiologia da UFRJ. Em 93 cepas de *S. aureus* analisadas apenas uma produziu enterotoxina do biotipo A, considerada a de maior ocorrência nas intoxicações alimentares, sendo encontrada em 75% dos surtos. Em oito cepas não foi detectada a presença de nucleína termoestável. Mesmo tendo sido baixo o número de cepas enterotoxigênicas, acredita-se que sejam necessários cuidados com o rebanho leiteiro, evitando-se misturar o leite de fêmeas infectadas aos de animais sadios. Tal procedimento constitui uma ameaça à saúde humana, uma vez que o *S. aureus* é evidenciado em índice elevado na maioria dos rebanhos.

Palavras-chaves: *Staphylococcus aureus*, bovino, leite, toxina.

INTRODUÇÃO

O *Staphylococcus aureus* é um dos maiores causadores de mastite bovina, com índice elevado de infecção no rebanho leiteiro bovino nacional (3,4,6,11,12,13). Por este motivo, existe a possibilidade de contaminação de produtos de origem

láctea pelo microrganismo ou pela enterotoxina estafilocócica, antes ou após serem processados. Enquanto as células de *S. aureus* são termolábeis e facilmente eliminadas por processos moderados de temperatura, as enterotoxinas são termoestáveis, resistentes a temperaturas normalmente utilizadas no processamento de produtos lácteos. A entero-

1 Méd. Vet. do Ministério da Agricultura/Pesagro-Rio. Lab. de Biol. Animal. - Alameda São Boaventura, 770 -
Fonseca - Niterói - RJ - Cep 24.123.
2 Méd. Vet., Pesquisador Pesagro-Rio. Lab. Biol. Animal.

toxina estafilocócica pode causar intoxicações por alimentos de origem láctea, induzindo a uma gastroenterite aguda quando ingerida, manifestando-se sob a forma de surto. Com relação a cepas de *S. aureus* isoladas de leite e produtoras de enterotoxina os percentuais são muito variáveis em relação a número de isolamentos e tipo de toxina (1,2,5,8,14,15).

Considerando que em nosso meio são poucos os trabalhos a respeito (2,5), planejou-se a realização dessa pesquisa com a finalidade de verificar a capacidade enterotoxigênica de algumas cepas de *S. aureus* isoladas de leite de vacas com mastite, na bacia leiteira do município de Cantagalo/RJ.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado em 2.317 vacas em lactação pertencentes a 86 rebanhos produtores de leite tipo C, do município de Cantagalo, RJ, sendo realizado exame bacteriológico em 692 vacas. A mastite subclínica foi evidenciada através do "California Mastitis Test" (CMT) (17) e exame bacteriológico no leite de aparência normal. Após higiene adequada do úbere, feita com álcool a 70% e papel toalha, foi realizada a prova do CMT com os primeiros jatos de leite. A seguir o leite foi coletado para exame bacteriológico em tubos estéreis com tampa de rosca, um para cada teta, independente do resultado do CMT. O material foi transportado sob refrigeração até o laboratório, onde foi incubado a 37°C. Após 18 horas foi plaquado com auxílio de alça de platina em ágar sangue de carneiro e incubado em estufa a 37°C por 24 horas. A seleção de colônias de *Staphylococcus* obedeceu aos critérios de morfologia, pigmentação e capacidade hemolítica. Das colônias isoladas foram preparados esfregaços corados pelo método de Gram para verificação da morfologia e coloração. As colônias que se revelassem como cocos Gram positivos, em cachos, eram submetidas ao teste de coagulase em tubo, com plasma de coelho citratado. Foi considerada da espécie *S. aureus* quando houve produção de coagulase pela cepa, em estufa a 37°C até 24 horas.

Foram selecionadas 93 cepas de estafilococos coagulase positiva, isoladas de leite de tetas com reação leucocitária forte, através do CMT (mais de cinco milhões de leucócitos por mililitro de leite), distribuídas pelos 86 rebanhos.

Essas cepas foram semeadas em caldo cérebro coração com glicerina em partes iguais e incubadas a 37°C. Após 24 horas de crescimento as culturas

foram mantidas a menos 16°C e encaminhadas ao Instituto de Microbiologia da UFRJ para os testes de termonuclease e capacidade enterotoxigênica. A termonuclease foi determinada pelo método de Lachica et al. (9) e para a verificação da presença de enterotoxina dos tipos A,B,C,D e E utilizou-se a técnica descrita por Robbins et al. (16).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos em relação à ocorrência de mastite subclínica nos 86 rebanhos estão apresentados na Tabela 1. Verificou-se que das 692 vacas analisadas, 341 (49,28%) foram positivas ao teste de CMT, sendo esse o índice de mastite subclínica encontrado no presente trabalho.

Quando comparado com valores obtidos por Langenegger et al. (10) no Rio de Janeiro; Harrop et al. (7) em Pernambuco; Ferreira et al. (4) em Minas Gerais; Nader et al. (11,12,13) em São Paulo, respectivamente, 20%; 39%; 16%; 11,9%; 20,8% e 11,9% com os desse trabalho, 49,2% observa-se que a prevalência foi mais elevada. Este fato pode ser atribuído à falta de adoção de medidas profiláticas importantes no controle da mastite.

Na Tabela 2 estão distribuídas as amostras de leite examinadas pelo teste de CMT, considerando-se que 43 estavam sem secreção (atrofiadas).

TABELA 1 - Distribuição das fêmeas preagentes e negativas à prova do CMT e das tetas perdidas, segundo os rebanhos estudados no município de Cantagalo/RJ. 1986.

Rebanhos CMT	Positivo		Negativo		Total
	Nº	%	Nº	%	
86	341	49,28	351	50,72	692

TABELA 2 - Distribuição de amostras positivas e negativas ao CMT e das tetas perdidas, segundo os rebanhos estudados no município de Cantagalo/RJ. 1986.

Amostras	Nº	%
Examinadas	2725	98,44
Positivo		
CMT	1026	37,06
Negativo	1699	61,38
Perdidas	43	1,55
Total	2768	100,00

TABELA 3 - Distribuição das amostras positivas ao exame bacteriológico, isolamento de cepas de *S. aureus* selecionados para os testes de nucleína termoestável e produção de enteroxinas.

Amostras	CMT		Exame bacteriológico		Isolamento de <i>S. aureus</i>		Cepas de <i>S. aureus</i> selecionados			
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nucleína termoestável		Enteroxina	
							Nº	%	Nº	%
Positivas	1026	37,65	546	53,22	229	41,94	85	91,40	1**	1,07
Negativas	1699	62,35	480	46,78	317*	58,05	8	8,60	92	98,92
Total	2725	100,00	100,00	100,00	546	100,00	93	100,00	100,00	100,00

*isolamento de outros microorganismos

**enteroxina biotipo A

Na Tabela 3 verifica-se que das 1.026 amostras positivas para o CMT, 546 foram positivas para o exame bacteriológico, sendo isolado *S. aureus* de 229 (41,94%). Das 93 cepas de *S. aureus* selecionadas detectou-se a presença de nucleína termoestável em 85 e em apenas uma se constatou a presença de uma enterotoxina do tipo A.

A produção da enzima termonuclease é um bom indicador de patogenicidade e em 100% das culturas que apresentem duas ou mais reações de coagulase positivas são nucleases termoestáveis positivas (Rea et al. (15), porém nesse trabalho só foi considerada uma reação de coagulase positiva e o teste da termonuclease foi realizado somente nas 93 cepas selecionadas.

Os resultados desse trabalho coincidem com os de Rea et al. (15), onde a amostra que produziu enterotoxina também produziu termonuclease. Contudo um grande número de amostras positivas para nucleína termoestável não foram enterotoxigênicas.

A baixa positividade para cepas de *S. aureus* enterotoxigênicas isoladas de leite, verificadas nesta pesquisa, está de acordo com o que foi observado em São Paulo por Araújo (2) e Furlanetto et al. (5). O primeiro autor em 1984, analisando 100 amostras de leite cru, verificou que 50% revelaram-se positivas para *S. aureus*, porém das 201 cepas isoladas apenas uma (0,5%) foi produtora de enterotoxina do tipo B. Furlanetto et al. (5) em 1987, observaram nas 468 fêmeas analisadas, 56 (11,94%) reagentes ao CMT. Das fêmeas reagentes, 25 (44,6%) revelaram-se positivas para *S. aureus*. Em duas (8,0%) foi constatada a produção de enterotoxinas dos tipos AE, concomitantemente. Entre os vários agentes etiológicos causadores de mastite, o *S. aureus* nesse trabalho e no dos autores referenciados foi o agente mais isolado. Este microrganismo foi, também, o mais isolado por Langenegger et al. (10) 53,1%, no Rio de Janeiro; Harrop et al.

(7) 54,2%, em Pernambuco; Ferreiro et al. (4), em Minas Gerais e em São Paulo, por Nader Filho et al. (11) 52,08%; Nader Filho et al. (12) 38% e Nader Filho et al. (13) 62,10%.

O percentual de cepas de *S. aureus* enterotoxigênicas isoladas de leite com mastite, citado por autores de outros países é mais elevado. Adekeye (1), na Nigéria, fez uma pesquisa em 50 cepas de *S. aureus* isoladas de vacas com mastite e encontrou 6 (12%), entre as quais 4 produziram enterotoxina do tipo A e 2 do tipo B. Rea et al. (15), na Irlanda, assinalam o *S. aureus* como causador de 75% das infecções mastíticas no rebanho leiteiro. Os autores selecionaram, de 400 cepas de *S. aureus*, 238 para pesquisa de enterotoxina. Encontraram 22 cepas produtoras de enterotoxina do tipo C, duas do tipo D, uma do tipo B e em uma os tipos AD, concomitantemente. O percentual de cepas enterotoxigênicas foi em torno de 11. Kumar & Gupta (8), na Índia, comentaram que apesar da ocorrência de toxi-infecção, em pessoas, por alimentos contaminados pela enterotoxina estafilocócica (leite e produtos lácteos), são poucos os trabalhos realizados no intuito de detectar os tipos de enterotoxina. Na pesquisa realizada em 62 cepas de *S. aureus* isoladas de leite, 10 delas (16%) foram produtoras de enterotoxina dos seguintes tipos: A (4 cepas), D (2 cepas) e B, C, BD e CD cada uma delas produzida por um isolamento desta fonte. Na Noruega, Olsvik et al. (14), encontraram um percentual de cepas enterotoxigênicas bem maior do que os assinalados pelos outros autores. Das 46 cepas de origem bovina, isoladas de vacas com mastite 32 (72%) produziram os seguintes tipos de enterotoxina: C, BC, ABC, AB e AC, respectivamente 16 cepas, 12, 2, 1 e 1.

As cepas de *S. aureus* nos trabalhos citados produziram um único tipo de enterotoxina ou combinações de duas ou mais. O tipo C foi produzido

por 39 cepas, o tipo A por 9, o tipo B por 5, o tipo D por 4, AE por 2, ABC por 2, e por uma cepa cada, as combinações AB, AD, AC, CD e BD.

Pelos dados citados na literatura e os resultados obtidos neste trabalho com o isolamento de *S. aureus* em maior percentual, do leite de vacas com mastite, estudos semelhantes devem ser realizados a respeito, preconizando-se a adoção de medidas higiênico-sanitária, nem sempre fáceis de serem aplicadas, visando a obtenção de leite de melhor qualidade, em benefício da saúde do consumidor.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Doutora Alba Lúcia Solina Noieto, Professora da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela pesquisa de enterotoxina e termonuclease nas cepas de *S. aureus*, sem o que não poderiam fazer esta publicação.

ABSTRACT

Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* isolated from Mastitic Cows

The prevalence of subclinical mastitis was of 48%, by the leukocytic reaction of the California Mastitis Test (CMT), in 2317 milking cows belonging to 86 farms stratified between a dairy region of Rio de Janeiro state. From 2725 milk cultures, collected from 692 cows, 1026 (37,65%) showed positive results on CMT and 546 (53,22%) for bacteriological examination. *Staphylococcus aureus* was the most frequent agent, had been isolated from 229 (41,94%) milk samples, from all herds under study. The possibility of contamination of dairy products by *S. aureus* and their enterotoxin, was studied by the research of toxin in some strains of this agent. The strains of *S. aureus* isolated from quarters showing a very strong leukocytic reaction by the CMT, were inoculated into heart brain broth with glycerin (in equal parts) and kept in the freezer at -16°C. The thermonuclease was determined by the method described by Lachica et al. (1971). The research for enterotoxin of type A, B, C, D and E was made by the technique described by Robbins et al. (1974), at "Instituto de Microbiologia - UFRJ". From 93 strains of *S. aureus* analysed, only one produced enterotoxin from biotype A, known as the mayor one at food poisoning, being found in 75% of the outbreaks. In eight strains the presence of thermo-

stable nuclein was not detected. Although the number of enteropathogenic strains was small, it is believed that care must be taken with bovine herds, not allowing the mixture of milk from infected cows and from healthy animals. This procedure is a hazard for human health, since *S. aureus* is present in a high level at the majority of the herds.

Key words: bovine, milk, toxin.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adekeye, D. Enterotoxin production by strains of *Staphylococcus aureus* isolated from animals and man in Nigeria. *Veterinary Microbiology*, 5: 143-50, 1980.
2. Araújo, W.P. *Staphylococcus aureus* em leite cru: produção de enterotoxina caracterização da origem provável humana ou bovina, a partir das cepas isoladas. São Paulo, Universidade de São Paulo, 1984. 120 p. (Tese de Mestrado).
3. Ferreiro, L. Agentes etiológicos e terapêuticos da mastite bovina no Brasil. *Arq. Fac. Vet. UFRGS.*, Porto Alegre, 6: 77-88, 1978.
4. Ferreiro, L.; Santos, E. C. & Silva, N. da. Ocorrência e etiologia da mastite na "Zona da Mata" do Estado de Minas Gerais. *Arq. Esc. Vet. UFMG.*, Belo Horizonte, 33 (1): 31-7, abril, 1981.
5. Furlanneto, S.M.P.; Nader Filho, A.; Wilson, D. & Schocken-Iturrino, R.P. *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos isolados a partir de leite de vacas mastíticas. *Rev. Microbiol.* São Paulo, 18 (2): 138-43, abril/junho, 1987.
6. Freitas, M. do A.Q. de; Vollú, E.W.; Liberal, M.H.T.; Magalhães, H.; Freitas, M.Q. de & Cerqueira, A.M.F. Prevalência de mastite subclínica na bacia leiteira de Cantagalo-RJ. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 20, Cuiabá, 1986. *Anais...* Cuiabá, Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1986. p. 248.
7. Harrop, M.H.V.; Pereira, L.J.G.; Brito, J.R.F. & Mello, A.M. B. Incidência de mastite bovina na bacia leiteira da Zona do Agreste Meridional de Pernambuco. *Pesq. Agropec. Bras.*, Ser. Vet., 10: 65-7, 1975.
8. Kumar, A. & Gupta, R.S. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from foods and human sources. *Indian Vet. J.*, 60: 595-8, August, 1983.
9. schica, R.V.F.; Genigeorgis, C. & Hoeprick, P.D. Metachromatic agar-diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. *Appl. Microbiol.* 21: 585-7, 1971.
10. Langenegger, J.; Coelho, N.M.; Langenegger, C.H. & Castro, R. P. Estudo da incidência da mastite bovina na bacia leiteira do Rio de Janeiro. *Pesq. Agropec. Bras.*, 5: 437 - 40, 1970.
11. Nader Filho, A.; Schocken-Iturrino, R.P. & Rossi Junior, O.D. Mastite subclínica em rebanhos produtores de leite tipo B. *Arq. Bras. Med. Vet. Zool.*, Belo Horizonte, 35 (5): 621-9, 1983.
12. Mastite subclínica em rebanhos produtores de leite,

- gordura 3,2%. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, **36** (5): 549-58, 1984.
13. Nader, Filho, A; Schocken-Iturrino, R.P.; Rossi Junior, O.D. & Cembranelli, E. M. Prevalência e etiologia da mastite bovina na região de Ribeirão Preto, São Paulo. *Pesq. Vet. Bras.*, **5** (2): 53-6, 1985.
 14. Olsvik, O.; Berdal, B.P.; Fossum, K. & Omland, T. Enterotoxin production by *S. aureus* related to the origin of the strains. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, Sect B, **89**: 423-6, 1981.
 15. Rea, M.; O'Connor, F.; Daly, C. & O'Regan, W. Biochemical characteristics and enterotoxigenicity of *S. aureus* isolates from bovine mastitis. *Ir. J. Fd. Sci. Technol.*, **4**: 44-55, 1980.
 16. Robbins, £.; Gould, S. & Bergdoll, M. S. Detecting the enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains. *Appl. Microbiol.* **38**: 363-87, 1974.
 17. Schalm, O.W. & Noorlander, D.D. Experiments and observations leading to development of the California; Mastitis Test. *J. Amer. Vet. Med. Res.*, **130**: 199-204, 1957.

Recebido para publicação em 12/01/90

STAPHYLOCOCCAL FOOD POISONING IN BELO HORIZONTE (BRAZIL)

Luiz Simeão do Carmo¹
Merlin S. Bergdoll²

ABSTRACT

Eighteen staphylococcal food poisoning outbreaks in the Belo Horizonte area were investigated; 60 people became ill in one outbreak. The foods involved were cake with cream filling and white cheese. Staphylococcal counts ranged from 10^4 to 10^8 CFU/g of food. Staphylococci isolated in 14 of the outbreaks produced enterotoxin, enterotoxins A and B in 12 outbreaks, enterotoxin A in one outbreak, and enterotoxin B in one outbreak.

Key words: food poisoning, *Staphylococcus*, enterotoxin

INTRODUCTION

Staphylococcal food poisoning occurs world wide, however in many countries it is not known how frequently because most cases are never reported. The major symptoms, vomiting and diarrhea, are of short duration and most individuals affected do not seek medical attention (1). Only in the last few years have cases come to the attention of public health officials in several cities in Brazil. As a result investigations of the outbreaks have been possible which includes determination of the food involved, the presence of staphylococci in the incriminated food, the number of organisms present, and the enterotoxin production of the staphylococci isolated from the food.

There have been a number of staphylococcal food poisoning outbreaks in the Belo Horizonte region in the last two or three years; in most cases several individuals were made ill. The major foods involved were white cheese and cake with a cream filling. Usually, staphylococci were present in

relatively large numbers, 10^6 - 10^8 CFU per gram of food.

We present here the results from examination of 18 outbreaks, including the results of analyzing the strains for enterotoxin production.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of staphylococci - Twenty-five grams of the implicated food was suspended in 225 ml of buffered-peptone water; 0.1 ml was spread on the surface of Baird-Parker agar plates. Additional plates were prepared with 10-fold dilutions if necessary (2). The plates were incubated for 48 hours at 37°C. Typical colonies were tested for coagulase production. Coagulase-positive colonies were used for enterotoxin testing.

Growth of staphylococci for enterotoxin detection - Inocula were prepared by incubating the staphylococci isolated from the foods in brain heart infusion (BHI) broth over

-
1. Fundação Ezequiel Dias, Laboratório de Microbiologia de Alimentos, rua Conde Pereira Cameiro, 80, Gameleira, 30550 Belo Horizonte, Brazil.
 2. Food Research Institute, University of Wisconsin-Madison, 1925 Willow Drive, Madison, WI 53706, USA.

night at 37°C. Membrane-over-agar plates were prepared with 25 ml of BHI-agar and covered with a membrane disk made from Spectra/Por membrane dialysis tubing, 6000-8000, 100 mm flat width (Thomas Scientific, Philadelphia, PA, USA) (3). The membrane was inoculated with 0.5 ml of the inoculum and the plates were incubated at 37°C for 24 hours. The cultures were removed from the membranes by washing with 2.5 ml of 0.01 M Na₂HPO₄ in three steps using 1 ml, and 0.5 ml of the phosphate buffer. The cultures were centrifuged and the culture supernatant fluid used for enterotoxin testing.

Enterotoxin testing - The optimum-sensitive-plate (OSP) method was used (3). In this method, 3 ml of agar (1.2%) is placed in 50 mm plastic petri plates with tight lids: wells were cut according to the original specifications. Specific antisera was placed in the center well, enterotoxin (4 µg/ml) was placed in the two smaller wells, and culture supernatant fluids were placed in the four larger outer wells. Different plates were required for each enterotoxin (SEA, SEB, SEC, SED). The plates were placed in a humidified closed container and incubated overnight at 37°C. Positive reactions were determined from precipitin lines formed by the culture supernatant fluids that joined with the control lines.

Culture supernatant fluids that were negative by the OSP method were diluted 50-fold and tested by use of the ELISA ball kit (Dr. Bomelli AG, Stationstrasse 12, CH-3097 Libbefeld-Bern, Switzerland) (4). This method is sensitive to 0.5 ng/ml and can be used to detect low producing strains.

RESULTS

Food poisoning cases - Eighteen staphylococcal food poisoning outbreaks were reported in the Belo Horizonte region in 1988-89. Ten outbreaks were from white cheese and eight outbreaks were from cake with a cream filling. The number of individuals involved varied from 3 to 60 per outbreak (Table 1).

Staphylococcal count in food - The staphylococcal count varied from 10⁴ to 10⁸ CFU/g of food (Table 1).

Enterotoxin production by the staphylococci - Examination by the OSP method showed 13 strains to be positive for enterotoxin production (Table 1); 10 strains were positive for SEA and SEB and 3 were positive for only SEB. Examination of 12 strains by ELISA showed 1 strain negative by OSP to be positive for SEA, 2 strains that were positive for SEB by

TABLE 1 - Staphylococcal food poisoning outbreaks in Belo Horizonte*

Food Involved	N ^o ill	Staphylococcal count CFU/g	Enterotoxin detected by		
			OSP	ELISA	
Cake With Cream filling	60	9.9 X 10 ⁷	Neg	Neg	
	35	2.0 X 10 ⁸	SEA,SEB	SEA,SEB	
	10	2.0 X 10 ⁷	Neg	SEA	
	25	>2.0 X 10 ⁷	SEA,SEB	SEA**	
	23	>2.0 X 10 ⁵	SEA,SEB		
	23	>2.0 X 10 ⁷	SEA,SEB		
	—***	2.8 X 10 ⁵	SEA,SEB	SEA,SEB	
	—	2.0 X 10 ⁶	SEA,SEB		
	Cheese, white	6	2.8 X 10 ⁸	SEA,SEB	
		3	>2.0 X 10 ⁸	SEA,SEB	SEA,SEB
12		7.8 X 10 ⁶	Neg	Neg	
—		1.6 X 10 ⁶	SEA,SEB		
—		1.0 X 10 ⁴	SEB	SEA,SEB	
—		2.8 X 10 ⁶	SEB	Neg,SEA	
—		1.6 X 10 ⁶	SEB	SEA,SEB	
—		>2.0 X 10 ⁷	SEA,SEB		
—	2.0 X 10 ⁶	Neg	Neg		
—	1.9 X 10 ⁸	Neg	Neg		

* - Typical symptoms of vomiting and diarrhea were reported in 12 outbreaks; for the other 6 outbreaks the foods involved were sent with the diagnoses of food poisoning without the symptoms. Time of symptoms were given only in outbreaks (1.5 - 4 hours).

** - Only SEA checked for.

*** - Information not available.

OSP to be positive for SEA and SEB, and 3 strains to be positive for SEA and SEB that were positive for SEA and SEB by OSP. One strain that was positive for SEB was positive for SEB but negative for SEA. Four strains were negative for all toxins. None of the strains produced either SEC or SED.

DISCUSSION

The fact that the staphylococci isolated from foods in a majority of the outbreaks produced enterotoxin confirmed them as staphylococcal food poisoning. Thirteen (72.2%) of the 18 strains produced SEA, with 12 of them also producing SEB. Enterotoxin A is the enterotoxin most frequently involved in staphylococcal food poisoning (5). One strain produced only SEB, however, SEB is seldom involved in food poisoning except in special cases such as with hard boiled eggs (6,7). Three of the 13 SEA-producing strains can be classed as low producing strains because SEA was detectable only by the ELISA method. All of the SEB producers were detectable by the OSP method. It would appear from the results that strains that produce SEA and SEB are quite common in Brazil. It is of interest that no strains were found to produce SEC or SED.

Four (22.2%) of the strains were negative for enterotoxin production which is a rather high percentage of negative strains. The failure to detect enterotoxin production may be due to one of two reasons. First, it is always possible the strain produces an unidentified enterotoxin as about 5% of cases appear to be caused by unidentified ones (8). The other possibility is that the staphylococci isolated was not the one actually involved. Often times foods are contaminated with more than one strain of staphylococci and if only one colony is tested for enterotoxin production, the one involved may be missed (9).

In 15 outbreaks the staphylococcal count was at least 10^6 CFU/g, the number usually required to produce detectable amounts of enterotoxin (9). In 3 outbreaks the counts were 10^5 CFU/g or less which is normally too low to detect enterotoxin production; however, it is not unusual for growth to be unevenly distributed which may result in a lower average count. In 2 of these outbreaks the staphylococci produced enterotoxin and the symptoms reported were typical of staphylococcal food poisoning.

The cakes involved in the food poisoning

contained a cream filling which normally provides a good medium for staphylococcal growth. If care is not taken in handling the cream it can easily be contaminated by the food handler. Frequently such cakes may be left at room temperature for several hours, which is adequate time for the staphylococci to grow and produce enterotoxin. The generally warm climate of Brazil contributes to this problem. Refrigeration is the best control of this type of food poisoning as staphylococci grow very little if at all under these conditions. Because of failure to understand this and to know that dairy products provide a good medium for staphylococcal growth, many cases occur that could be prevented.

RESUMO

Toxinfecção Alimentar por *Staphylococcus* em Belo Horizonte (Brazil).

Foram investigados 18 surtos de toxinfecção alimentar em Belo Horizonte, Brasil, sendo que em um dos surtos, 60 pessoas foram acometidas. Os alimentos envolvidos foram bolos confeitados e queijo Minas. As contagens de *Staphylococcus* variaram de 10^4 a 10^8 UFC/g. Foram detectadas linhagens de *Staphylococcus* enterotoxigênicos em 14 dos isolamentos efetuados. As enterotoxinas A e B foram concomitantemente identificadas em 12 surtos. Em um dos surtos, foi encontrada apenas A e em outro apenas B.

Palavras-chave: toxinfecção alimentar, *Staphylococcus*, enterotoxinas.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to acknowledge the technical assistance of Maria Lucia Pereira, Joselia Maria de Souza, Maria Berenice Cardoso Martins Vieira, Vanessa Andreia Drummond de Moraes, Ricardo Souza Dias, and Suzane Oliveira da Silva.

REFERENCES

1. Bergdoll, M. S. 1979. Staphylococcal intoxications, p. 443-494. In H. Riemann and F. L. Bryan (ed.), Foodborne infections and intoxications. Academic Press, Inc., N.Y.
2. Tatini, S. R., D. G. Hoover, and R. V. F. Lachica. 198 Methods for the isolation and enumeration of *Staphylococcus aureus*, p. 411-427. In M. L. Speck

- (ed.), Compendium of methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association, Inc., Washington, DC.
3. Robbins, R., S. Gould, and M. S. Bergdoll, 1974. Detecting the enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains. *Appl. Microbiol.* 28: 946-950.
 4. Fey, H., and H. Pfister. 1983. A diagnostic kit for the detection of staphylococcal enterotoxins (SET) A, B, C and A (SEA, SEB, SEC, SED), p. 345-348. In S. Avrameas (ed.), *Immunoenzymatic techniques*. Elsevier/North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
 5. Wieneke, A., and R. J. Gilbert. 1985. The use of a sandwich ELISA for the detection of staphylococcal enterotoxin A in foods from outbreaks of food poisoning. *J. Hyg.*, 95: 131-138.
 6. Harbrecht, D. F., and M. S. Bergdoll. 1980. Staphylococcal enterotoxin B production in hard-boiled eggs. *J. Food Sci.* 45: 307-309.
 7. Merrill, G. A., S. B. Werner, R. G. Bryant, D. Fredson, and K. Kelly. 1984. Staphylococcal food poisoning associated with an Easter egg hunt. *J. Am. Med. Assoc.* 252: 1019-1022.
 8. Kokan, N. P., and M. S. Bergdoll. 1987. Detection of low-enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2675-2676.
 9. Noleto, A. L., and M. S. Bergdoll. 1980. Staphylococcal enterotoxin production in the presence of non-enterotoxigenic staphylococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 1167-1171.

Received for publication in 20/06/90.

CARNE MECANICAMENTE SEPARADA DE ORIGEM BOVINA. I - INFLUÊNCIA DE DOIS SISTEMAS DE DESOSSA MANUAL SOBRE AS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DO PRODUTO RECÉM OBTIDO

Oswaldo Durival Rossi Júnior¹
Sebastião Timo Iaria²
Iacir Francisco dos Santos¹
Angelo Berchieri Júnior¹

RESUMO

Dois grupos formados por blocos de carne mecanicamente separada de origem bovina, obtidos de ossos oriundos de dois sistemas de desossa manual, em mesa e aéreo, foram submetidos a determinações microbiológicas objetivando verificar estas características no produto recém-obtido e as possíveis alterações decorrentes do tipo de desossa manual. No primeiro grupo, com a desossa em mesa, os resultados médios obtidos foram de $8,1 \times 10^3$ e $2,9 \times 10^4$ UFC/grama, nas contagens padrão de microrganismos mesófilos e psicrotróficos, respectivamente; de $1,2 \times 10^3$ e $5,9 \times 10^2$ UFC/grama nas contagens de *Staphylococcus aureus* e de bolores e leveduras e de $5,9 \times 10$, $2,2 \times 10$ e 1×10 microrganismos/grama nas determinações do NMP de coliformes totais, fecais e *Escherichia coli*, respectivamente. No segundo grupo, com a desossa manual aérea, os resultados médios encontrados foram de $6,9 \times 10^3$ e $4,2 \times 10^3$ UFC/grama nas contagens padrão de microrganismos mesófilos e psicrotróficos viáveis, respectivamente; de $4,6 \times 10^2$ e $6,2 \times 10^2$ nas contagens de *S. aureus* e bolores e leveduras e de $3,5 \times 10$, $0,75 \times 10$ e $0,16 \times 10$ microrganismos/grama nos NMP de coliformes totais, fecais e *E. coli*, respectivamente. De nenhuma das amostras examinadas foram isoladas bactérias do gênero *Salmonella*. Apesar das diferenças entre as características microbiológicas dos dois grupos de amostras terem se mostrado estatisticamente significativas apenas no NMP de *E. coli*, os resultados demonstraram que a carne mecanicamente separada obtida de ossos oriundos da desossa manual com as peças suspensas em trilhos aéreos apresentou-se com menor carga microbiana inicial do que aquela obtida de ossos oriundos da desossa manual em mesa.

Palavras chaves: carne desossada mecanicamente, carga microbiana.

1. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP
Campus de Jaboticabal - Rodovia Carlos Tonanni, km 5 — 14870 - Jaboticabal - SP, Brasil.
2. Instituto de Ciências Biomédicas II - USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 — 05508 - São Paulo - SP, Brasil.

INTRODUÇÃO

O continuado aumento na demanda de alimentos tem determinado o incremento de novas técnicas e o aperfeiçoamento de métodos antigos de obtenção e utilização de resíduos muitas vezes desperdiçados (16).

Dentre esses resíduos destacam-se os fragmentos de carne que permanecem aderidos aos ossos quando da obtenção dos corte de açougue. O processo tradicional de desossa sempre determina a perda de uma pequena, porém significativa, quantidade de carne que permanece aderida aos ossos (15).

A separação manual desses fragmentos, por ser ineficiente e onerosa, levou à utilização de um processo mecânico que, embora não sendo novo, tem sido bastante desenvolvido nos últimos anos (16). O processo de desossa mecânica caracteriza-se pela separação dos fragmentos de carne e de certa quantidade de medula óssea (6), sendo o produto obtido denominado carne mecanicamente separada.

Em decorrência da composição, estrutura física e elevado pH, a carne mecanicamente separada é um produto extraordinariamente perecível. Sua vida útil é limitada, fundamentalmente, pelo desenvolvimento microbiano e pela oxidação dos lipídios (10, 12, 14).

A qualidade microbiológica inicial da carne mecanicamente separada está na dependência direta das condições de higiene do processamento e do grau de contaminação dos ossos processados (13). Para que ela possa ser obtida com uma qualidade aceitável, os ossos devem ser manejados tão cuidadosamente como se fossem a própria carne (16).

A desossa mecânica logo após a remoção dos ossos da carcaça é tida como o principal fator para a obtenção de um produto de boa qualidade microbiológica (13, 17).

Em estudos realizados no sentido de se verificar a qualidade microbiológica da carne mecanicamente separada, foram encontradas populações de microrganismos mesófilos que variavam de 10^4 a 10^6 unidades formadoras de colônias (UFC)/grama (2, 7, 8, 9, 13, 14), populações de psicrotóxicos entre 10^6 e 10^7 UFC/grama (14) e de coliformes e *Staphylococcus aureus* entre 10^2 e 10^3 microrganismos/grama (9), sendo que o produto obtido de ossos frescos se apresentava de melhor qualidade microbiológica, quando comparado com aquele oriundo de ossos conservados sob refrigeração ou congelamento (8, 13, 14).

A utilização de todos os ossos da carcaça como matéria prima para a produção de carne mecanicamente separada, incluindo os da região do peito que são muito sujeitos à contaminações por conteúdo gastrointestinal durante a evisceração, pode determinar o aparecimento de microrganismos

patogênicos nesse produto.

Nesse sentido foram isoladas bactérias do gênero *Salmonella* a partir de carne mecanicamente separada de aves (4), de bovinos (14, 28) e de suínos (10). Foi isolado *S. aureus* de carne mecanicamente separada de bovinos (9), *Salmonella*, *Clostridium perfringens* e *S. aureus* de aves (17), de bovinos (5) e de suínos (12, 18).

Tendo em vista o fato de que os ossos, matéria prima para a produção da carne mecanicamente separada, são mais sujeitos nas fases do abate e da obtenção de cortes de açougue à contaminações e que isto tem seu reflexo na qualidade microbiológica do produto, realizou-se o presente estudo com o objetivo de verificar as possíveis influências de algumas variações no processo de desossa manual, comparando dois sistemas, em mesa e aéreo, sobre o grau de contaminação da carne mecanicamente separada recém obtida.

MATERIAL E MÉTODOS

Nesta investigação foram realizadas determinações microbiológicas em amostras de blocos de carne mecanicamente separada de origem bovina, colhidas em duas etapas distintas, em um matadouro frigorífico de grande porte situado no Estado de São Paulo.

Na primeira etapa, a desossa manual, fase que antecede a mecânica, era realizada em mesas e os ossos, acumulados em engradados metálicos desmontáveis forrados internamente com plástico, eram transportados em carrinhos elevadores hidráulicos para uma sala contígua à sala principal, ambas com temperatura controlada de 10°C , onde se encontrava a desossadora mecânica. O produto obtido da desossa mecânica era embalado em invólucro plástico, na forma de blocos retangulares de aproximadamente 15 cm de espessura e acondicionado em caixas de papelão para posterior congelamento.

Na segunda etapa, o processo de desossa manual era todo ele realizado com as peças suspensas em trilhos aéreos e os ossos, desta mesma maneira, encaminhados direta e ininterruptamente à desossadora mecânica que se localizava na mesma sala, com temperatura de 10°C , e numa posição adequada para permitir a continuidade no fluxograma do processo de desossa. O produto obtido passou a ser embalado somente em sacos plásticos, na forma de blocos retangulares.

As etapas foram realizadas em épocas distintas e nos dois casos as colheitas efetuadas em dias normais de operação. Na primeira fase foram analisados 10 blocos e na segunda 20 blocos. Cada amos-

tra, que representava um bloco, era formada por cinco sub-amostras colhidas em pontos diferentes. O produto era acondicionado em placas de petri esterilizadas e transportado ao laboratório em caixa de material isotérmico contendo blocos de gelo. As análises das amostras eram imediatamente iniciadas sendo que o tempo entre colheita e análise nunca foi superior a duas horas.

METODOLOGIA EMPREGADA

Preparo das diluições das amostras - De cada amostra eram pesados, assepticamente, 25 gramas e homogeneizados com 225 ml de água peptonada a 0,1% esterilizada (3), obtendo-se, assim, uma diluição inicial de 10^{-1} . A partir desta diluição, eram preparadas diluições decimais até 10^{-6} , empregando-se o mesmo diluente. As diluições assim obtidas eram utilizadas em todas as determinações microbiológicas, exceto quando especificado.

Contagem padrão de microrganismos aeróbios ou facultativos mesófilos e psicrotróficos viáveis (1, 11) - Nestas determinações empregou-se a técnica de semeadura em profundidade utilizando-se ágar padrão para contagem. A incubação era realizada a 35°C por 48 horas para contagem de mesófilos e a 7°C por 10 dias para a de psicrotróficos.

Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais (1) - Foi utilizada a técnica dos tubos múltiplos, empregando-se caldo lauril sulfato triptose na etapa correspondente ao teste presuntivo e caldo lactose-verde brilhante-bile a 2% na etapa confirmatória. Ambas incubações foram realizadas a 35°C por 24-48 horas. A determinação do NMP de coliformes totais foi realizada empregando-se a tabela de Hoskins.

Determinação do NMP de coliforme fecais (1, 11) - A partir dos tubos com resultado positivo no teste confirmatório para coliformes totais, eram inoculados tubos correspondentes contendo caldo EC e a incubação realizada a $45,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2$ por 24 horas. A determinação do NMP de coliformes fecais foi realizada empregando-se a tabela de Hoskins.

Determinação do NMP de *Escherichia coli* (1, 11) - A partir dos tubos com caldo EC que apresentavam resultado positivo para coliformes fecais, eram semeadas placas de ágar eosina-azul de metileno. Colônias características eram repicadas em ágar nutriente inclinado e após incubação eram preparados esfregaços corados pelo método de Gram. Constatada a presença de bacilos G-, em cultura pura, estes eram identificados bioquimicamente através das provas do IMViC. O NMP de *E. coli* era obtido levando-se à tabela de Hoskins o número

de tubos de caldo EC com resultado positivo, cujas culturas ao teste do IMViC apresentavam reações características para *E. coli*.

Contagem de *S. aureus* (1, 3, 11) - Foi utilizada a técnica de semeadura em superfície empregando-se ágar Baird-Parker. Após incubação a 35°C por 24-48 horas, 3 a 5 colônias características eram semeadas em ágar nutriente inclinado e as cepas que, em esfregaços corado pelo Gram se revelavam como cocos G+, agrupados em forma de cachos de uva, eram submetidos à identificação bioquímica através das provas da catalase, da oxidação e fermentação da glicose, da produção de DNAase, coagulase livre e de termonuclease. O número de *S. aureus* era obtido com base nos resultados dessas provas, proporcionalmente ao número de colônias contadas no ágar Baird-Parker.

Contagem de bolores e leveduras (1) - Foi utilizada a técnica de semeadura em profundidade empregando-se ágar malte adicionado de uma solução de antibióticos contendo clortetraciclina e cloranfenicol. A incubação das placas foi feita a 25°C durante 5 dias.

Pesquisa de *Salmonella* (1, 11) - 25 gramas do produto eram homogeneizados com 225 ml de solução de Ringer 1/4 e o conjunto permanecia em repouso por 6 horas à temperatura ambiente. A seguir, procedia-se a incubação a 43°C por 18 horas. Na fase de enriquecimento seletivo, duas alíquotas de 2 ml cada eram inoculadas, respectivamente, em 20 ml de caldo selenito-novobiocina e em 20 ml de caldo tetrationato-novobiocina. Após incubação do primeiro meio a 43°C , e do segundo a 37°C , por 24 a 120 horas, foram realizadas semeaduras em placas contendo ágar verde-brilhante e ágar Mac Conkey. Colônias suspeitas foram submetidas aos testes bioquímicos do meio IAL (19). As culturas que apresentassem alterações sugestivas de reações bioquímicas atribuíveis a *Salmonella* deveriam ser submetidas a outras reações bioquímicas e provas sorológicas de identificação dos sorotipos.

Análise estatística (21) - Os produtos analisados nas duas etapas do trabalho foram comparados quanto às características microbiológicas sendo, para isso, os dados enquadrados no delineamento inteiramente casualizado, com número diferente de repetições e submetidos a análise de variância pelo teste F.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores das médias geométricas das contagens de microrganismos mesófilos viáveis, apresentados na Tabela 1, de $8,1 \times 10^3$ UFC/grama encontrados nas amostras da primeira etapa e de $6,9 \times$

10^3 UFC/grama nas da segunda, mostraram-se inferiores aos resultados de 10^5 a 10^7 UFC/grama encontrados por Field & Riley (7) e Field e col. (8), em carne de carneiros; Ostovar e col. (17), em carne de aves e Kolozyn-Krajewska e col. (13) e Jimenez-Colmenero e col. (12), em carne de suínos. Revelaram-se, também, inferiores ao número médio de 10^4 UFC/grama encontrado por Fuch e col. (9) em carne de origem bovina, porém, dentro do intervalo de 10^2 a 10^6 UFC/grama obtido por Balaz e col. (2).

A comparação dos valores das contagens de microrganismos mesófilos obtidos nas duas etapas do trabalho (Tabela 1), revela que a carga microbiana inicial foi um pouco menor nas amostras da segunda etapa. Apesar da diferença entre os resultados não ter se mostrado significativa ($F=0,116$ NS), o menor número de microrganismos observado nas amostras da segunda etapa pode ser um indicativo de que a tecnologia de obtenção da carne mecanicamente separada adotada nesta fase, ou seja, a desossa manual, com o mínimo de manuseio, em trihos aéreos e os ossos encaminhados diretamente ao equipamento de desossa mecânica, deu origem a um produto menos contaminado em termos de mesófilos do que aquele oriundo da matéria prima obtida através da desossa manual em mesa.

No tocante aos microrganismos psicrotóxicos, os dados da Tabela 1 revelam médias geométricas de $2,9 \times 10^4$ UFC/grama para as amostras da primeira

etapa e de $4,2 \times 10^3$ UFC/grama para as da segunda. Krautil & Tulloch (14), analisando o mesmo tipo de produto, encontraram níveis de contaminação maiores, com 68% das amostras apresentando mais que 10^5 UFC/grama. Na carne mecanicamente separada de origem suína, Pelaez e col. (18) e Garcia-Matamoros e col. (10) encontraram também número mais elevado de microrganismos viáveis/grama, da ordem de $5,0 \times 10^7$. A menor carga microbiana psicrotóxica obtida no presente estudo, em relação àquela observada por esses autores, pode ser atribuída, principalmente, ao fato de que a desossa mecânica foi realizada em seguida à manual, sendo evitada assim a conservação dos ossos em temperatura de refrigeração, sistema este que foi utilizado pelos autores citados por períodos de até 24 horas. Já quando se compara os dados encontrados nas duas etapas do trabalho, verifica-se um número de psicrotóxicos viáveis bem maior nas amostras da primeira fase. Este maior número pode ser justificado como decorrente do maior contato das peças com superfícies e mãos na desossa manual em mesa e, principalmente, pelo fato de que nesta etapa do trabalho os ossos eram acumulados em engradados forrados com plástico, e não levados direta e ininterruptamente à desossadora mecânica como ocorria na segunda fase.

Os dados relativos às contagens de *S. aureus* (Tabela 1) revela médias geométricas de $1,2 \times 10^3$ UFC/grama para as amostras da primeira etapa do

TABELA 1 - Valores das médias geométricas das contagens padrão de microrganismos aeróbios ou facultativos, mesófilos e psicrotóxicos viáveis e contagens de *Staphylococcus aureus* e de bolores e leveduras, obtidos em amostras de carne mecanicamente separada, nas duas etapas do trabalho e resultados do teste F, Jaboticabal, 1989.

Análise	1ª Etapa ⁽¹⁾		2ª Etapa ⁽²⁾		F
	Log x ⁽³⁾	UFC/grama ⁽⁴⁾	Log x	UFC/grama	
Contagem padrão de mesófilos viáveis	3,91 a ⁽⁵⁾	$8,1 \times 10^3$	3,84 a	$6,9 \times 10^3$	0,116 ^{NS}
Contagem padrão de psicrotóxicos viáveis	4,46 a	$2,9 \times 10^4$	3,62 a	$4,2 \times 10^3$	2,18 ^{NS}
Contagem de <i>S. aureus</i>	3,08 a	$1,2 \times 10^3$	2,66 a	$4,6 \times 10^2$	3,09 ^{NS}
Contagem de bolores e leveduras	2,77 a	$5,9 \times 10^2$	2,79 a	$6,2 \times 10^2$	0,004 ^{NS}

(1) Desossa manual em mesa

(2) Desossa manual aérea

(3) Dados transformados em Logaritmo de x

(4) UFC - Unidade formadora de colônia

(5) Em cada linha, valores seguidos de letras iguais não diferem entre si pelo teste F ao nível de 5%

NS - Não significativo a 5% de probabilidade (P0,05)

trabalho e, de $4,6 \times 10^2$ UFC/grama, para as da segunda. Fuchs e col. (9) encontraram, em carne mecanicamente separada de aves, populações médias de $5,0 \times 10^2$ UFC/grama e Jimenez-Colmenero e col. (12), Garcia-Matamoros e col. (10) ao redor de $1,0 \times 10^3$ UFC/grama no produto de origem suína. Esses autores atribuem a presença de *S. aureus* na carne mecanicamente separada como decorrente, principalmente, das condições de higiene e da manipulação da matéria prima.

A análise comparativa das médias geométricas das contagens de *S. aureus* (Tabela 1) encontradas nas duas etapas do trabalho evidenciam que a contaminação inicial foi menor nas amostras da segunda etapa. Apesar de não ter sido estatisticamente significativa ($F=3,09NS$), a diferença observada entre as contagens médias pode ser indicativa de que a desossa em trilhagem aérea, onde a manipulação e o contato com superfície é menor que na em mesa, contribuiu para a obtenção de uma carne mecanicamente separada de melhor qualidade microbiológica no que diz respeito ao *S. aureus*.

As médias geométricas das contagens de bolores e leveduras também apresentadas na Tabela 1, que foram de $5,9 \times 10^2$ UFC/grama para as amostras da primeira etapa e de $6,2 \times 10^2$ UFC/grama para as da segunda, podem ser consideradas baixas quando comparadas com as encontradas para os outros grupos de microrganismos estudados. Comparando-se os dois valores verifica-se que são pratica-

mente iguais ($F=0,004NS$) demonstrando que os processos de desossa manual aérea ou em mesa, que são fases que antecedem a desossa mecânica, foram realizados em boas condições de higiene, principalmente no tocante ao ambiente, que tem influência direta nas contaminações por microrganismos do grupo em estudo.

Os dados apresentados na Tabela 2 revelam médias geométricas dos NMP de coliformes totais de $5,9 \times 10$ microrganismos/grama nas amostras da primeira etapa e de $3,5 \times 10$ microrganismos/grama nas da segunda. Esses valores se mostram bem inferiores aos obtidos por Fuchs e col. (9), Balaz e col. (2), Pelaez e col. (18) e Garcia-Matamoros e col. (10) cujas altas contaminações foram justificadas como decorrentes de falhas nas condições higiênicas das manipulações e dos equipamentos. Assim sendo, o reduzido NMP médio de coliformes verificado no presente estudo pode ser um indicativo bastante seguro de que todo o processo tecnológico e de higiene seguido, não só na obtenção propriamente dita da carne mecanicamente separada mas, também durante todas as fases do abate, principalmente no que concerne à evisceração, favoreceram a obtenção de um produto de boa qualidade microbiológica. Essas afirmações são confirmadas quando da análise da Tabela 2 em relação aos coliformes fecais. Neste caso se verifica valores médios pequenos, principalmente para as amostras da segunda etapa. Ostovar e col. (17) en-

TABELA 2 - Valores das médias geométricas do número mais provável (NMP) de coliformes totais, fecais e *Escherichia coli*, obtidos em amostras de carne mecanicamente separada, nas duas etapas do trabalho e resultados do teste F, Jaticabal, 1989.

Análise	1ª Etapa ⁽¹⁾		2ª Etapa ⁽²⁾		F
	Log x+1 ⁽³⁾	Microorganismos/ grama	Log x + 1	Microorganismos/ grama	
NMP de coliformes totais	1,78 a ⁽⁴⁾	$5,9 \times 10$	1,56 a	$3,5 \times 10$	0,56NS
NMP de coliformes fecais	1,37 a	$2,2 \times 10$	0,93 a	$0,75 \times 10$	2,45NS
NMP de <i>Escherichia coli</i>	1,04 a	$1,0 \times 10$	0,41 b	$0,16 \times 10$	12,71*

(1) Desossa manual em mesa

(2) Desossa manual aérea

(3) Dados transformados em Logaritmo de x + 1

(4) UFC - Unidade formadora de Colônia

(5) Em cada linha, valores seguidos de letras iguais não diferem entre si pelo teste F ao nível de 5%

NS - Não significativo a 5% de probabilidade (P0,05)

* - Significativo a 5% de probabilidade

contraram amostras com maior índice de contaminação apresentando valores médio de $4,6 \times 10^2$ microrganismos/grama.

As médias geométricas encontradas para os valores dos NMP de *E. coli* (Tabela 2) foram de 10 microrganismos/grama nas amostras da primeira etapa e de 1,6/grama nas da segunda. Na literatura consultada não foram encontrados relatos de estudos sobre a ocorrência de *E. coli* em carne mecanicamente separada de origem bovina. Porém, os valores médios encontrados no presente estudo podem ser considerados baixos, quando comparados aos resultados de 104/grama obtidos por Pelaez e col. (18) e Jimenez-Colmenero e col. (12) em carne suína. Diante disso, pode-se considerar que o produto analisado, com relação a *E. Coli*, mostrou-se também com boa qualidade microbiológica. Comparando-se os resultados das duas etapas verifica-se uma contaminação bem menor ($F=12,71^*$) nas amostras da segunda, indicando que a conduta e a higiene adotada nesta fase contribuíram decisivamente para uma diminuição das possíveis fontes de contaminação, resultando na obtenção de um produto de melhor qualidade.

Bactérias do gênero *Salmonella* não foram isoladas de nenhuma das amostras. Smeltzer & Ramsay (20) isolaram salmonelas de carne mecanicamente separada de origem bovina e consideraram os ossos como sendo a principal fonte de contaminação. Segundo esses autores, a origem da contaminação dessa matéria prima seriam facas, ganchos e outros equipamentos contaminados por microrganismos que chegam à indústria através da pele e/ou trato digestivo dos animais.

No presente estudo, o fato de não terem sido isoladas bactéria do gênero *Salmonella* em nenhuma das amostras analisadas pode ser atribuído a condições satisfatórias de higiene das instalações, equipamentos, pessoal e operações, não só no processo de desossa manual e mecânica, mas também durante as fases tecnológicas do abate. A esfola, serragem do peito e evisceração são os pontos da linha de abate em que a matéria prima, para a obtenção da carne mecanicamente separada, está mais sujeita a contaminações por bactérias do gênero *Salmonella* presentes na pele ou trato gastrointestinal dos animais. Isto justifica os cuidados que devem ser tomados quanto ao banho dos animais antes do abate, para serem retiradas substâncias estercoreais da pele, as operações de oclusão do esôfago e do reto, assim como a evisceração em etapa única. Todas estas precauções citadas devem ter gerado reflexos positivos em relação à microbiota da carne mecanicamente separada produzida, haja visto o baixo nível de contaminação por todos os

grupos de microrganismos estudados.

Os dados aqui apresentados demonstram ainda que os processos de desossa manual estudados, em mesa e aéreo, e o tempo entre este tipo de desossa e a mecânica influenciam a qualidade microbiológica da carne mecanicamente separada recém produzida. Em que pese ter havido diferença estatisticamente significativa somente no NMP de *E. coli*, ficou evidente pelos números apresentados que o processo de desossa manual aéreo, e o encaminhamento dos ossos desta mesma forma e ininterruptamente ao equipamento de desossa mecânica, o que implica em menos manipulação, limita contatos com mesas e outras superfícies e diminui o tempo de espera dos ossos, contribuem para a produção de uma carne mecanicamente separada de melhor qualidade.

SUMMARY

Mechanically separated beef. I - Influence of two deboning systems on the microbiological characteristics of the newly obtained product.

Two groups formed by blocks of mechanically deboned beef, obtained from bones from two hand deboning systems, on a table and on-the-rail systems, were submitted to microbiological determinations in order to verify these characteristics in the newly obtained product and the possible alterations due to the hand deboning system. In the first group, in which the hand deboning was done on a table, the average results obtained were 8.1×10^3 and 2.9×10^4 CFU/gram in the mesophilic and psychrotrophic plate counts, respectively; 1.2×10^3 and 5.9×10^2 CFU/gram for the counts of *Staphylococcus aureus* and mold and yeast, and 5.9×10 , 2.2×10 and 1.0×10 microorganisms/gram in the MPN determinations of total coliforms, fecal coliforms and *Escherichia coli*, respectively. In the second group, with on the rail system hand deboning, the average results obtained were 6.9×10^3 and 4.2×10^3 CFU/gram in the mesophilic and psychrotrophic plate counts, respectively; 4.6×10^2 and 6.2×10^2 CFU/gram for the counts of *S. aureus* and mold and yeast, an 3.5×10 , 0.75×10 and 0.16×10 microorganisms/gram in the MPN determinations of total coliforms, fecal coliforms and *E. coli*, respectively. *Salmonella* was not isolated from any sample. Although statistically significant differences between both groups had been shown for the MPN of *E. coli*, the results indicated that meat obtained from manual deboning on

the rail systems had less microorganisms than the one deboned on a table.

Key words: deboned beef, microbiological determinations

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro e ao técnico de laboratório Waldemar Dibelli Júnior, pela participação nos trabalhos de colheita e análise das amostras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- American Public Health Association. Committee on Microbiological Methods for Foods - Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, American Public Health Association, 1976. 701p.
- Balaz, V.; Kadlecova, O.; Rajniakova, A. & Vosko, V. - Higiene problems of mechanically deboned meat. *Ceskolovenska Hygiene*, 30:543-555, 1985.
- Brasil. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária - Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes; I-Métodos microbiológicos. Brasília, Laboratório Nacional de Referência Animal. Coordenadoria do Sistema de Laboratórios, 1981.
- Colin, P.; Lahellec, C.; Bennejean, G. & Cross, H.R. - Examen bactériologique de viandes de volaille séparées mécaniquement, et mode de décongélation. *Rec. Med. Vet.*, 157:893-897, 1981.
- Emswiler, B.S.; Pierson, C.J.; Kotula, A.W. & Cross, H.R. - Microbiological evaluation of ground beef containing mechanically deboned beef. *J. Food Sci.*, 43:158-161, 1978.
- Field, R.A. - Increased animal protein production with mechanical deboners. *World Rev. Anim. Prod.*, 12:61-73, 1976.
- Field, R.A. & Riley, L. - Characteristics of meat from mechanically deboned lamb breasts. *J. Food Sci.*, 39:851-852, 1974.
- Field, R.A.; Riley, M.L. & Corbridge, M.H. - Characterization of mechanically deboned hot and cold mutton carcasses. *J. Food Sci.*, 39:282-284, 1974.
- Fuchs, G.; Jansson, S. & Norberg, P. - Studies on the soft fraction from mechanically deboning equipment. *Var Foda*, 32:50-63, 1980.
- García-Matamoros, E.; Arroyo, E.; Jimenez-Colmenero, F. & Pelaez, M.C. - Influencia del lavado sobre a qualidade microbiológica de la carne recuperada mecanicamente conservada em refrigeración. *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.*, 25:125-132, 1985.
- International Committee on Microbiological Specification for Food. Microorganisms in food. I - Their significance and methods of enumeration. 2ed., Toronto, University Press, 1978.434p.
- Jimenez-Colmenero, F.; Garcia-Matamoros, E. & Pelaez, M. C. - Pre-treatment of mechanically recovered meat for freezing and stability of mechanically recovered meat during frozen storage. In: Seuthen, P.; Cheftel, J.C.; Eriksson, C.; Jul, M.; Leniger, H.; Linko, P.; Varela, G. & Vos, G. - Thermal processing and quality of foods. Copenhagen, European Cooperation on Scientific & Technical Research, 1984. p.653-668.
- Kolozyn-Krajewska, D.; Jankiewicz, L. & Wasilewski, S. - Mechanically deboned hot meat as a component of meat model blends. *Acta Alimentaria Polonica*, 9:31-39, 1983.
- Krautil, F.L. & Tulloch, J.D. - Microbiological of mechanically recovered meat. *J. Food Protec.*, 50:557-561, 1987.
- Marsh, B.B. - Carne mecanicamente deshuesada. *Alimentos Procesados*, 4:10-12, 1985.
- Newman, P. - The separation of meat from bone - A review of the mechanics and the problems. *Meat Sci.*, 5:171-200, 1980-81.
- Ostovar, K.; MacNeil, J.H. & O'Donnell, K. - Poultry product quality. 5- Microbiological evaluation of mechanically deboned poultry meat. *J. Food Sci.*, 36:1005-1007, 1971.
- Pelaez, M.C.; Jimenez-Colmenero, F. & Arroyo, E. - Effects of freezing and storage on the microbial quality of washed mechanically recovered meat. Proc. XVI Intern. Congr. Refrig. Com. C-2, 1983. p.171-177.
- Pessoa, G.V.A. & Silva, E.A.M. - Milieu pour l'identification présumptive rapide des enterobactéries des aeromonas et des vibrions. *Ann. Microbiol. Inst. Pasteur*, 125A:341-347, 1974.
- Smeltzer, T. & Ramsay, R. - *Salmonella* in mechanically deboned meat. *Aust. Vet. J.*, 51:433-434, 1981.
- Steel, R.G.D. & Torrie, J.H. - Principles and procedures of statistics. New York, Mc Graw, 1960. 481p.

Recebido para publicação em 24/11/89

ANÁLISE BACTERIOLÓGICA DE CARNES SUÍNAS COMERCIALIZADAS EM AÇOUGUES DA CIDADE DE SÃO PAULO

Dariela Flores Calderon¹
Sirdéia Maura Perrone Furlanetto¹

RESUMO

Foram adquiridas 30 amostras de carne suína em açougues da cidade de São Paulo e submetidas à análise bacteriológica para a contagem de bactérias aeróbias facultativas psicotróficas e mesófilas, do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais, fecais e de *E. coli* e contagem e identificação de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos. Na contagem de bactérias facultativas psicotróficas 17 (56.7%) amostras apresentaram valores iguais ou superiores a 10^6 UFC/g, podendo ser considerados altos. Para a contagem de bactérias aeróbias facultativas mesófilas 13 (43.3%) amostras continham números acima do máximo permitido (3×10^6 UFC/g) pelos padrões adotados pela Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Quanto aos coliformes totais, em 18 (60%) amostras os NMPs obtidos foram superiores a 10^3 /g. Com relação ao NMP de coliformes fecais e, em particular, *E. coli*, observa-se que 7 (23.3%) amostras apresentaram valores acima do máximo permitido (3×10^2 /g) pelos padrões adotados pela Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Na contagem de *S. aureus* 6 (20%) amostras revelaram-se com valores iguais ou superiores a 10^3 UFC/g. Em uma das cepas isoladas verificou-se a capacidade de produzir enterotoxina do tipo B.

Palavras chaves: Alimentos, Contaminação. Carne Suína, *Staphylococcus aureus*, enterotoxina.

INTRODUÇÃO

Os alimentos que contém números excessivos de bactérias patogênicas ou níveis de toxinas bacterianas suficientes para provocar sintomas clínicos no consumidor não apresentam, em geral, sinais evidentes de alterações, o que determina que podem ser consumidos. Este fato não ocorreria se as alterações fossem evidentes.

Atualmente, as técnicas laboratoriais acham-se normatizadas para a detecção e contagem de bactérias indicadoras, cuja presença nos alimentos, em determinado número, mostra que estes produtos estiveram expostos a condições que possibilitaram a intro-

dução de organismos nocivos e/ou a multiplicação de espécies infecciosas ou toxigênicas.

Este estudo visou avaliar a qualidade microbiológica da carne de suínos, através de quantificação das bactérias responsáveis por processos de deterioração, das indicadoras de condições higiênicossanitárias e de *S. aureus* com a finalidade de se conhecer o potencial desse alimento como fonte de contaminação para o homem.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das amostras - Foram adquiridas 30

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

amostras de carne crua de suíno de diversos açougues do Município de São Paulo. As amostras, pesando cerca de 200g cada (9), uma vez obtidas eram transportadas ao laboratório e preservadas em geladeira a 4°C até o início da análise bacteriológica. O tempo decorrido entre a coleta das amostras e o início dos exames, nunca ultrapassou o prazo de 2 horas.

Preparo das amostras - No laboratório, eram pesadas assepticamente, 25g das amostras, em recipientes esterilizados e homogeneizadas em liquidificador com copo estéril, utilizando-se como diluente 225ml de água tamponada fosfatada pH 7.2, esterilizada, a fim de se obter uma diluição inicial de 10^{-1} . Da diluição inicial, eram feitas diluições decimais de 10^{-2} a 10^{-7} , empregando-se o mesmo diluente, que era preparado de acordo com a técnica recomendada pelo ICMSF (10).

A partir das diluições foram feitas as seguintes determinações quantitativas:

Contagem de bactérias aeróbias facultativas psicrotróficas e mesófilas (1) - Foi utilizado o ágar padrão e a incubação a 7°C durante 10 dias, para a contagem de bactérias psicrotróficas e à temperatura de 35°C por 48 horas, para a contagem de bactérias mesófilas.

Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes (10) - Foi utilizada a técnica dos tubos múltiplos, em triplicata, empregando-se o caldo lauril sulfato triptose e a incubação a 35°C por 24 e 48 horas. A seguir, de todos os tubos que se revelavam com prova presuntiva positiva, ou seja, com produção de gás, procedia-se à passagem em caldo lactose verde brilhante bile 2% com tubo de Durham, invertido, sendo estes incubados a 35°C por 24 horas. Após a incubação, eram consideradas provas confirmatórias positivas para coliformes totais, quando os tubos apresentavam-se com gás no interior do tubo de Durham. A determinação do NMP de bactérias coliformes totais foi realizada a partir do número de porções positivas, usando-se a Tabela de Hoskins (1).

Determinação do Número Mais Provável de coliformes fecais e *E. coli* (1, 10) - A partir dos tubos da prova presuntiva para coliformes totais foram semeados tubos de caldo EC, que foram incubados a 45.5°C por 24 e 48 horas. A partir dos resultados obtidos, foi determinado o NMP/g de coliformes fecais empregando-se a Tabela de Hoskins (1). A partir dos tubos de caldo EC, considerados positivos para coliformes fecais, fo-

ram semeadas placas de ágar eosina azul de metileno (EAM) e incubadas a 35°C por 24 horas. Colônias com características de bactérias fermentadoras da lactose eram submetidas ao teste do IM-ViC e, posteriormente, se determinou o NMP de *E. coli* usando-se a Tabela de Hoskins (1).

Enumeração, isolamento e identificação de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos - Na contagem destas bactérias empregou-se a técnica de semeadura em superfície e o meio ágar Baird-Parker, com incubação a 37°C por 24 e 48 horas (10). Após a contagem e isolamento das cepas, essas foram submetidas às provas de catalase (3), coagulase (20) desoxirribonuclease (5), term nuclease (13) e oxidação e fermentação da glicose (16).

A pesquisa da capacidade enterotoxigênica das cepas isoladas foi realizada empregando-se a técnica de cultura em saco de celofane (6), seguida da verificação da presença de enterotoxina nos extratos, através da prova de imunodifusão pelo método da sensibilidade ótima em placas, OSP (11). Os padrões das enterotoxinas A, B, C, D e E e as respectivas anti-enterotoxinas foram gentilmente fornecidas pelo Prof. Merlin S. Begdoll.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelos dados da Tabela 1 verifica-se que as contagens de bactérias psicrotróficas, variaram de 2.2×10^4 a 9.6×10^7 por grama, sendo a mediana de 1.2×10^6 por grama. Sem dúvida, como houve uma grande variação entre os números máximos e mínimos encontrados, a mediana está sujeita a um erro considerável. Através da Tabela 2 pode-se notar que 9 (30%) amostras revelaram-se com números de bactérias psicrotróficas acima de 10^6 por grama e 8 (26.7%) mostraram-se com números destas bactérias acima de 10^7 por grama. Os resultados obtidos demonstram que as amostras de carne suína estudadas, continham números elevados de microrganismos psicrotróficos, sendo portanto de fácil deterioração, mesmo se mantidos sob refrigeração.

No Estado de São Paulo, existem padrões microbiológicos para alimentos que estão incluídos nas Normas Técnicas Especiais relativas a Alimentos e Bebidas (15). Segundo a Norma Técnica n. 3, com relação a "carne de açougue", onde se encontra classificada a carne de suíno, estes padrões toleram, no máximo, a presença, 3×10^2 por grama de bactérias coliformes de origem fecal e exigem a ausência de salmonelas em 25g do produto. Os valores, para

TABELA 1 — Distribuição de valores mínimos, máximos e medianas para as 30 amostras de carne suína examinadas.

Valores	UFC*/g			NMP/g	
	Psicrotróficas	Mesófilas	<i>S. aureus</i>	Totais	Fecais**
Mínimo	2.2×10^4	5.4×10^4	$< 10^2$	9.3×10	< 3
Máximo	9.6×10^7	6.7×10^7	4.5×10^3	2.1×10^6	2.1×10^4
Mediana	1.2×10^6	1.2×10^6	$< 10^2$	1.5×10^3	1.2×10^2

* UFC - Unidades Formadoras de Colônias

** Para todas as amostras, os valores NMP de *E. Coli* foi o mesmo obtido com relação a coliformes fecais.

TABELA 2— Distribuição em classes, do número de amostras e dos percentuais de amostras de carne suína (30 unidades) segundo o número de Unidades Formadoras de Colônias de bactérias psicrotróficas e mesófilas e do número mais provável de coliformes totais e coliformes fecais por grama.

Nº/Grama	Psicrotróficas		Mesófilas		Coliformes			
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
0 — 10	-	-	-	-	-	-	3	10.0
10 — 10 ²	-	-	-	-	3	10.0	12	40.0
10 ² — 10 ³	-	-	-	-	9	30.0	10	33.3
10 ³ — 10 ⁴	-	-	-	-	10	33.3	3	10.0
10 ⁴ — 10 ⁵	6	20.0	3	10.0	5	16.7	2	6.7
10 ⁵ — 10 ⁶	7	23.3	12	40.0	2	6.7	-	-
10 ⁶ — 10 ⁷	9	30.0	9	30.0	1	3.3	-	-
10 ⁷ — 10 ⁸	8	26.7	6	20.0	-	-	-	-

* Para todas as amostras, o NMP de *E. coli* foi o mesmo obtido com relação a coliformes fecais.

bactérias psicrotróficas, obtidos na presente investigação serão comparados com os padrões propostos pela Sociedade Portuguesa Veterinária de Higiene Alimentar (14).

Segundo Ribeiro (14), os padrões portugueses para carnes retalhadas toleram valores para a contagem padrão em placa de bactérias psicrotróficas de, no máximo 10⁶ por grama. De acordo com a Tabela 2, 17 (56.7%) amostras, apresentaram valores superiores ao máximo permitido pelos padrões portugueses e portanto, impróprias para o consumo.

Analisando-se a Tabela 1 observa-se que as contagens padrões em placas de bactérias mesófilas, apresentaram valores de 5.4×10^4 a 6.7×10^7 UFC/g e uma mediana de 1.2×10^6 UFC/g do produto. Nossos resultados foram inferiores aos verificados por Gupta e cols. (7) que, analisando carne suína, obtiveram na contagem padrão de microrganismos viáveis, valores mínimos de 5.9×10^5 e máximos de 1.4×10^9 UFC/g do produto.

Os resultados obtidos mostram que 13 (43.3%) das amostras analisadas apresentavam

contagens padrões em placas, superiores a 3×10^6 /g máximo estabelecido pela Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (15) já os padrões microbiológicos portugueses para carnes retalhadas, toleram valores, para estas contagens, de até 10⁵ por grama (14). Em Massachusetts, Estados Unidos, a tolerância para este produto é de no máximo 10⁵ microrganismos por grama do alimento, segundo Jay (11). Considerando-se que tais exigências fossem também aplicadas no Brasil, com relação à contagem padrão em placa, verifica-se que 27 (90%) das amostras de carne suína analisadas, no presente estudo, estariam condenadas por estes padrões (Tabela 2). Vários fatores poderiam justificar os números encontrados, tais como, a multiplicação durante as operações de abate, transporte e comercialização, e a contaminação através de equipamentos, utensílios ou pelo manuseio constante e intensivo. É fato conhecido, que as condições higiênico-sanitárias dos açougues e outros estabelecimentos que comercializam carnes, não são as mais adequadas. De fato, foi observado

que na maioria dos açougues visitados, era constante a exposição de peças de carne à temperatura em balcões, mesas ou ganchos e as carcaças nem sempre mantidas sob refrigeração.

Analisando-se a Tabela 2 pode-se constatar que todas as amostras revelaram-se com a presença de bactérias coliformes totais, sendo que, em muitos casos, os NMP/g destes microrganismos foram elevados. Pela Tabela 1, observa-se que os NMP/g de coliformes totais obtidos variaram de 93 a 2.1×10^6 /g, enquanto a mediana foi de 1.5×10^3 por grama do produto. Estes resultados podem refletir grandes variações quanto à condutas higiênicas por ocasião das operações de abate, evisceração e retalhamento, e posteriormente, quanto as condições de conservação da carne especialmente com relação a temperatura.

Os níveis de contaminação por coliformes observados no presente estudo foram inferiores aos verificados por Gupta e cols. (7), que constataram em carne fresca de suíno, NMP de coliformes, que variaram de 2×10^4 a 6.5×10^7 /g do alimento. Já em carcaças de suínos Takcs (17) constatou valores do NMP para coliformes da ordem de 10 a 10^2 /g, bem menores portanto aos encontrados no presente trabalho.

Os padrões microbiológicos brasileiros para carnes não prevêm parâmetros relativos a coliformes totais, porém, os padrões bacteriológicos para alimentos portugueses (14) e os padrões vigentes no Estado de Massachusetts (11), permitem a presença de coliformes totais em números até 10^2 por grama de carnes frescas. Considerando-se estes parâmetros apenas 3 (10%) das amostras analisadas, poderiam ser consideradas próprias ao consumo.

Com relação aos NMP de coliformes de origem fecal, e de *E. coli*, observa-se na Tabela 1, variaram de 7 a 2.1×10^4 por grama, sendo a mediana 1.2×10^2 por grama. Salienta-se que, em uma das amostras do alimento analisado, foi constatada a presença de *E. coli* enteropatogênica clássica 0:111.

Comparando-se os resultados obtidos com relação ao NMP de coliformes fecais com os parâmetros adotados pela legislação vigente no Estado de São Paulo (15), verifica-se que 7 (23.3%) das amostras analisadas encontram-se acima dos valores permitidos, que é de no máximo 3×10^2 bactérias do grupo coliforme de origem fecal por grama do produto. Já os padrões para alimentos portugueses (14) exigem, para carnes retalhadas, a ausência de *E. coli* em 0.1 grama do alimento o que corresponde a menor que 10/g. No presente estudo pode verificar-se pela Tabela 2 que 27 (90%) amostras seriam consideradas impróprias para o consumo, caso estes parâmetros fossem por nós adotados no Brasil.

Com relação a *E. coli*, Bachhil (2) e Ternstrom & Molin (13), constataram a presença de *E. Coli* em amostras de carne suína em níveis de 2.9×10^3 bactérias por grama do produto e uma incidência em 62% das amostras, respectivamente. Ao comparar esses resultados com os obtidos na presente pesquisa, verifica-se que 26 (86.7%) amostras apresentaram números de *E. coli* inferiores aos obtidos por Bachhil (2). Por outro lado, quanto aos dados apresentados por Ternstrom & Molin (18) nossos resultados foram superiores, pois, 96.7% das amostras continham *E. coli*.

Muitos alimentos crus, entre eles as carnes, contêm normalmente números reduzidos de *S. aureus*, e seu significado está relacionado à capacidade de produzir enterotoxinas, caso seja mantida em temperatura adequada para isto. Por outro lado, após um tratamento térmico, pode ocorrer a destruição dos estafilococos presentes no alimento porém, a enterotoxina produzida pode persistir, devido a sua termorresistência (8, 10).

No presente trabalho, analisando-se a Tabela 3 verifica-se que em 22 (73.3%) amostras os níveis de contagem estavam abaixo de 100UFC/g limite de sensibilidade da metodologia empregada.

Com relação às 8 (26.7%) amostras positivas

TABELA 3— Distribuição em classes, do número de amostras e dos percentuais de amostras de carne suína (30 unidades) segundo o número de *Staphylococcus aureus* por grama e tipos de enterotoxina.

Nº/Grama	<i>Staphylococcus aureus</i>			
	Amostras		Cepas enterotoxigênicas	
	n ^o	%	N ^o	tipos
< 10 ²	22	73.3	-	-
10 ² — 10 ³	2	6.7	-	-
10 ³ — 10 ⁴	6	20.0	1	B

para *S. aureus*, os números mínimos encontrados foram 7×10^2 e 4.5×10^3 UFC/g, respectivamente, sendo a mediana igual a 2.4×10^3 UFC/g. Deve-se salientar que 6 (20%) das amostras revelaram-se com valores compreendidos entre 10^3 e 10^4 /g. Estes valores, embora não muito elevados, mostram a potencialidade do produto na disseminação dos microrganismos em unidade de processamento, inclusive cozinhas, através de contaminações cruzadas, bem como o risco de multiplicação no alimento de forma a atingir números elevados. Embora isto seja difícil, devido a competição microbiana, há a possibilidade da bactéria elaborar, se entero-

toxigênica, durante o seu crescimento, quantidade de enterotoxina suficiente para produzir sintomas de intoxicação alimentar.

Do exposto, pode-se depreender que a positividade para *S. aureus* obtida nesta investigação, revelou-se inferior à verificada por Vanderzant & Nickelson (19) que constataram um percentual de positividade de 87.8% e superior à verificada por Ternstrom & Molin (18) que obteve 13% de positividade para esta bactéria, ao analisarem amostras de carne suína. É importante salientar que da amostra de nº 1, foi isolada uma cepa produtora de enterotoxina do tipo B. Como a contagem de *S. aureus* foi de $2,8 \times 10^3$ UFC/g não havia risco ainda com relação à possibilidade de ocasionar intoxicação alimentar. O risco de uma multiplicação acentuada da bactéria também era improvável, já que havia a existência de um número elevado de microrganismos presentes nas carnes, o que poderia provocar uma inibição na multiplicação do *S. aureus*. Com efeito Koscec e cols. (12) pesquisando a contaminação bacteriana da carne de suíno, concluíram que a inibição desde *S. aureus* poderia ser consequência da microbiota competitiva presente no produto. A mesma conclusão chegaram Delazari e cols. (4) ao estudarem o efeito inibidor das bactérias psicrotóficas e lácticas, sobre o crescimento do *S. aureus*, em linguças.

Os resultados obtidos no presente estudo, com relação à *S. aureus* mostram que pode também ter ocorrido um efeito inibidor da microbiota competitiva, sobre estas bactérias, já que elevadas contagens totais (mesófilas e psicrotóficas) foram observadas nas amostras. É importante salientar que após o cozimento da carne, quando a maior parte da microbiota contaminante é destruída, se o *S. aureus*, mesmo em pequeno número, permanecer ou chegar ao alimento (sobrevivência ou contaminações cruzadas) e se as condições intrínsecas e extrínsecas do alimento forem adequadas ao seu crescimento, esta bactéria poderá multiplicar-se rapidamente. Nestas condições, não estaria sofrendo a competição de outras bactérias e, sendo enterotóxico, poderia produzir enterotoxina estafilocócica no produto já pronto.

Os padrões microbiológicos brasileiros para carnes, não estabelecem parâmetros relativos a *S. aureus*. Segundo os padrões bacteriológicos portugueses (14) para carnes retalhadas não deve existir *S. aureus* em 0.01 grama do produto. Assim, 8 (26.7%), amostras de carne suína analisadas, seriam consideradas impróprias ao consumo. O mesmo quadro seria encontrado para o Estado de Massachusetts (11), que não permite a presença de *S. aureus* em carnes cruas.

De um modo geral, das 30 amostras de carne

suína estudadas, 15 (50%) encontravam-se fora dos padrões microbiológicos vigentes no Estado de São Paulo, o que pode ser considerado elevado. Pelos resultados observados, verifica-se as más condições apresentadas pelo alimento estudado e a necessidade de uma melhoria das condições higiênico-sanitárias, envolvendo o abate, e/ou transporte e/ou conservação da carne suína exposta à venda no comércio.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Maria Alice de Oliveira da Silva e Rosa de Carvalho Gamba, pela colaboração técnica.

SUMMARY

Bacteriological quality of fresh pork

Thirty samples of fresh pork were purchased in various markets in the city of São Paulo, Brazil. The Study comprised bacteria counts of psychrotrophic and mesophilic aerobic or facultative anaerobic bacteria, and *Staphylococcus aureus*. The enterotoxigenic capacity of isolated *S. aureus* strains were also studied. Determination of the Most Probable Number (MPN) of coliforms, faecal coliforms and *Escherichia coli* were also carried out. The counts for psychrotrophic bacteria ranged from $2,4 \times 10^4$ to $9,6 \times 10^7$ CFU per g and 17 (56.7%) presented counts equal to or above 10^6 per g. Counts of mesophilic bacteria ranged from $5,4 \times 10^4$ to $6,7 \times 10^7$ CFU/g, 13 (43.3%) of samples presented counts above the maximum values allowed (3×10^6 /g) by normal standards of Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. As to coliform bacteria, MPN ranged from $9,3 \times 10$ to $2,1 \times 10^6$ per g of pork, 18 (60%) of the samples presented counts to above 10^3 per g. Regarding faecal coliforms and particularly, *E. coli*, the MPN ranged from 7 to $2,1 \times 10^4$ per g, and 7 (23.3%) of samples presented counts above the maximum values allowed (3×10^2 /g) by normal standards of "Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo". Counts of *S. aureus* ranged from 10^2 to $4,5 \times 10^3$ CFU/g of product; considering 6 (20%) samples, they showed values equal or higher than 10^3 per g. *S. aureus* strains isolated was submitted to the enterotoxigenicity test and showed capacity to produce type B enterotoxin.

Key words: food contamination. Fresh pork. *Staphylococcus aureus*, enterotoxin

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. American Public Health Association. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 2. ed. Ed. M. L. Speck, Washington, D.C., APHA, 1984.
2. Bachhil, V.N. Prevalence of *Escherichia coli* and enteropathogenic *Escherichia coli* (EEC) in fresh meats. *Indian Journal of Microbiology*, 23:223-7, 1983 apud *Food Sci. Technol.*, 13:3575, 1986 (Abstract).
3. Baird-Parker, A.C. Methods for classifying staphylococci and micrococci. In: Gibbs, B.M. & Skinner, F.A. Identification methods for microbiologists. London, Academic Press, 1966. p.59-64.
4. Delazari, I.; Leitão, M.F.F.; Hsu, L.A. Efeito da microflora contaminante sobre o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* em linguiças. *Colet. Inst. Tecnol. Aliment.*, 8:557-71, 1977.
5. Di Salvo, G.W. Desoxyribonuclease and coagulase activity of micrococci. *Med. Techn. Bull.*, 9:191-6, 1958.
6. Donnelly, C.; Leslie, J.; Black, L.; Lewis, K. Serological identification of enterotoxigenic staphylococci from cheese. *Appl. Microbiol.*, 15:1382-7, 1967.
7. Gupta, P.; Chauhan, G.; Bains, G. Bacteriological quality of fresh pork collected from different abattoirs and retail shops. *J. Food Sci Technol.*, 24:270-2, 1987.
8. Hobbs, B.C. & Gilbert, R.J. Higiene y toxicología de los alimentos. Zaragoza, Acribia, 1986. 441p.
9. International Commission On Microbiological Specification For Food. Microorganismos de los alimentos, 2 ed. Zaragoza, Acribia, 1983. v.1, 431p.
10. International Commission On Microbiological Specifications For Foods. Microorganismos de los alimentos, Zaragoza, Acribia, 1981. v.2, 215p.
11. Jay, J.M. Microbiología moderna de los alimentos. 2 ed. Zaragoza, acribia, 1978, 491p.
12. Koscec, I.; Zivkovic, J.; Hadziosmanovic, M. Study of extent of initial bacterial contamination of meat of healthy and diseased animals. *Veterinarski Arhiv*, 51 (suppl):82-4, 1981.
13. Lachica, R.V.F.; Genigeorgis, C.; Hoerich, P.D. Metachromatic agar diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. *Appl. Microbiol.*, 21:585, 1971.
14. Ribeiro, A.M.P. Padrões bacteriológicos de alimentos portugueses. *Rev. Microbiol.*, 5:17-25, 1974.
15. São Paulo. Secretaria da Saúde. Normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas. In: Regulamento da promoção, preservação e recuperação da saúde no campo da competência da Secretaria de Estado de São Paulo, 1978, p.153-4.
16. Subcommittee On Taxonomy Of Staphylococci And Micrococci. Minutes of First Meeting (5th - 6th October, 1964). *Int. Bull. Bact. Nomencl.*, 15:107-8, 1965.
17. Takacs, I. Hygiene in pig slaughter. II. Slaughter technology with skinning. *Magyar Allatorvosok*, 41:471-6, 1986 apud *Food Sci. Technol. Abst.*, 20:35-83, 1988.
18. Ternstrom A. & Molin, G. Incidence of potencial pathogens on raw pork, beef and chicken in sweden, with special reference to *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *J. Food. Prot.*, 50:141-6, 1987.
19. Vanderzant, C. & Nickelson, R. A Microbiological examination of muscle tissue of beef, pork, and lamb carcasses. *J. Milk Food Technol.*, 32:357-61, 1969.
20. Zelante, F. Contribuição para o estudo de *Staphylococcus aureus* isolados de canais radiculares. São Paulo, 1974. (Tese Livre Docência - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).

Recebido para publicação em 27/06/90

EFFECT OF CULTURE CONDITIONS ON MUTACIN PRODUCTION

Marcia Pinto Alves Mayer
Flávio Zelante
Maria Regina Lorenzetti Simionato

SUMMARY

Bacteriocins produced by *S. mutans*, named mutacins, influence the composition of dental plaque and are considered as possible agents in preventing dental caries, besides their use in epidemiological studies, as strain markers. In the present study, the production of mutacins was evaluated in different culture conditions on solid media. The use of BHIA or TSA, and incubation at microaerophilic or anaerobic condition showed the same diameter of inhibition zones. The addition of sucrose did not stimulate mutacin production, but the addition of 2-4 per cent of yeast extract enhanced the diameter of inhibition zones against *S. sanguis* I by one strain of *S. mutans*, but not by the other. There was an increase in inhibition zones when the pH of the medium was lowered, the maximum activity being reached at 5.5, the lowest pH tested.

Key words: Bacteriocins, mutacins, *Streptococcus mutans*

INTRODUCTION

The role of *Streptococcus mutans* in the etiology of dental caries in man is already established (16). The cariogenic plaque is formed through the selection of *S. mutans* in detriment to other species such as *S. sanguis*. This selection is possible mainly due to its aciduricity, but other factors, such as bacteriocin production has also been suggested (16). Owing to their stability and diversity in inhibitory spectrum, bacteriocins produced by *S. mutans*, mutacins (8), are used for typing this bacteria in epidemiological studies (1,2,15,20). There is also evidence that these inhibitors produced by bacteria may influence the microbial composition of plaque *in vitro* (6) and *in vivo* (12,13,14,23), and they are considered as possible agents in preventing dental caries (11,14).

Several authors (4,9,18,19) showed a variation in the production of bacteriocins in different media, but many variables remain to be studied. The aim of the present study was to analyse the production of mutacins by distinct strains of *S. mutans* in different cultural conditions.

MATERIAL AND METHODS

Microorganisms - Thirteen freshly isolated strains of *S. mutans*, stored in defibrinated sheep blood at -20°C, were used as bacteriocin producer strains. *S. sanguis* I (ATCC 10.556), *S. sanguis* II (ATCC 10.557), *S. mutans* (CM 7, serotype c), *S. mutans* (IA-5, serotype c), *S. sobrinus* (73-2), *Rothia dentocariosa* (ATCC 14.190) and *A. viscosus* (WVU 627) were arbitrarily selected

as indicator strains. For the more detailed studies, two strains of *S. mutans* were selected as producers, and *S. sanguis* I (ATCC 10.556) as indicator.

Strain characterization - *Streptococcus mutans* strains were identified by biochemical tests(10). Fermentation of carbohydrates were performed by the method of Facklam(5). Hydrolysis of esculin and arginine were tested according to the method of Sands et alii(21) and Niven et alii(17), respectively. Bacitracin resistance was checked by using the method described by Sklair & Kenne (22). Production of hydrogen peroxide was made according to Wittenbury(24).

Media - Tryptic Soy Broth (Difco) and Brain Heart Infusion Broth (Difco) containing 1.5 per cent agar (Difco) were used for mutacin detection (TSA and BHIA).

Mutacin activity was also assayed in the following media: TSA supplemented with 1, 2, and 4% of yeast extract (Difco); TSA with 1, 2 and 5% of sucrose (Reagen); and TSA buffered, with phosphate buffer, pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 and 8.0.

Detection of mutacin activity - The thirteen mutacin producing strains were inoculated deep into TSA by needle, and the plates were incubated for 48 h at 37°C under microaerophilic (candle jar) condition. At this time, 7.5 ml of molten TSA(0.75% agar) to which 0.1 ml of the appropriate dilution of an overnight broth culture of the indicator strain had been added, was poured over the surface of each plate. The plates were reincubated overnight at 37°C, and then the diameter of each resultant inhibition zone was recorded in centimeters. Activity was defined as positive if an inhibition zone appeared around the stab inoculated with culture of the producer strain.

Resistance of mutacins to chloroform treatment - The same procedures described to detect bacteriocin activity were repeated. After growth of the producers strains, the plates were submitted to the action of chloroform at 37°C for 30 minutes, and aired for two hours. Then, the indicator pellicules were added.

Production of bacteriocins in BHI agar — The same procedures described to detect bacteriocin activity were repeated using BHIA instead of TSA.

Production of bacteriocins under anaerobic atmosphere - The same procedures described to detect bacteriocin activity were repeated using anaerobic incubation instead of the microaerophilic condition.

Production of bacteriocins in enriched and buffered media - For evaluation of different cultural conditions on mutacin production, two strains of *S. mutans* (11-1 and 47-1) which exhibited the largest inhibition zone against *S. sanguis* I were selected, and the same procedures described above were repeated. The media tested included TSA containing 1, 2, and 4 per cent of yeast extract; 1, 2 and 5 per cent of sucrose; and buffered TSA pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 and 8.0.

All the experiments were performed in duplicate.

RESULTS

Thirteen conditions for bacteriocins production were examined.

The inhibitory spectrum was the same in TSA under microaerophilic or anaerobic incubation or in BHI agar for all strains tested (Table 1).

The diameter of the inhibition zones was nearly the same on TSA or BHIA for both strains of *S. mutans* (Table 2). Mutacin production was evident under both microaerophilic and anaerobic incubation. The inhibitory activity was also shown after chloroform treatment. The addition of 2% of yeast extract enhanced the inhibition zone for one strain tested (11-1), but not for strain 47-1 (Table 3). The production of mutacin was also detected with addition of sucrose, but no increase in inhibition zone was observed (Table 3). Results with buffered media indicated that the zones of inhibition were not caused by acid production; the indicator strain *S. sanguis* I, grew equally well on all the buffered plates, but the size of inhibition zones increased by lowering the pH. There was no growth of producer strain in pH 8.0 (Table 4).

DISCUSSION

The evidence that the inhibitory activity studied was not associated with lytic phages was obtained observing that chloroform treatment had no apparent effect on inhibitory zones formation(8).

Mutacins were active on various Gram-positive bacteria, showing a broad spectrum. Al-

TABLE 1 - Inhibitory spectrum of the bacteriocins produced by *Streptococcus mutans*.

Producers	11-1	13-3	31-2	33-2	40-2	47-1	57-1	66-2	70-3	72-2	73-1	75-2	79-3
Indicators													
<i>A. viscosus</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. sanguis</i> I	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. sanguis</i> II	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>R. dentocariosa</i>	+	+	+	+	+	+	NT	+	-	+	+	-	-
<i>S. mutans</i> -e	+	+	+	+	+	+	NT	+	-	+	+	-	-
<i>S. mutans</i> -c	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
<i>S. sobrinus</i>	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

+ indicates inhibition of indicator strain.
 - no inhibition.
 NT not tested.

TABLE 2 - Diameter of the inhibition zones of *S. sanguis* I, in cm, produced by *S. mutans* strains 11-1 and 47-1, in different cultural conditions.

cultural conditions	<i>S. mutans</i>	
	11-1	47-1
TSA - anaerobic	2,7/2,8	2,3/2,5
TSA - microaerophilic	2,8/3,0	2,3/2,5
BIIIA - microaerophilic	2,7/2,9	2,3/2,4

TABLE 3 - Diameter of the inhibition zones of *S. sanguis* I, in cm, produced by *S. mutans* strains 11-1 and 47-1, in different concentrations of sucrose and yeast extract.

cultural conditions	<i>S. mutans</i>		
	11-1	47-1	
sucrose	1%	2,0/2,2	1,7/1,8
	2%	2,4/2,5	1,8/1,7
	5%	2,5/2,3	2,0/2,0
yeast extract	1%	2,8/2,4	2,5/2,5
	2%	3,5/3,0	2,8/2,5
	4%	3,0/3,0	2,5/2,8

TABLE 4 - Diameter of the inhibition zones of *S. sanguis* I, in cm, produced by *S. mutans* strains 11-1 and 47-1, in different pH.

pH	<i>S. mutans</i>	
	11-1	47-1
5,5	3,0/3,2	2,4/2,5
6,0	1,8/2,0	1,6/1,2
6,5	2,0/1,5	1,0/0,9
7,0	0,7/0,7	0,0/0,7
8,0	NG	NG

NG: no growth of the producer strain.

though tests for mutacin production are often performed under anaerobic incubation, it was observed that this may not be necessary since inhibition could be demonstrated both in microaerophilic and anaerobic incubation of the producer strains. Those results agree with Hamada & Ooshima(9), and demonstrate that the activity is not due to accumulation of hydrogen peroxide.

It should also be noted that production of mutacins was influenced by culture medium. As observed in other studies(4,9,19), the addition of sucrose, resulting in extracellular polysaccharide formation did not prevent release of mutacin by producer strains, which may be of importance in the dental plaque *in vivo*. The production of mutacin by one of the producer strains was increased in medium containing 2% of yeast extract. Although the mechanism by which yeast extract stimulate the production of mutacins by some strains is not elucidated, the addition of this agent should be recommended, as in agreement with other authors (9,18).

Although low pH enhanced inhibitory zone, acids were not themselves responsible for this action because inhibition was present on buffered media. The increased inhibitory activity in low pH may be of importance in the natural environment of *S. mutans*, such as in the cariogenic plaque, where pH near 5.0 are often reached. A similar result by lowering the pH in solid media was also observed by Caulfield et alii (3). The mutacins are heterogenous not just in the inhibitory spectrum, but also in their physical and chemical properties. Fukushima et alii(7), reported that the activity of the purified bacteriocin RM-10 was completely lost at pH below 6.0. On the other hand the bacteriocin produced by strain C3603, purified by Ikeda et alii(13), showed stability between pH 1.0 to 12.0, but no increase in activity was mentioned.

Whether the increased inhibitory activity in acid pH reported here was due to an increase in production of mutacin or due to increased activity of the mutacins remains to be elucidated in cell free extract studies.

RESUMO

Efeito das condições de cultura na produção de mutacina

Bacteriocinas produzidas por *S. mutans*, denominadas mutacinas, influenciam a composição da placa dental, e são consideradas possíveis agentes na prevenção da cárie, além de serem usadas como marcadores em estudos epidemiológicos. Os autores avaliaram a produção de mutacinas em diferentes condições culturais, em meios sólidos. O uso de ágar BHI ou TSA, e a incubação em microaerofilia ou anaerobiose levou a obtenção de halos de inibição de tamanhos semelhantes. A adição de sacarose não estimulou a produção de mutacinas, porém a adição de 2-4 por cento de extrato de levedura aumentou a zona de inibição contra *S. sanguis* I por uma das cepas de *S. mutans*. Com a diminuição do pH do meio houve um aumento na inibição, sendo atingida a atividade máxima em pH 5,5, o menor valor testado.

Palavras chaves: Bacteriocina, mutacina, *Streptococcus mutans*

ACKNOWLEDGEMENTS

This investigation was supported by CNPq, grant nº 407348/87. We also thank Mr. Andemir da Silva for technical assistance.

REFERENCE

1. Azevedo R. V. P. Emprego da bacteriocinotipagem (mutacinotipagem) no rastreamento epidemiológico de estreptococos do "grupo mutans". São Paulo, 1988. 110p [PhD Thesis - Depto. de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Univ. de São Paulo].
2. Berkowitz, R. J. & Jones, P. Mouth-to-mouth transmission of the bacterium *Streptococcus mutans* between mother and Child. *Archs. Oral Biol.*, 30:377-9, 1985.
3. Caufield, P.W.; Childers, N.K.; Allen, D.N.; Hansen J.B. Distinct bacteriocin groups correlate with different groups of *Streptococcus mutans* plasmids. *Infect. Immun.* 48: 51-6, 1985.
4. Delisle, A. L. Activity of two *Streptococcus mutans* bacteriocins in the presence of saliva, levan and dextran. *Infect. Immun.*, 13: 619-26, 1976.
5. Facklam, R. R. Recognition of group D streptococcal species of human origin by biochemical and physiological tests. *Appl. Microbiol.*, 23:1131-9, 1972.
6. Fabio, U.; Bondi, F. V.; Manicardi, M.; Messi, G.; Neglia, R. Production of bacteriocin-like substances by human oral streptococci. *Microbiologica*, 10: 363-70, 1987.
7. Fukushima, H; Kelstrup, S.; Fukushima, S.; Umamoto, T.; Kaikori, A.; Sagawa, H. Characterization and mode of action of a purified bacteriocin from the oral bacterium *Streptococcus mutans* RM-10. *Archs. Oral Biol.*, 30:229-34, 1985.
8. Hamada, S & Ooshima, T. Inhibitory spectrum of a bacteriocin like substance (mutacin) produced by some strains of *Streptococcus mutans*. *J. Dent. Res.*, 54: 140-5, 1975.
9. Hamada, S. & Ooshima, T. Production and properties of bacteriocins (mutacins) from *Streptococcus mutans*. *Archs. Oral Biol.*, 20: 641-8, 1975.
10. Hardie, J. M. Oral streptococci, In: Sneath, P.H.A.; Mair, N.S.; Sharpe, M.E.; Holt, J.G., eds. *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*. vol. 2 Baltimore, Williams & Wilkins, p. 1054-63, 1986.
11. Hillman, J.D. & Socransky, S.S. Replacement therapy for the prevention of dental disease. *Adv. Dent. Res.* 1:119-25, 1987.
12. Hillman, J.D.; Dzuback, A.L.; Andrews, S. W. Colonization of the human oral cavity by a *Streptococcus mutans* mutant producing increased bacteriocin. *J. Dent. Res.*, 66:1092-4, 1987.
13. Ikeda, T.; Iwanami, T.; Hirasawa, M.; Watanabe, C.; McGhee, J.R.; Shiota, T. Purification and certain properties of a bacteriocin from *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.*, 35:861-8, 1982.
14. Ikeda, T.; Koulourides, T.; Kurita, T.; Housch, T.; Hirasawa, M. Anti- dental caries effect in rats and man of a bacteriocin purified from the oral bacterium *Streptococcus mutans* C 3603. *Archs. Oral Biol.*, 30: 381-4, 1985.
15. Kelstrup, J.; Richmond, S.; West, C.; Gibbons, R. J. Fingerprinting human oral streptococcus by bacteriocin production and sensitivity. *Archs. Oral Biol.*, 15: 1109-16, 1970.
16. Loesche, W. J. The role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol. Rev.*, 50: 353-80, 1986.
17. Niven, C.F., JR.; Smiley, K.L.; Sherman, J.M. The hydrolysis of arginine by streptococci. *J. Bacteriol.*, 43: 651-60, 1942.
18. Rogers, A.H. Effect of the medium on bacteriocin production among strains of *Streptococcus mutans*. *Appl. Microbiol.*, 24:294-5, 1972.
19. Rogers, A.H. Bacteriocin production and susceptibility among strains of *Streptococcus mutans* grown in the presence of sucrose. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 6: 547-50, 1974.
20. Rogers, A.H. The source of infection in the intrafamilial transfer of *Streptococcus mutans*. *Caries Res.*, 15: 26-31, 1981.
21. Sands, M; Sommers, H.M.; Rubin, M.B. Speciation of the viridans streptococcus. *Am. J. Clin. Pathol.*, 78: 78-80, 1982.

22. Shklair, I.L. & Keene H.J. A biochemical scheme for the separation of the five *Streptococcus mutans*. *Archs. Oral Biol.*, 19:1079-81, 1974.
23. Weerkamp, A. ; Vogels, G. D. ; Skotonicki, M. Antagonistic substances produced by streptococci from human dental plaque and their significance in plaque ecology. *Caries Res.*; 11:245-56, 1977.
24. Whittenbury, R. Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 35 : 13-26, 1964.

Received for publication in 30/06/90

NUTRIENTES, ATIVIDADES ENZIMÁTICAS E MICRORGANISMOS DO SOLO TRATADO COM VINHAÇA E OU TORTA DE FILTRO EM CULTURA DE CANA-DE-AÇÚCAR

Sâmia Maria Tauk¹

Eleni Nadai Malagutti¹

Antonio Mário Medeiros²

RESUMO

Após quatro anos de adições anuais de vinhaça e/ou torta de filtro, além de outros aditivos: agrícolas, sulfato de amônia, uréia, cloreto de potássio e adubo mineral 15-9-18, foram estudados 18 parâmetros em 48 parcelas de Latossolo Vermelho-Amarelo textura média, nas linhas e entre-linhas de cultura de cana-de-açúcar, no município de Rio Claro, SP. Amostras compostas de solo foram coletadas com trado de 0-15 cm de profundidade e durante as coletas foram feitas medições da temperatura e umidade relativa do ar. Os resultados obtidos foram analisados com os testes de variância com réplicas e o de Tukey. Verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa quanto aos tratamentos e às linhas da cultura em: temperatura do ar; temperatura do solo até 5 cm de profundidade; umidade do solo; matéria orgânica; carbono orgânico; nitrogênio total, relação C/N; atividade da invertase e no número de bactérias, actinomicetos e microrganismos capazes de crescerem em meio de sacarose ou amido ou carboximetil-celulose, como única fonte de carbono. Variações estatisticamente significativas quanto às linhas da cultura foram observadas quanto: umidade relativa do ar; temperatura do solo até 20 cm de profundidade; pH; Ca⁺²; CTC; K⁺; Al⁺³; PO₄⁻³ e número de fungos filamentosos. Somente os teores de Mg⁺² e as atividades da celulase e urease variaram quanto aos tratamentos e às linhas da cultura. Concluiu-se que a adição de torta de filtro + uréia ou torta de filtro + cloreto de potássio contribuiu para acréscimo do teor do Mg⁺² e das atividades da celulase e urease, em relação ao adubo mineral e ao solo testemunha.

Palavras Chaves: vinhaça, adubação, microrganismos, atividade enzimática, solo.

INTRODUÇÃO

A proposta de utilização da vinhaça como fertilizante não é nova, iniciou-se com estudos realizados na "Escola Superior de Agronomia Luiz de

Queiroz" ESALQ, Piracicaba, SP (1,2). A quantidade que tem sido proposta para aplicação depende do tipo de solo e da vinhaça, da variedade de cana-de-açúcar, porém a dose de 400 m³/ha foi considerada econômica (8). Este resíduo foi caracterizado como

-
1. Departamento de Ecologia, Instituto de Biociências, UNESP. C.P.178. 13.500 Rio Claro, SP. Brasil.
 2. Usina São João. 13.600 Araras, SP. Brasil.

não tendo metais pesados, vírus e policlorados e considerado semelhante a uma adubação potássica, cálcica e sulfatada (24). Os efeitos citados sobre o cultivo de cana-de-açúcar foram a maior produtividade e aumento no solo do pH, da embebição da capacidade de troca catiônica (CTC), da soma de bases, da pressão osmótica e de sais solúveis (30).

A dosagem de vinhaça adicionada ao solo deverá ser controlada para evitar o acréscimo gradual da salinidade do mesmo ou qualquer desequilíbrio da atividade e dinâmica da matéria orgânica do solo (17). A adição deste resíduo acarreta dispersão das partículas coloidais do solo, havendo empobrecimento do mesmo, por ocorrer maior facilidade de arrastamento da fração mineral e diminuição do espaço poroso (18). Quanto aos microrganismos, a vinhaça tem demonstrado grande aumento do número de fungos do solo (25), entretanto, em cultura de milho, somente com uma única dose do resíduo, houve acréscimo do número de bactérias, de actinomicetos e de microrganismos capazes de crescer em meio contendo amido, como única fonte de carbono (26,27).

O objetivo do presente trabalho foi verificar as possíveis alterações na microbiologia, nutrientes e atividades enzimáticas do solo tratado com doses cumulativas de vinhaça com ou sem suplementação de outros fertilizantes, nas linhas e entre-linhas de cultura de cana-de-açúcar, localizada no município de Rio Claro, SP.

MATERIAL E MÉTODOS

Área em estudo, tratamento com vinhaça e outros fertilizantes e coletas - Esta área constitui uma parte da fazenda São José, localizada no município de Rio Claro, SP, cultivada com cana-de-açúcar, que substituiu uma vegetação de cerrado tipo "sensu stricto". Durante quatro anos esta cultura foi mantida em 48 parcelas e separadas entre si por corredores com 1 m de largura, sob 12 tratamentos diferentes de Latossolo Vermelho Amarelo textura média, correspondendo 4 parcelas (100 m²/cada) para cada tratamento: 1= vinhaça (60m³); 2= vinhaça (60m³) + sulfato de amônia (300 Kg); 3= vinhaça (60m³) + torta de filtro (30 ton); 4= vinhaça (60m³) + torta de filtro (30 ton) + sulfato de amônia (300 Kg); 5= torta de filtro (30 ton); 6= torta de filtro (30 ton) + sulfato de amônia (300 Kg); 7= torta de filtro (30 ton) + uréia (133,5 Kg); 8= torta de filtro (30 ton) + cloreto de potássio (117 Kg); 9= torta de filtro (30 ton) + uréia (133,5 Kg) + cloreto de potássio (117 Kg); 10= uréia (167 Kg)

+ cloreto de potássio (150 Kg); 11= fórmula 15-9-18 (500 Kg) e 12= solo testemunha. Os tratamentos foram repetidos anualmente durante quatro anos, sempre nas mesmas parcelas, que foram distribuídas aleatoriamente no início do experimento. Com exceção da vinhaça, os demais tratamentos foram feitos nas soqueiras, ou seja, dentro das linhas da cultura.

A vinhaça utilizada apresentou em média a seguinte composição em kg/m³: N, 0,33; P₂O₅, 0,12; K₂O, 3,84; CaO, 1,05; MgO, 0,51 e matéria orgânica, 2,65%. O pH = 4,5. A torta de filtro, resíduo da fabricação do açúcar, teve em média a seguinte composição (%): N, 1,35; P₂O₅, 1,10; K, 0,50; Mg⁺², 0,60; S, 1,40; cinza total, 18,20 e matéria orgânica, 81,80.

Os dados meteorológicos foram fornecidos pela FEPASA, no Horto Florestal "Navarro de Andrade", localizado em Rio Claro, SP, cerca de 47° 33'36" WG e 22° 44' S, a 610 m de altitude.

A coleta foi realizada uma única vez, após quatro anos de cultivo nas diferentes parcelas com distintos tratamentos, no mês de julho de 1986, correspondendo um mês antes do corte da planta e 14 meses após a última adição dos fertilizantes. Para cada tratamento foram coletadas oito amostras compostas de solo, quatro dentro das linhas (D.L.) e quatro nas entre-linhas (E.L.). Cada amostra composta constitui quatro sub-amostras coletadas até 15 cm de profundidade com trado, no horário das 9:00 às 12:00 horas, que foram colocadas em sacos plásticos, devidamente etiquetados. Estas amostras, no laboratório, foram processadas segundo citação da literatura (25, 28), imediatamente para as determinações de fósforo, umidade, microrganismos e atividade enzimática e para outros parâmetros foram colocadas a 4°C, até 2 meses.

Durante as coletas das amostras de solo, foram realizadas medições das temperaturas ambiente (°C) e umidade relativa do ar (%), com termohigrômetro marca Sundo, em todas as parcelas das diferentes áreas em estudos, na superfície do solo. Foram realizadas ainda medições da temperatura do solo até 5 e até 20 cm de profundidade, utilizando-se respectivamente termômetro de haste marca Incoterm e Hacı, respectivamente.

Análises químicas e físico-químicas do solo - Nas amostras de solo, foram determinados a umidade e o teor da matéria orgânica (15,25). O pH foi medido em suspensão de solo em água ou em solução salina KCl, na proporção 1:2. (12, 27). As técnicas utilizadas para determinação dos nutrientes (12), foram: K - extração de K trocável do solo, por troca iônica com solução de H₂SO₄ 0,05 N; P - extração de solúvel do

solo em solução de H_2SO_4 0,5 N; Ca e Mg - extração por troca com solução de KCl 1,0N; Al - extração do Al trocável com solução não tamponada (KCl 1,0N), titulação com solução de NaOH 0,5N; H - extração por agitação com acetato de Ca a pH e titulação com solução de EDTA e C orgânico - oxidação de matéria orgânica por via úmida.

Atividades enzimáticas - Amostras de 20g de solo foram peneiradas em malha de 2,83mm e cada uma foi colocada em frasco volumétrico de 100ml, contendo 2ml de tolueno. Após 15 minutos foram adicionados 20 ml de tampão específico para cada uma das enzimas estudadas e acrescentados 10ml de substrato também específico. Foi utilizada a metodologia citada na literatura para urease (14), invertase (9), amilase (33) e celulase (23). Os frascos foram mantidos a 37°C e após a incubação das amostras, os volumes foram completados até 100ml com água destilada, fixando o tolueno acima do menisco do balão volumétrico. As medidas e as definições das atividades e unidades, respectivamente, das enzimas foram calculadas para 100g de solo, peso seco, a 37°C (28).

Análises microbiológicas - Determinação do número de unidades formadoras de colônias de microrganismos - Foi determinado o número de bactérias (25, 26), actinomicetos (25, 26), fungos filamentosos (25, 27) e de microrganismos capazes de crescer em meio mineral (11) com 2% de ágar, acrescido de 0,5% de sacarose, amido ou carboximetil-celulose (25, 26).

Análises estatísticas - As variáveis medidas,

em cada um dos grupos experimentais, foram caracterizadas pelas médias (medida de tendência central) e pelo desvio padrão (medida de dispersão). Os dados foram analisados estatisticamente por teste de variância (21) e o teste "Tukey" (22).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados aqui obtidos foram decorrentes das condições do Latossolo Vermelho-Amarelo textura média, do uso do solo, das condições climáticas e do tipo de cultura estudada. Com as medidas das condições climáticas durante 14 anos, observou-se que menor precipitação ocorreu no período de agosto a setembro e a maior, correspondendo a dezembro e janeiro. Estes dois períodos, portanto são distintos, um de temperatura alta e úmido e o outro com temperatura mais baixa e seco, semelhante ao verificado para a área de cerrado, localizado no município de Corumbataí, SP (25).

As medições de fatores microclimáticos determinadas durante as coletas de amostras de solo, demonstraram que a temperatura do ar (°C), nas diferentes parcelas não foram distintas e nem mesmo quanto às linhas da cultura (Tabela 1).

Em relação a umidade relativa do ar (%) não houve diferença estatisticamente significativa quanto aos tratamentos, mas foi significativamente maior dentro das soqueiras, devido a presença da vegetação (Tabela 1).

TABELA 1 - Valores mínimos e máximos de diferentes parâmetros estudados dentro da linha (D.L.) e nas entre-linhas (E.L.) do solo, até 15cm de profundidade, da cultura de cana-de-açúcar, com diferentes tratamentos. Legenda: F= teste de variância quanto às linhas (L) e quanto aos tratamentos (T).

Parâmetros	Tratamentos		F		Solo Testemunha	
	D.L.	E.L.	L	T	D.L.	E.L.
Temperatura do ar (°C)	24,9 - 26,7	22,5 - 25,2	0,30	0,23	26,3	25,1
Umidade relativa (%)	48,5 - 54,4	46,6 - 54,0	0,03	0,26	49,4	51,6
Temperatura do solo até 5 cm (°C)	22,0 - 24,4	20,0 - 22,4	0,09	0,65	24,3	22,0
Temperatura do solo até 20 cm (°C)	16,2 - 18,2	14,9 - 16,0	0,02	0,94	18,0	16,0
Umidade do solo (%)	5,0 - 7,0	5,4 - 7,5	0,25	0,21	5,2	6,6
Matéria orgânica (%)	2,7 - 4,0	2,2 - 4,0	0,97	0,72	2,9	2,9
Nitrogênio Total (%)	0,15 - 0,22	0,11 - 0,20	0,83	0,19	0,15	0,15
Relação carbono/nitrogênio	11,32 - 11,72	11,35 - 12,00	0,46	0,62	11,61	11,71
pH	4,8 - 6,2	4,8 - 5,0	0,00	0,33	5,5	4,5
Carbono orgânico (%) meq/100g de solo	1,62 - 2,45	1,28 - 2,3	0,72	0,39	1,68	1,70
Ca ⁺²	0,40 - 2,90	0,20 - 0,80	0,00	0,26	0,57	0,21
Mg ⁺²	0,17 - 0,60	0,08 - 0,37	0,13	0,00	0,45	0,11
ClC	3,20 - 5,50	3,10 - 4,50	0,01	0,69	4,33	4,47
K ⁺	0,03 - 0,10	0,03 - 0,15	0,00	0,44	0,05	0,04
Al ⁺³	1,50 - 3,40	2,90 - 4,60	0,00	0,23	3,25	4,02
PO ₄ ⁻² ug/100g de solo	5,80 - 89,00	4,00 - 12,50	0,00	0,81	10,33	4,0

As temperaturas do solo medidas até 5 e até 20 cm de profundidade corresponderam às médias das temperaturas das diferentes camadas do solo, (Tabela 1) e não foram diferentes estatisticamente quanto aos tratamentos utilizados. Em relação às linhas da cultura, somente a temperatura do solo até 20 cm de profundidade apresentou-se maior dentro das soqueiras, provavelmente devido a maior atividade microbiana na região da rizosfera, em relação ao solo das entre-linhas (Tabela 1). Esta maior temperatura do solo nas soqueiras foi concordante com o fato de que a cobertura vegetal pode influir na estabilidade da temperatura do solo, pois quanto maior a primeira, menor será a amplitude térmica (10).

A umidade, matéria orgânica, pH, carbono orgânico, nitrogênio total, relação C/N, Ca^{+2} , CTC, Al^{+3} e fósforo não apresentaram variações estatisticamente significativas quanto aos tratamentos utilizados (Tabela 1). Estes resultados podem estar relacionados, com o fato das amostras do solo terem sido realizadas 14 meses após a aplicação dos tratamentos aqui estudados. Verificou-se anteriormente (25) que os efeitos da adição de vinhaça no solo permaneceram, sobre alguns parâmetros, somente até três meses, o que poderia explicar os resultados aqui obtidos.

A ausência do acréscimo do pH em relação aos tratamentos foi concordante com outro resultado citado na literatura (4), quanto a adição de vinhaça. Quando este resíduo do tipo mosto e melaço foi utilizado semelhantemente no solo e cultura aqui estudados, em doses de 50 m³/ha, houve um efeito fertilizador (20). Considerou-se, entretanto, que a vinhaça aqui utilizada, tipo caldo misto, é mais pobre em nutrientes do que aquelas acima citadas, portanto, acarretando efeitos distintos.

Somente o íon Mg^{+2} sofreu modificações quanto aos tratamentos, sendo que diferenças estatisticamente significativas não foram observadas em relação às linhas da cultura (Tabela 1). Quando comparou-se o efeito dos tratamentos entre si, com o teste da menor diferença, verificou-se que não houve variação do íon entre os tratamentos: vinhaça + torta de filtro / vinhaça + torta de filtro + sulfato de amônia; torta de filtro / torta de filtro + cloreto de potássio; adubo mineral / torta de filtro; adubo mineral / torta de filtro + cloreto de potássio e entre o solo testemunha / vinhaça + torta de filtro (Figura 1). Em relação ao solo testemunha, de modo geral houve acréscimo do íon Mg^{+2} em todos os tratamentos, com exceção da vinhaça com ou sem suplementação de torta de filtro e/ou sulfato de amônia e também com a adição de cloreto de potássio + uréia. Somente nos tratamentos com

torta de filtro + uréia ou torta de filtro + cloreto de potássio houve acréscimo do íon Mg^{+2} , em relação ao adubo mineral (Figura 1). Assim, a torta de filtro com tais suplementações poderá substituir o adubo mineral, quando o solo for deficiente deste íon. O efeito da torta de filtro sobre o acréscimo do Mg^{+2} no solo pode constituir-se de grande importância pois, a deficiência deste íon produzirá efeito indireto sobre o aproveitamento do fósforo. O primeiro compete com o alumínio e o ferro pelo íon H_2PO_4^- , forma solúvel, formando fosfato de magnésio que tem sido mais disponível (13).

A ausência de variações dos nutrientes quanto aos tratamentos utilizados pode estar relacionada com o período de amostragem do solo, isto é, 14 meses após a adição dos aditivos agrícolas. O fator linha e entre-linha atuou significativamente sobre pH, Ca^{+2} , K^+ e fósforo que tiveram maiores valores e Al^{+3} que teve menor valor nas soqueiras da cultura (Tabela 1).

Com exceção dos tratamentos vinhaça e vinhaça + sulfato de amônia, nos demais os teores da CTC foram superiores a 4,0 meq/100 cm³ considerado ideal para a cultura de cana-de-açúcar (12). Os teores de K^+ , entretanto, foram inferiores a 0,15 meq/100cm³, fornecendo ao solo aspectos deficitários deste íon (12). Quanto ao Al^{+3} , os resultados demonstraram que os tratamentos nas soqueiras, contribuíram para o decréscimo do íon que favorece as condições do solo. Considerou-se que o teor de Ca^{+2} mais alto nas soqueiras ao contrário do Al^{+3} , pode ser resultante de maior liberação do primeiro pelo decréscimo deste último, nas mesmas (Tabela 1).

O fósforo pode ser fixado pela argila e os componentes amorfos de alumínio (11), este último decrescendo dentro das linhas contribuiu provavelmente para o aumento do primeiro. Grandes doses de vinhaça acarretaram lixiviação do fósforo, pois os componentes orgânicos presentes na mesma, competem pelos mesmos sítios de adsorção do elemento. A ação dos microrganismos do solo também atua, a curto prazo, na imobilização do fósforo orgânico (6).

Os tratamentos do solo aqui utilizados não alteraram significativamente as atividades da invertase e da amilase, ao contrário do observado para as atividades da celulase e urcase (Tabela 2). A atividade da amilase do solo em estudo foi inferior àquela citada para os solos do município de Jaboticabal (16). Quanto a atividade da celulase constatou-se que houve acréscimo da mesma no solo com os tratamentos torta de filtro e torta de filtro + sulfato de amônia ou uréia ou cloreto de potássio ou

TABELA 2 - Valores mínimos e máximos de diferentes parâmetros estudados dentro da linha (D.L.) e nas entre-linhas (E.L.) do solo, até 15cm de profundidade, da cultura de cana-de-açúcar, com diferentes tratamentos. Legenda: F= teste de variância quanto às linhas (L) e quanto aos tratamentos (T).

Parâmetros	Tratamentos		F		Solo Testemunha	
	D.L.	E.L.	L	T	D.L.	E.L.
Unidades						
Invertase	1,44 - 5,40	2,00 - 3,18	—	—	1,44	2,7
Amilase	4,50 - 9,50	2,50 - 3,50	0,00	0,06	4,8	2,5
Celulase	18,00 - 200,00	8,00 - 20,00	0,02	0,01	58,0	12,3
Urease	4,50 - 20,00	1,80 - 19,10	0,01	0,03	11,4	6,17
U.F.C./g de solo (p.o) Bactérias (x10 ¹⁰)	5,0 - 6,0	0,4 - 90,0	0,64	0,33	4,0	26,3
Actinomicetos (x10 ¹⁰)	3,0 - 9,0	1,0 - 4,0	0,40	0,78	0,02	0,01
Fungos Filamentosos (x10 ⁸)	0,6 - 6,0	0,1 - 95,0	0,01	0,91	0,007	0,1
Microorganismos capazes de crescerem em meios de:						
sacarose (x10 ⁶)	4,0 - 30,0	8,0 - 40,0	—	—	0,03	0,08
Amido (x10 ⁶)	6,0 - 10,0	6,0 - 200,0	0,47	0,55	0,05	1,64
Carboximetil-celulose (x10 ⁵)	1,5 - 10,0	5,0 - 11,0	0,19	0,14	0,09	0,11

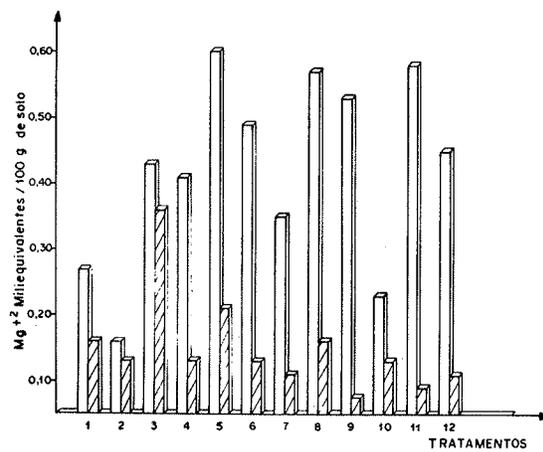


FIGURA 1 - Valores médios de Mg⁺² do solo dos diferentes tratamentos. Legenda: Dentro da linha e Entre linhas.

uréia + cloreto de potássio (Figura 2).

A vinhaça, adubo mineral e uréia + cloreto de potássio não alteraram a atividade da celulase, ao contrário da vinhaça + torta de filtro + sulfato de amônia e vinhaça + torta de filtro que acarretaram decréscimo da mesma, em relação ao solo testemunha (Figura 2). Em solo sob vegetação de cerrado, doses cumulativas de vinhaça também produziram decréscimo da atividade da celulase (Tauk, S.M. - não publicado). Tem sido verificado que a adição de fertilizantes orgânicos e minerais podem provocar acréscimo da atividade da celulase (31), concordando com o efeito de alguns tratamentos

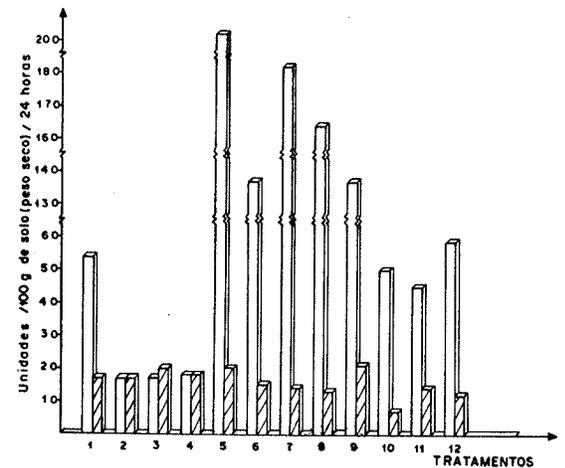


FIGURA 2 - Valores médios da atividade da celulase expresso em unidades. Legenda: Dentro da linha e Entre linhas.

aqui utilizados. Foi proposto que a atividade dessa enzima pode servir à rápida determinação do efeito de determinados tratamentos agrônômicos, podendo determinar a quantidade e qualidade de adubos que devem ser aplicados, auxiliando na escolha dos solos a serem tratados (5). Assim, verificou-se que torta de filtro com ou sem suplementação, exceto quando adicionada com vinhaça, aumenta a atividade da celulase.

Quanto á atividade da urease em relação ao solo testemunha, houve acréscimo com os tratamentos: vinhaça + torta de filtro; vinhaça + torta de filtro + sulfato de amônia e cloreto de potássio

+ uréia. A adição de adubo mineral acarretou decréscimo da atividade da urease e os demais tratamentos não produziram alterações nesta atividade. Entre os tratamentos, verificou-se que o efeito da vinhaça foi estatisticamente igual ao da torta de filtro e somente a adição da vinhaça + torta de filtro + sulfato de amônia acarretou um acréscimo da atividade da urease em relação aos dois primeiros (Figura 3). O aumento da atividade da urease foi acarretado por aditivos orgânicos, temporariamente, voltando imediatamente às condições do solo não tratado (3).

O efeito das linhas não foi observado somente para a atividade da invertase, para as demais enzimas verificou-se aumento das mesmas nas soqueiras da cultura. Observou-se, portanto, que maior atividade do solo, expressa pela atividade enzimática ocorreu na região da rizosfera, onde a maioria dos fertilizantes foram adicionados.

Os microrganismos foram estudados em relação a seis grupos distintos, isolados do solo com, meios específicos para cada um deles. O número de bactérias, actinomicetos, fungos fila-

mentosos e microrganismos capazes de crescerem em meio de cultura com sacarose ou amido ou carboximetil-celulose, como única fonte de carbono não sofreu variação estatisticamente significativa quanto aos tratamentos (Tabela 2). Este efeito pode estar relacionado com o período de amostragem de solo realizado 14 meses após a adição dos fertilizantes no solo. Considera-se que o efeito dos mesmos pode ser dentro de um período curto, uma vez que para a vinhaça foi observado que seu efeito sobre o número de microrganismos permaneceu somente até 90 dias, com exceção dos fungos filamentosos (25).

Os fungos mais abundantes no solo da cultura de cana-de-açúcar, em estudo, foram em ordem decrescente: *Penicillium*, *Chaetomium*, *Fusarium*, *Mycelia sterilia*, *Trichoderma*, *Verticillium*, *Absidia* e *Aspergillus*. Os gêneros *Penicillium* e *Trichoderma* têm sido citados como dominantes em solo ácidos (19). O gênero *Verticillium* apareceu com alta quantidade em outro tipo de solo (32), porém não foi citado na área de cerrado de Mogi Guaçu, SP (7). O gênero *Trichoderma* apareceu em grande quantidade no solo e também em área de cerrado, tendo seu número aumentado com adição de doses cumulativas de vinhaça (25). Os micélios estéreis constituem um grupo indefinido, muitas vezes abundante no solo como foi demonstrado nos resultados aqui obtidos e por outro autor (25). Por não apresentar estruturas de reprodução capazes de revelar o grupo a que pertencem, eles foram denominados de *Mycelia sterilia*.

Em solo sob vegetação de cerrado, a vinhaça aumentou o número de microrganismos capazes de utilizar sacarose, como única fonte de carbono, porém os valores encontrados foram inferiores (29), àqueles observados na área em estudo. No caso particular, a adição dos fertilizantes estudados apresentou uma tendência para acarretar decréscimo destes microrganismos, independentemente do tratamento utilizado (tabela 2). O número de microrganismos capazes de utilizar amido, como única fonte de carbono, foi aproximado àquele verificado em solo sob vegetação de cerrado (29) e sendo menor em relação ao encontrado em solo de cultura de milho (26).

Não houve efeito das linhas sobre o número de microrganismos, com exceção dos fungos filamentosos que foi significativamente menor nas soqueiras da cultura. Considerando o modelo de correlação dos parâmetros em estudo, porém em solo sob vegetação de cerrado (Tauk, S.M. - não publicado), seria aqui esperado que nas soqueiras onde houve maior atividade de enzimas, ocorresse também um maior número de fungos filamentosos, fato este não observado.

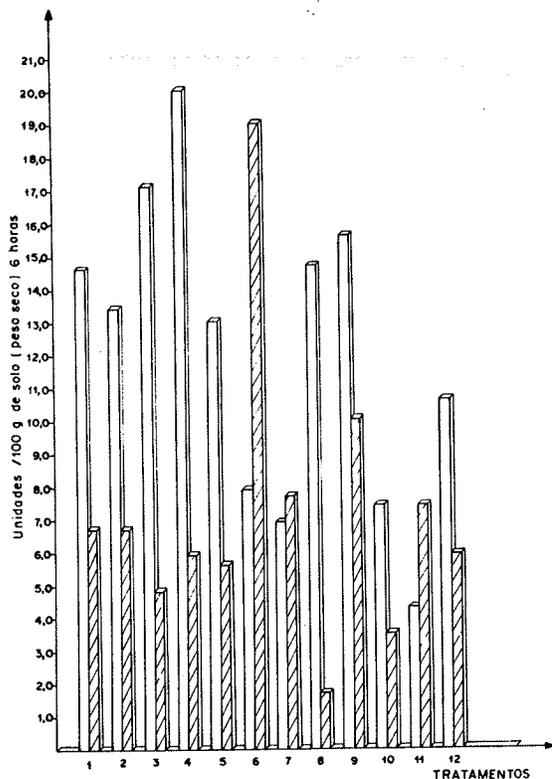


FIGURA 3 - Valores médios da atividade da celulase expresso em unidades. Legenda: □ Dentro da linha e ▨ Entre linhas.

Assim verificou-se que somente o íon Mg^{+2} e as atividades da celulase e urease apresentaram diferenças estatisticamente significativas quanto aos tratamentos. Concluiu-se que a adição de torta de filtro + uréia ou torta de filtro + cloreto de potássio contribuiu para acréscimo do íon Mg_2 e da atividade da celulase em relação ao adubo mineral e ao solo testemunha. A adição de vinhaça suplementada com torta de filtro + sulfato de amônia acarretou acréscimo na atividade da urease. Observou-se, portanto, que a adição de vinhaça não beneficiou as características que expressam a atividade do solo, ao contrário do observado para a torta de filtro, destacando-se que o adubo mineral acarretou decréscimo da atividade enzimática.

AGRADECIMENTOS

Agradeço às instituições CNPq e FINEP por concederem diferentes tipos de auxílio financeiro, à Usina São João, município de Araras, SP, por permitir a realização dos estudos da área de cultura de cana-de-açúcar.

SUMMARY

Nutrients, enzymatic activities and microorganisms of soil treated with vinasse and/or filter cake in sugar cane culture.

After four years of addition of vinasse and/or cake filter, with others treatments, were studied eighteen parameters in Reddish-Yellow Latosol medium texture, 0-15 cm deep, of sugar cane culture. Air temperature and relative air moisture were determined during the sampling in plots. These treatments were applied yearly for four years, after the cane was cut. Soil samples were collected one month prior to cane harvest, both in rows and between rows. The results obtained were analysed by test of variance and Tukey's test. The results were not statistical different in relation of treatments or rows and between rows for: air temperature; temperature by 5 cm deep; moisture; organic matter; organic carbon; total nitrogen; C/N rate; activity of invertase and numbers of bacteria, actinomycetes and microorganisms able to grow in culture medium with sucrose, starch or carboximethyl cellulose as the only carbon source. Other parameters had variation in relation of rows and between rows of sugar cane culture: relative air moisture; temperature by 20 cm deep; pH; Ca^{+2} ; K^{+} ; Al^{+3} , CTC,

PO_4^{-2} and numbers of filamentous fungi. The Mg^{+2} and activities of cellulase; and urease were changed in relation of treatments and rows and between rows of cultures. It is concluded that the addition of filter cake + urea or + potassium chlorate permitted better results for Mg^{+2} and activities of cellulase and urease contrary to the mineral fertilizer and control soil.

Key words: vinasse, microorganisms, enzymatic activities, soil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, J.R.; Ranzani, G & Valsechi, O. - La vinasse dans l'agriculture. *Bol. Inst. Zimotécn. ESALQ*, 1:1-21, 1950.
- Arruda, H.C. de. - Aplicação econômica da vinhaça na adubação da cana-de-açúcar. *Bol. Inst. Agron.*, Campinas, SP, 144:1-90, 1957.
- Bremmer, J.M. & Douglas, L.A. - Effects of some urease inhibitors on urea hydrolysis in soils. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 37:225-6, 1973.
- Copersucar - Effect of vinasse application as fertilizer in sugar cane. São Paulo, SP, 1977. 28p.
- Dantas, M.C. & Drozdowicz, A. - Influência dos adubos minerais na atividade celulolítica em solos de cerrado. *Rev. Microbiol.*, 31:25-34, 1972.
- Enweszor, W.O. - Soil estino for phosphorus in some Nigerian soils. III. Forms of phosphorus in soil as Southeastern Nigeria and their relationship to plant available phosphorus. *Soil Sci.*, 124:27-33, 1977.
- Grandi, R.P. - Hifomicetos de solo no cerrado da reserva biológica de Mogi Guaçu (São Paulo, Brasil) e triagem da ação amilolítica, celulolítica e proteolítica. São Paulo, SP, Esc. Paul. de Med., 1984. 114p. Dissertação de Mestrado.
- Guimarães, E.; Betke, E.G. & Bassinelo, J.L. - Determinação da dose econômica da vinhaça na adubação da cana-de-açúcar. *O solo*, (2):87-91, 1968.
- Hestrin, S.; Beigold, D.S. & Scramm, M. - Hexoside hidrolases. *Methods Enzymol.*, 1:251-257, 1955.
- Jorge, J.A. - Física e manejo de solos tropicais. Campinas, SP, Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1985. 328p.
- Larpen, J.P. & Larpen-Gourgand, M. - Microbiologia prática. São Paulo, SP, EDUSP e Edgard Blucher Ltda., 1975. 162p.
- Lopes, A.s. - Solo sob "cerrado". Características, propriedades e manejo. 2 ed., Piracicaba, SP, Associação Brasileira para a Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1984. 162p.
- Malavolta, E. & Klicmann, H.J. - Desordens nutricionais no cerrado. Piracicaba, Sp, Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1985. 136p.
- Mc Garity, J.W. & Myers, M.G. - A survey of urease activity in soils of Northern. New South Wales. *Plant Soil*, 27:217-238, 1967.
- Mc Leam, R.C. & Cook, W.R.I. - Practical field ecology: A guide for the Botany Departments of

- Universities Colleges and Schools. London, George Allen & Unwin Ltd., 1968. 215p.
16. Melo, W.J.; Pizauro, J.M.; Sartori, J.L. & Kaneshiro, M.A.B. - Amilase em solos do município de Jaboticabal (SP). *Rev. Bras. Ci. Solo.*, 7:213-215, 1983.
 17. Rezende, J.O. - Consequências da aplicação de vinhaça sobre algumas propriedades físicas de um solo aluvial: estudo de um caso. Piracicaba, SP, ESALQ, 1979. 142p. Tese de Doutorado.
 18. Ribeiro, S.C.; Novais, R.F. - Efeito da vinhaça sobre a dispersão da argila de amostras de Latossolos. *Rev. Ceres*, 167:12-18. 1983.
 19. Singh, K.P. - Studies in decomposition of leaf litter of important tree of tropical deciduous forests at Varanasi. *Trop. Ecol.*, 10:292-311, 1969.
 20. Sobral, A.F.; Cordeiro, D.A. & Santos, M.H.L. dos. - Efeito da aplicação da vinhaça em socarias de cana-de-açúcar. *Brasil Açuc.*, 98:368-374, 1981.
 21. Sokal, R.R. & Rohlf, F.S. - Biometry. San Francisco, Freeman and Company, 1969, 776p.
 22. Steel, R.G.D. & Torrie, J.H. - Principles and procedures of York, Ed. Mac Graw-Hill, 1960. 267p.
 23. Stevens, f. - Cellulase preparation from *Helix pomatia* (Snails). *Methods Enzymol.*, 1:173-178, 1955.
 24. Sultanum, E. & Silva, M.C.A. - A calda produzida pelas usinas e destilaria. In: Sultanum, E. & Silva, M.C.A. Os solos da região canavieira de Pernambuco. Recife, PE, AGRITEC, 1981. p.9-44.
 25. Tauf, S.M. - Effects of cumulative doses of vinasse on soil microorganisms in cerrado. *Pedobiologia*, Gustav Fischer Verlag Jena, 34:69-75.
 26. Tauf, S.M. - Microbiota telúrica de Latossolo Vermelho-Amarelo, com cultura de milho (*Zea mays*), tratado com vinhaça, no município de Rio Claro, SP. *Rev. Microbiol.*, 19:229-234, 1988.
 27. Tauf, S.M. - Aspectos da microbiota fúngica do solo de cultura de milho (*Zea mays*), tratado com vinhaça, no município de Rio Claro, SP. *Rev. Microbiol.*, 19:282-289, 1988.
 28. Tauf, S.M. & Medeiros, A.M. - Nutrientes e atividade enzimática em Latossolo Vermelho-Amarelo textura média, tratado com vinhaça, sob cultura de milho. *Eclética Química*, 14:83-94.
 29. Tauf, S.M. & Ruegger, M.S. - Alguns aspectos da microbiota do solo sob vegetação de cerrado, tratado com vinhaça, no município de Corumbataí, SP. *Rev. Microbiol.*, 18:67-76, 1987.
 30. Vieira, D.B. - Métodos de aplicação da vinhaça em cana-de-açúcar. *Saccharum APC*, 5:21-26, 1982b.
 31. Vizla, R.R. & Vinkalnc, M.D. - Role of straw as organic fertilizer in the fertility of soils. In: Problemy Kaloplenya i Ispol'zavanya organicheskikh Udobrenii, Belovss Nauch. Misk., 1976. p.79-83.
 32. Warcup, H.H. - Fungi in soil. In: Burgess, A. & Raw, F. Soil Biology, London, Academic Press, 1967. p. 51-110.
 33. Watanabe, K. & Fukimbara, T. - Studies on saccharogenic amylase produced by *A. awamori*. *J. Ferment. Technol.*, 45:335-340, 1967.

Recebido para publicação em 09/02/90

SENSIBILIDADE DO *ASPERGILLUS NIGER* AO THIRAM

Ely Nahas¹

Luiz Carlos de Assis

Aulício Pimentel da Silva

RESUMO

O fungo *Aspergillus niger* foi cultivado em meios sólido e líquido acrescidos de diferentes concentrações do fungicida thiram. Em meio sólido, contendo 60 µg/ml de thiram, o crescimento micelial foi inibido em 78% em relação ao controle e, em meio líquido contendo 30 µg/ml, esta inibição foi de 89%, após 4 dias de incubação. A produção de esporos sofreu redução de 89% frente a 50 µg/ml do fungicida. Menor teor de proteína micelial foi observado quando se aumentou a concentração do thiram, indicando que o mecanismo de síntese de proteína foi alterado. Para um período de incubação de 7 dias, não ocorreu inibição do crescimento do fungo. Também não foi observado efeito inibidor quando o fungicida foi adicionado ao meio de cultura por períodos de 1 a 4 dias, anteriores à inoculação do fungo. É possível que após um período de incubação prolongado, o fungo tenha crescido às custas do fungicida sujeito a uma degradação prévia não enzimática.

Palavras chaves: *Aspergillus niger*, thiram, fungicida.

INTRODUÇÃO

Os fungicidas constituem um grupo de produtos químicos que podem afetar uma ou mais fases do crescimento microbiano (7) sendo, por isso, utilizados para controlar doenças em vegetais. A sensibilidade de determinados fungos tem sido demonstrada "in vitro" visando estudar aspectos genéticos, como a habilidade de induzir a segregação somática em *Aspergillus nidulans* frente a diferentes fungicidas (6), ou alterações bioquímicas, como em *Rhizoctonia solani*, *Ustilago nuda* e *U. maydis* que sofreram inibição respiratória devido a falhas na oxidação de acetato e piruvato, quando carboxin e oxicarboxin foram utilizados em concentrações inibitórias do crescimento (13). A ação de fungicidas sobre microrganismos do solo pode

intervir, por meio desses mecanismos, nos ciclos biológicos alterando os processos de mineralização e síntese da matéria orgânica (15). O thiram tem sido usado no tratamento de sementes para controlar fungos que provocam o tombamento de mudas (1). Apresentou também efeito protetor no solo devido a sua ação inibitória dos fungos *Alternaria alternata* e *Bipolaris tetramera* que degradam o carbendazin (19). Seu efeito inibitório foi demonstrado "in vitro" sobre *A. niger*, associado ou não a outros pesticidas (11), e sobre a bactéria *Xanthomonas campestris* (12). Quando aplicado ao solo, estimulou as atividades das enzimas urease, desidrogenase e fosfatase (17), a nitrificação e a mineralização do fósforo (1).

Em trabalhos realizados neste laboratório (4), *A. niger* foi utilizado para ampliar o conhecimen-

1 Departamento de Microbiologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Unesp 14870 - Jaboticabal, SP, Brasil.

to sobre o mecanismo de solubilização de fosfatos de rocha. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi o de determinar o efeito do fungicida thiram no crescimento e processos fisiológicos de *A. niger*, um fungo potencialmente importante no processo de solubilização de fosfatos insolúveis no solo.

MATERIAL E MÉTODOS

Fungo - *Aspergillus niger* van Tiegham foi utilizado neste estudo.

Solução de fungicida - o thiram (bissulfeto de tetrametilurano) foi dissolvido em acetona, na concentração 0,5% (p/v), e distribuído no meio conforme a concentração estabelecida. Em ensaio preliminar, foi verificado que a acetona pode inibir o crescimento do fungo. Dessa forma, a concentração da acetona no meio de cultura foi igual em todos os tratamentos, não ultrapassando 0,5% (v/v).

Meios de cultura - o fungo foi cultivado em meio de Sabouraud por 9-10 dias, para obtenção de culturas estoque. Essas culturas foram conservadas a 4°C por, no máximo, um mês, até o momento de serem utilizadas. Suspensões dessas culturas contendo 1×10^7 conídios/ml, foram inoculadas, na quantidade de 0,5 ml, em frascos Erlenmeyer de 250 ml de meio de citrato (5), pH 5,5, suplementado com 5 mM fosfato e 1% (p/v) glicose esterilizada separadamente. Quando se utilizou cultivos sólidos, adicionou-se 1,5% (p/v) ágar ao meio de cultura e o inóculo consistiu de 0,01 ml da suspensão de esporos colocados em discos de papel de filtro, de 6 mm de diâmetro, previamente esterilizados, os quais eram a seguir dispostos no centro de placas de Petri. A incubação foi realizada à temperatura de 30°C por um período de 8 dias, a não ser em ensaios específicos (ver Resultados e Discussão).

Determinações - a produção de esporos foi avaliada após a remoção, por raspagem, dos conídios em água e contagem em lâmina de Neubauer. Após o crescimento do fungo, em meio líquido, as culturas foram filtradas através de papel de filtro Whatman nº 1 para separar o micélio do meio de cultura. O micélio foi seco a 98°C por 24 horas para se determinar o peso seco representativo do crescimento. O meio de cultura foi utilizado para se determinar os teores de açúcar redutor e fosfato residuais, respectivamente pelos métodos de Somogy (16) e Ames (2). A proteína micelial foi determinada, após sua extração (3), pelo método de Lowry modificado (8), utilizando-se albumina bovina como padrão.

Para a análise estatística, utilizou-se delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições, sendo que as médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento micelial de *A. niger* em meio sólido contendo 60 µg/ml de thiram foi inibido em cerca de 78% em relação ao controle (Fig. 1). A produção de esporos reduziu-se de 89% quando se adicionou 50 µg/ml do fungicida ao meio sólido (Fig. 2). Maior inibição do crescimento ocorreu

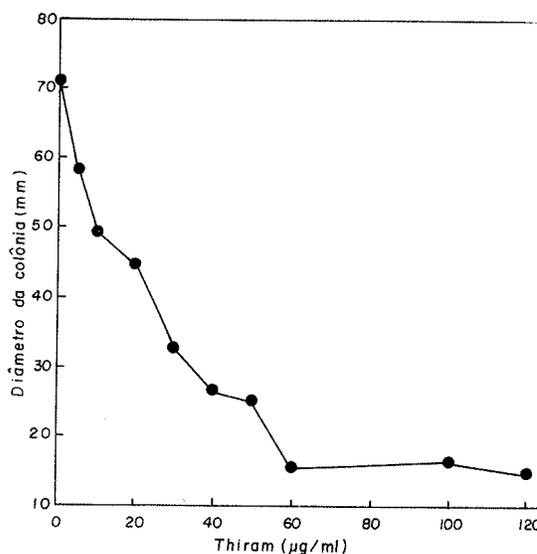


FIGURA 1 - Crescimento de *A. niger* em meio sólido adicionado de concentrações crescentes de thiram.

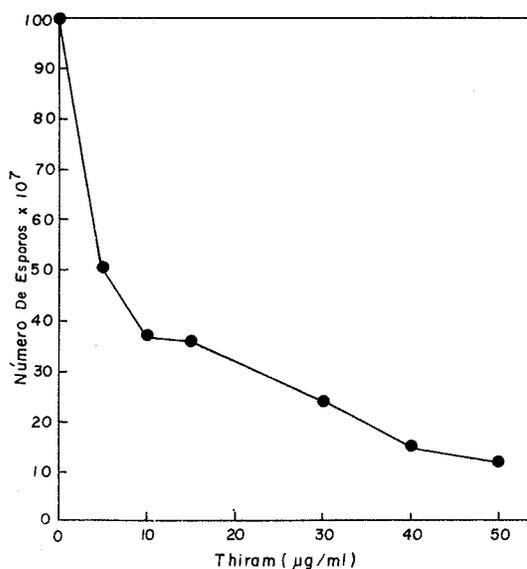


FIGURA 2 - Produção de esporos por *A. niger* submetido à concentrações crescentes de thiram.

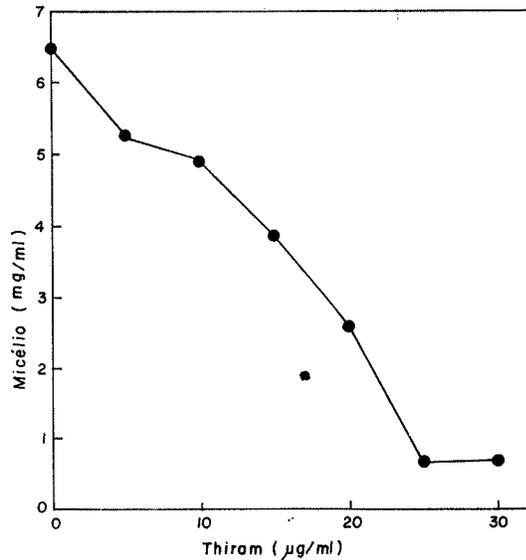


FIGURA 3 - Crescimento de *A. niger* pelo período de 4 dias em meio líquido adicionado de concentrações crescentes de thiram.

TABELA 1 - Efeito de concentrações crescentes, de thiram no peso seco de micélio, proteína micelial e na absorção de açúcar redutor e fosfato, por *Aspergillus niger*.

Thiram (µg/ml)	Micélio (mg/ml)	Proteína (µg/ml)	Açúcar redutor residual (mg/ml)	Fosfato residual (mg/ml)
0	7,98	19,21	0,36	0,37
10	6,16	12,34	1,99	0,36
20	3,49	14,54	6,47	0,40
DMS (P=0,05)	2,08	2,42	1,74	NS

NS = não significativo.

em meio líquido acrescido de 30 µg/ml de thiram, obtendo-se uma redução de 89% do peso seco, após 4 dias de incubação (Fig. 3). Essa diferença de inibição entre o crescimento em meio sólido e o meio líquido pode ser devida à presença do ágar que possivelmente favoreceu a ligação do thiram, diminuindo a sua taxa de difusão e ação fungicida, como foi verificado por Ko & col. (10) na germinação de esporos de *Alternaria solani*, submetidos a vários produtos químicos, inclusive fungicidas.

A Tabela 1 mostra o efeito da adição de concentrações crescentes do fungicida sobre o crescimento e o conteúdo de proteína micelial, açúcar redutor e fos-

fato residuais do meio de cultura. Quando o fungicida foi utilizado na concentração de 10 µg/ml, não houve diferença significativa no peso seco do micélio e no teor de açúcar redutor do meio de cultura, em relação ao controle. A inibição do crescimento ocorreu quando foi utilizada a concentração de 20 µg/ml o que, conseqüentemente, ocasionou maior acúmulo de açúcar residual. A presença do fungicida no meio de cultura acarretou menor teor de proteína micelial, mostrando que o mecanismo de síntese de proteína pode ter sido afetado. Esse tipo de resultado já havia sido observado por Weber & Ogata (18) em um isolado sensível de *Rhizopus arrhizus* ao 2,6-dicloro-4-nitroanilina mas não no isolado tolerante. Não se observou diferença significativa entre os resultados de fosfato residual, provavelmente em decorrência dos baixos teores absorvidos pelo fungo para serem apontados na determinação.

Após 7 dias de incubação do fungo em meio líquido, não se constatou inibição do crescimento, verificando-se, ao contrário, estímulo quando a concentração do thiram foi aumentada de 40 para 50 µg/ml (Fig. 4). Esses dados são comparáveis com os obtidos por Tu (17), que verificou uma redução de 50% do número de colônias de fungos, após dois dias da aplicação de thiram no solo, porém um aumento de 42% após 7 dias, embora não significativos estatisticamente em relação ao controle (17).

Para melhor compreender esses resultados, foi realizado ensaio em que o thiram foi adicionado no meio de cultura por diferentes períodos de tempo

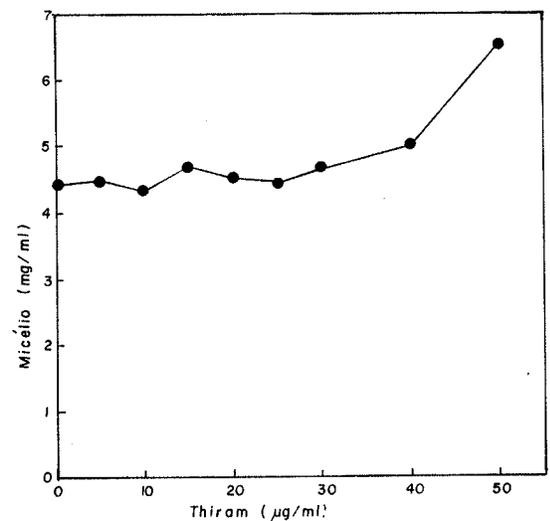


FIGURA 4 - Crescimento de *A. niger* pelo período de 7 dias em meio líquido adicionado de concentrações crescentes de thiram.

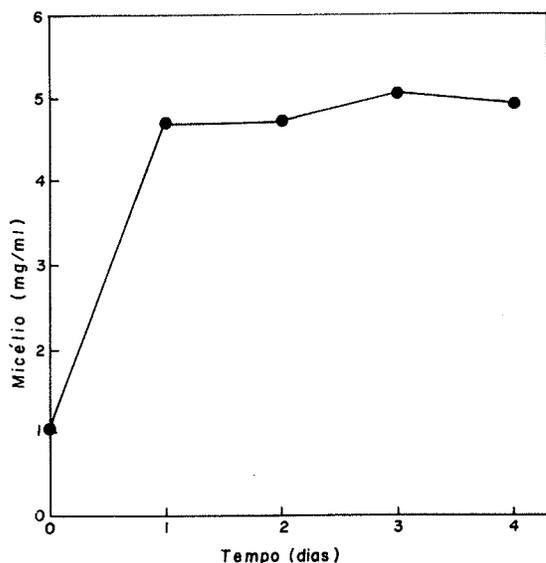


FIGURA 5 - Crescimento de *A. niger* em meio de cultura adicionado de 30 µg/ml de thiram por diferentes períodos de tempo antes da inoculação.

antes da inoculação do fungo. Como resposta, verificou-se que, quando o fungicida foi adicionado junto com o *A. niger*, houve inibição do crescimento, enquanto que a inoculação do fungo, após 1 a 4 dias da adição do thiram, não acarretou inibição (Fig. 5). Em trabalhos realizados por Raghu & col. (14), foi verificado que pela adição do thiram em solo esterilizado ou não, ocorreu diminuição do teor de componentes solúveis em clorofórmio. Entretanto, apenas no solo não esterilizado houve aumento, com o tempo, de componentes solúveis em água, comprovando que, nessa situação, ocorreu maior degradação do fungicida. Em adição, foi demonstrado que vários produtos foram formados pela degradação enzimática do thiram, por um mecanismo já estabelecido (1, 14). Por outro lado, há evidências de que os tiocarbamatos não são estáveis em soluções aquosas, podendo estar sujeitos a reações não enzimáticas de hidrólise, oxidação e isomerização (9). Com base nestas referências, pode-se supor, então, que o *A. niger* tenha crescido à custa do thiram, após um período de adaptação, período esse necessário para ocorrer degradação não enzimática do fungicida.

SUMMARY

Sensitivity of *Aspergillus niger* to thiram

The fungus *Aspergillus niger* was grown in

solid and liquid culture media containing different concentrations of the fungicide thiram. In solid medium, mycelial growth was inhibited by 78% compared to the control for a thiram concentration of 60 µg/ml, and in liquid medium, by 89% for a concentration of 30 µg/ml. Spore production was reduced by 89% when 50 µg/ml of the fungicide were added. A lower level of mycelial protein was observed when thiram concentration was increased, indicating that the mechanism of protein synthesis may have been altered. For a 7-day period of incubation, no inhibition of fungal growth occurred. Also, there was no inhibitory effect when the fungicide was added to the culture medium for a period of 1 to 4 days before inoculation of the fungus. It is possible that, after a long incubation period, the fungus had grown at the expense of the fungicide submitted to previous non-enzymatic degradation.

Key words: *Aspergillus niger*, thiram, fungicide.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agnihotri, V.P. - Thiram induced changes in soil microflora, their physiological activity & control of damping-off in chillies (*Capsicum annum*). *Indian J. Exp. Biol.* 12:85-88, 1974.
2. Ames, B.N. - Assay of inorganic phosphate and phosphatases. *Meth. Enzymol.*, 8:115-118, 1966.
3. Brown, C.M. & Rose, A.H. - Effects of temperature on composition and cell volume of *Candida utilis*. *J. Bacteriol.*, 97: 261-272, 1969.
4. Cerezine, P.C.; Nahas, E. & Banzatto, D. A. - Soluble phosphate accumulation by *Aspergillus niger* from fluorapatite. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 29:501-505, 1988.
5. Crocken, B. & Nyc, J.F. - Utilization of L- α -glycerophosphorylcholine by a lecithin deficient strain of *Neurospora crassa*. *Can. J. Microbiol.*, 9:689-696, 1963.
6. Georgopoulos, S.G.; Kappas, A. & Hastie, A.C. - Induced sectoring in diploid *Aspergillus nidulans* as a criterion of fungitoxicity by interference with hereditary processes. *Phytopathol.*, 66:217-220, 1976.
7. Georgopoulos, S.G. & Zaracovitis, C. - Tolerance of fungi to organic fungicides. *Ann. Rev. Phytopathol.* 5:109-130, 1967.
8. Hartree, E.F. - Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, 48:422-427, 1972.
9. Helling, C. S. ; Kearney, P. C. & Alexander, M. - Behavior of pesticides in soils. *Adv. Agron.*, 23: 147-240, 1971.
10. Ko, W. H.; Kliejunas, J.T. & Shimooka, J. T. - Effect of agar on inhibition of spore germination by chemicals. *Phytopathol.*, 66:363-366, 1976.
11. Lal, T. B. & Pandey, D. K. - Biological compatibility between seed-treating fungicides, insecticides,

- herbicide alachlor and macronutrient urea tested against *Aspergillus niger* van Tiegham, the incitant of collar-rot of groundnut. *Indian J. Agric. Sci.*, 51:666-668, 1981.
12. Maringoni, A. C. & Kurozawa, C.- Efeito de captan, chlorotalonil, ciclohexamida e thiram em isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye de tomateiro. *Summa Phytopathol.*, 14:107-116, 1988.
 13. Mathre, D. E. - Mode of action of oxathiin systematic fungicides. I. Effect of carboxin and oxycarboxin on the general metabolism of several basidiomycetes. *Phytopathol.*, 60:671-676, 1970.
 14. Raghu, K.; Murthy, N. B. K.; Kumarasamy, R.; Rao, S. R. & Sanc, P. V. - Fate and persistence of thiram in plants and soils. Vienna, Intern. Atomic Energy Agency, 1975. p. 137-148.
 15. Simon-Sylvestre, G. & Fournier, J. C. - Effects of pesticides on the soil microflora. *Adv. Agron.* 31:1-92, 1979.
 16. Somogy, M. Notes on sugar determination.- *J. Biol. Chem.* 195:19-23., 1952.
 17. Tu, C. M. Effects of pesticides on activities of enzymes and microorganisms in a clay soil. *J. Environ. Sci. Health*, B16:179-191, 1981.
 18. Weber, D. J. & Ogawa, J. M. - The mode of action of 2,6 - dichloro-4-nitroaniline in *Rhizopus arrhizus*. *Phytopathol.*, 55:159-165, 1965.
 19. Yarden, O.; Katan, J.; Aharonson, N. & Ben-Yephet, Y. Delayed and enhanced degradation of benomyl and carbendazim in disinfested and fungicide-treated soils. *Phytopathol.*, 75:763-767, 1985.

Recebido para publicação em 02/03/90

INFLUÊNCIA DO pH NA SÍNTESE E LIBERAÇÃO DE GLICOAMILASE POR *ASPERGILLUS AWAMORI* NRRL 3112 E *ASPERGILLUS NIGER* NRRL 337

Jesus Maria Zaldivar Agüero
Gorete Ribeiro de Macêdo²
Maria Cândida Reginato Facciotti^{1*}
Willibaldo Schmidell^{1*}

RESUMO

Estudou-se a influência do pH na síntese e liberação da glicoamilase produzida por *Aspergillus awamori* NRRL 3112 e *Aspergillus niger* NRRL 337, em meio de cultura à base de farinha de mandioca. Verificou-se que, em valores crescentes de pH, de 3,0 a 6,0, obteve-se uma maior atividade de enzima intracelular, tendo se observado que o fenômeno de retenção de glicoamilase associada às células foi mais acentuado nas cepas com menor capacidade de produção da enzima. Com relação ao *Aspergillus niger* NRRL 337, verificou-se ainda, a influência da estocagem por longos períodos de tempo na diminuição da produção de glicoamilase.

INTRODUÇÃO

A grande maioria das enzimas microbianas empregadas em escala industrial são extracelulares, isto é, enzimas que são secretadas no meio de cultivo pelas células. As enzimas tipicamente intracelulares, por terem um custo de recuperação e purificação significativamente mais elevado, possuem uma utilização mais restrita.

Algumas enzimas, como a amiloglicosidase ou glicoamilase (E.C. 3.2.1.3), embora sejam consideradas tipicamente como extracelulares, e sendo portanto recuperadas a partir do caldo fermentado, apresentam uma parcela a qual permanece associada às células, não sendo liberada para o meio.

O objetivo do presente trabalho foi o estudo da influência do pH na síntese e liberação da amiloglicosidase em duas linhagens de microrganismos, o

Aspergillus awamori NRRL 3112 e o *Aspergillus niger* NRRL 337. Com relação à esta última cepa, apresentam-se resultados obtidos em duas épocas distintas, isto é, defasados de quatro anos, período no qual o microrganismo foi conservado por meio de repiques periódicos em meio sólido.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos - Foram empregadas nos ensaios, culturas puras de *Aspergillus niger* NRRL 337 e de *Aspergillus awamori* NRRL 3112. A primeira delas foi conservada por meio de repiques, a cada 2 meses, em meio sólido de Czapek, e a segunda, em tubos contendo uma mistura de terra e areia, segundo metodologia tradicional encontrada na literatura (3). Como pré-inóculo, cultivava-se

1. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo - Depto de Engenharia Química - Caixa Postal 61548
05508 - São Paulo - SP - Brasil
- 1* Para quem a correspondência deve ser enviada
2. Universidade Federal do Rio Grande do Norte - Depto de Engenharia Química - Centro de Tecnologia
59.000 - Natal - Rio Grande do Norte - Brasil

previamente os bolores em erlenmeyers de 250 ml contendo 100 ml de meio Czapek, e a seguir, em meio líquido, em incubador rotativo a 200 r.p.m., a 35°C, durante 24 horas, obtendo-se desta forma, 1 litro de inóculo.

Meio de cultura - O preparo do meio líquido empregado no incubador rotativo e no fermentador, iniciava-se com a obtenção de uma suspensão de farinha de mandioca com 380 g/l, a qual era aquecida até 70°C, de forma a permitir a gelatinização do amido (2). Esta suspensão era filtrada de forma a se obter um xarope concentrado, o qual era diluído convenientemente, de maneira a se obter no meio líquido, uma concentração inicial de polissacarídeo (So) igual a aproximadamente 20 g ART/1 (ART= açúcares redutores totais, expressos como glicose). Para a complementação do meio, adicionavam-se ainda os nutrientes listados a seguir, em concentrações em g/l: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 5,0; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ - 3,78; KH_2PO_4 - 3,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5; extrato de levedura - 0,1.

Ensaio realizados - Foram realizados quatorze ensaios descontínuos em fermentador com 10 litros de volume útil, com ambas as cepas, empregando-se os seguintes valores de pH: 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0. A temperatura foi mantida constante em 35°C, a vazão de aeração empregada de 10 l/min, a frequência de agitação, 700 r.p.m., mantendo-se 0,2 atm de sobrepressão no fermentador.

Metodologia analítica - Os ensaios foram acompanhados através de retiradas periódicas de amostras, nas quais se faziam as determinações de concentração celular, concentração de açúcares redutores (AR), concentração de açúcares redutores totais (ART), atividade extracelular e intracelular da amiloglicosidase. A determinação da concentração celular era feita através da determinação da massa de matéria seca de microrganismos (2). A determinação da concentração de AR era executada na amostra filtrada, pelo método da glicose-oxidase (CELM - Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos - SP). A determinação da concentração de ART era efetuada através de uma hidrólise enzimática do polissacarídeo presente na amostra, utilizando-se para tanto a amiloglicosidase da Sigma Chemical Company, e efetuando-se posterior dosagem de glicose (6). A determinação da atividade extracelular era efetuada no filtrado da amostra (7), enquanto que a dosagem da atividade intracelular era executada no sedimento celular obtido após a filtração. Procedia-se inicialmente à lavagem das células com água

destilada, submetendo-se em seguida, o sedimento, a uma maceração com areia e posterior suspensão em tampão citrato (pH=4,8) (1,4). Define-se a unidade de atividade enzimática (U) como sendo a quantidade de enzima que libera 1 grama de glicose em 1 hora, a partir de solução de amido a 4% (pH=4,2), a 60°C. Ambas as atividades enzimáticas foram expressas em unidades (U) por litro de amostra, a fim de possibilitar as comparações desejadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme se pode observar na figura 1, para o *A. awamori* NRRL 3112 cultivado a pH 4,0 e 6,0, não se verificou em termos de crescimento celular, uma influência significativa do pH, atingindo-se uma concentração celular ao final da fonte de carbono, da ordem de 8g/l. Da mesma forma, um comportamento semelhante foi verificado para o *A. niger* NRRL 337, atingindo-se, como se pode observar pela figura 3, uma concentração celular final da ordem de 10g/l.

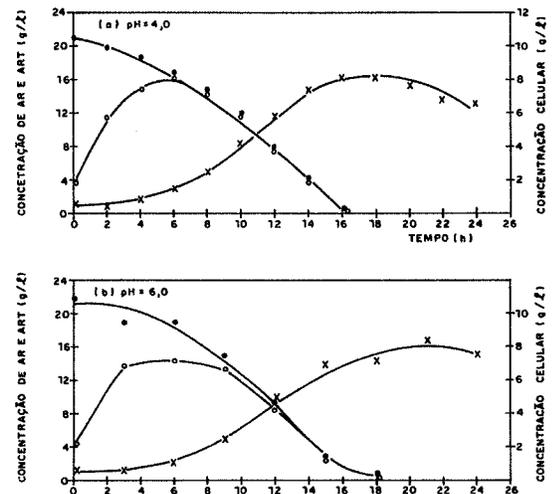


FIGURA 1 - Concentração de AR (o), ART (•) e concentração celular (x) para os ensaios com *A. awamori* NRRL 3112.

Através das figuras 2, 4 e 5, verifica-se que o pH exerce uma influência bastante acentuada nos mecanismos de síntese e liberação da glicoamilase produzida. Observa-se a pH 6,0, para todas as cepas utilizadas, a retenção de uma parcela significativamente maior de enzima associada às células (atividade intracelular), do que a pH 4,0, sendo esta inclusive superior à parcela encontrada no caldo fer-

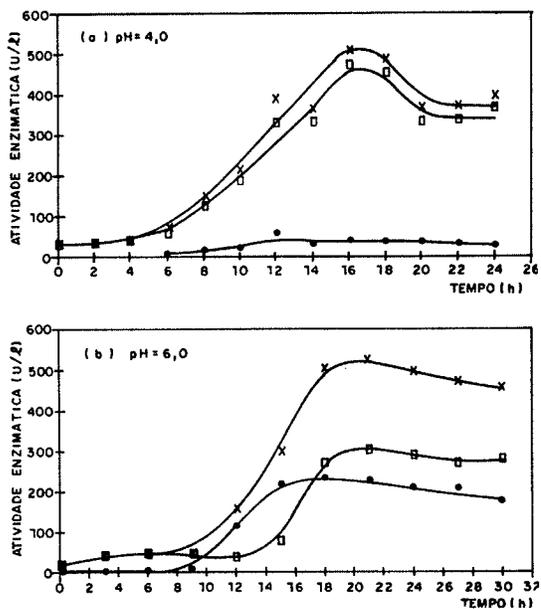


FIGURA 2 - Atividade enzimática intracelular (●) extracelular (○) e total (x) para os ensaios com *A. awamori* NRRL 3112.

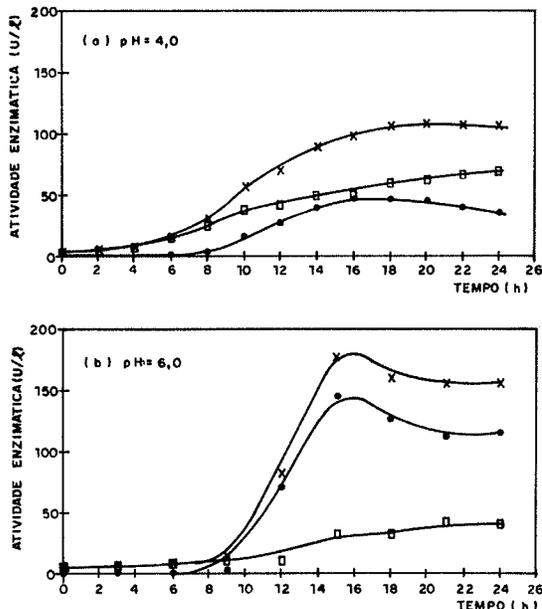


FIGURA 4 - Atividade enzimática intracelular (●), extracelular (○) e total (x), para os ensaios com *A. niger* NRRL 337.

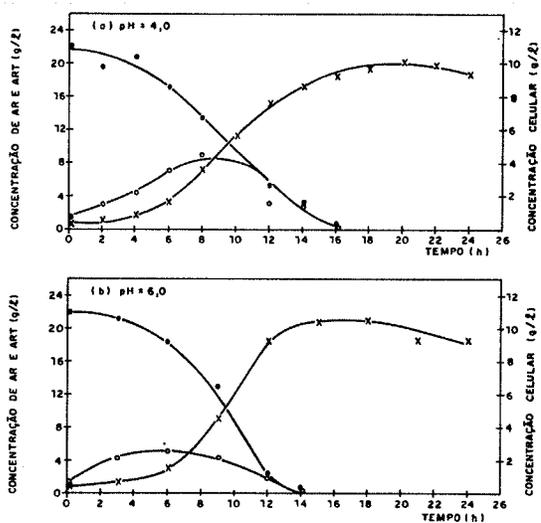


FIGURA 3 - Concentração de AR (○), ART (●) e concentração celular (x) para os ensaios com *A. niger* NRRL 337.

mentado (atividade extracelular), durante considerável parte dos cultivos.

Estes valores mais altos para a atividade intracelular a pH 6,0, não podem ser atribuídos à presença de uma maior concentração de células, pois

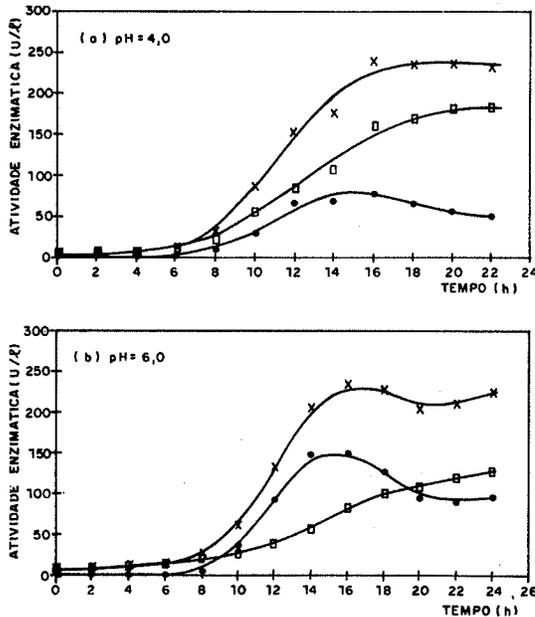


FIGURA 5 - Atividade enzimática intracelular (●), extracelular (○) e total (x), para os ensaios com *A. niger* NRRL 337, relativos a 4 anos anteriores.

conforme comentado anteriormente, estes valores são semelhantes para os cultivos a pH 4,0 e 6,0.

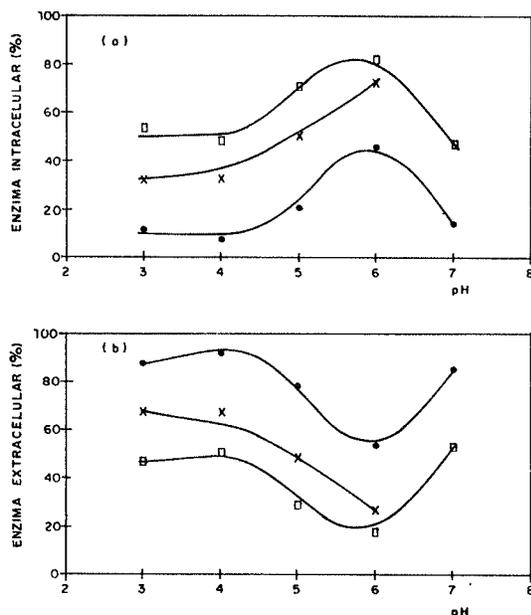


FIGURA 6 - Porcentagem em enzima intracelular e extracelular em relação ao total de enzima sintetizada, em função do pH, nos cultivos descontínuos de *A. awamori* NRRL 3112 (●), *A. niger* NRRL 337 (○) e *A. niger* NRRL 337, relativos a 4 anos anteriores (x).

Isto leva, portanto, a uma atividade intracelular específica (unidades por grama de células) significativamente maior a pH 6,0. De fato, para o *A. awamori* NRRL 3112 se obtém ao final da fonte de carbono, 5,1 U/g a pH 4,0 e 33,0 U/g a pH 6,0, e para o *A. niger* NRRL 337, 5,2 U/g e 14,0 U/g, respectivamente.

Pode-se observar ainda, através das figuras 2,4 e 5, que a síntese da amiloglicosidase é também nitidamente influenciada pelo microrganismo empregado.

Assim, observa-se que o *A. awamori* NRRL 3112 é uma cepa significativamente melhor produtora do que o *A. niger* NRRL 337, quando se comparam os níveis atingidos para as atividades enzimáticas extracelulares e totais (soma das atividades intracelular e extracelular).

Outro aspecto bastante interessante é que não houve variação significativa em termos das atividades enzimáticas totais, para dois dos conjuntos de resultados obtidos, quando se empregaram diferentes valores de pH. Assim, para o *A. awamori* NRRL 3112, observa-se a obtenção de uma atividade enzimática total máxima em torno de 500 U/l (Figura 2), tanto a pH 4,0 como 6,0.

Já para o *A. niger* NRRL 337, observa-se através das figuras 4 e 5, a ocorrência de uma diminuição sensível na capacidade de produção da enzima, após 4 anos de conservação por meio de repiques periódicos, considerando-se novamente as atividades totais. Para o microrganismo não atenuado, observando-se tanto a pH 4,0 como 6,0, valores máximos da ordem de 250 U/l (Figura 5), enquanto que para o microrganismo atenuado se observam valores máximos da ordem de 120 U/l a pH 4,0 e 180 U/l a pH 6,0 (Figura 4). Tais resultados confirmam observações anteriores (5), as quais indicam a importância do conhecimento da forma adequada de preservação de linhagens produtoras de enzimas.

Apresentam-se, a seguir na figura 6, as porcentagens em enzima intracelular e extracelular no final da fonte de carbono, em relação ao total de enzima sintetizada.

A figura 6 mostra claramente que comportamentos semelhantes foram apresentados pelos microrganismos utilizados, observando-se um paralelismo entre as curvas obtidas.

Observa-se a obtenção de uma porcentagem de enzima intracelular crescente, à medida que se aumenta o pH, sendo que este acúmulo atinge um valor máximo a pH 6,0, apresentando então, um valor significativamente menor a pH 7,0.

Observa-se ainda, que este acúmulo foi acentuadamente maior para o caso do *A. niger* NRRL 337 atenuado. Por exemplo, comparando-se os valores obtidos a pH 6,0, verifica-se para esta cepa um acúmulo de cerca de 80%, enquanto que para o *A. niger* NRRL 337 não atenuado se obtém cerca de 70%, e para o *A. awamori* NRRL 3112, aproximadamente 40%.

Estas observações indicam, portanto, que o fenômeno de retenção de enzima associada às células é mais acentuado nas cepas menos produtoras.

Na tabela 1, indicam-se a seguir, os valores das produtividades em relação à enzima total produzida, e em relação à enzima extracelular (produtividades expressas em unidades de atividade por volume de meio e por tempo de cultivo), em função do pH, para os microrganismos utilizados, calculadas no final da fonte de carbono.

Conforme se pode observar pela tabela 1, há sempre diferenças entre a produtividade total e a produtividade em relação à enzima extracelular, diferenças estas bastante significativas para determinados valores de pH, para os quais se verifica uma maior retenção de enzima associada às células.

TABELA 1 - Produtividade total em enzima e produtividade em relação à enzima extracelular, calculadas ao final da fonte de carbono.

Microrganismo	pH	Produtividade Total (U/l.h)	Produtividade Extracelular (U/l.h)
<i>A. awamori</i>	3,0	20,4	17,6
NRRL 3112	4,0	29,7	27,2
	5,0	37,5	29,2
	6,0	26,9	14,0
	7,0	12,9	10,9
<i>A. niger</i>	3,0	6,4	2,8
NRRL 337	4,0	6,2	3,2
(atenuado)	5,0	12,3	3,3
	6,0	11,4	1,7
	7,0	5,0	2,5
<i>A. niger</i>	3,0	12,9	8,6
NRRL 337	4,0	14,8	9,9
(não atenuado, i.e., 4 anos antes)	5,0	13,0	6,4
	6,0	14,2	3,6

$$\text{Produtividade} = \frac{(\text{Atividade atingida}) - (\text{Atividade inicial})}{(\text{Tempo para esgotamento da fonte de carbono})}$$

Significa, portanto, que o conhecimento da parcela de enzima intracelular pode ser de grande importância quando se estuda a seleção de linhagens, ou a influência de fatores que possam interferir no fenômeno de liberação de enzimas. Conforme indicado pelos resultados obtidos, a determinação apenas da atividade extracelular não exprime a real potencialidade das células na síntese de uma dada enzima.

SUMMARY

Influence of pH on glucoamylase synthesis and secretion by *Aspergillus awamori* NRRL 3112 and *Aspergillus niger* NRRL 337.

The present work studied the influence of pH on glucoamylase synthesis and secretion by either *Aspergillus awamori* NRRL 3112 or *Aspergillus niger* NRRL 337. Two series of results obtained with *A. niger* NRRL 337 are presented, with a four year interval between them. During this period the microorganism was preserved through periodic transfer on agar slants.

The culture medium employed in the runs contained cassava flour as the main carbon source,

with an initial polysaccharide concentration of 20 g/l. The following nutrients were also added, with the concentrations expressed in grams per liter: $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$: 5.0; $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.5; $\text{Na}_2 \text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$: 3.78; $\text{KH}_2 \text{PO}_4$: 3.5 and yeast extract: 0.1.

A series of fourteen batch runs were performed, in 10-liter Biolafitte fermenters, employing pH values in the range of 3.0 to 7.0. The temperature was controlled at 35°C, the aeration flow rate was 10 l/min and the agitation frequency was fixed at 700 rev/min.

The results showed a marked influence of pH on synthesis and secretion of the glucoamylase for both strains. It was verified that when higher pH values were employed (considering the range from 3.0 to 6.0), also higher enzyme intracellular retention was verified. In particular, at pH 6.0 the intracellular enzyme fraction was even higher than the extracellular one, during a considerable extent of the cultivation.

It was also observed that the enzyme retention phenomenon was much more expressive for the less productive species, that is, for the *Aspergillus niger* NRRL 337.

Furthermore, considering the microorganism preserved during four years, the intracellular glucoamylase retention was even higher when compared with the values obtained for the younger culture, in the whole pH range studied.

Considering for example the final activity values obtained at pH 6.0, it was verified an intracellular retention (expressed in percentage of the total enzyme activity, that is, the sum of extracellular and intracellular fractions) of about 80% for the older *Aspergillus niger* NRRL 337, 70% for the younger one, and of about 40% for the *Aspergillus awamori* NRRL 3112.

Key words: *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger*, production of glucoamylase, influence of pH

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguero, J.M.Z. - Influência do pH e da concentração inicial de substrato na síntese de glicocamilase por *Aspergillus* em cultivo submerso. (Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP). São Paulo, 1987.
2. Facciotti, M.C.R. - Produção de amiloglicosidase por *Aspergillus awamori* NRRL 3112 em fermentação submersa - Estudo do processo semicontínuo e da influência da concentração inicial de polissacarídeo em

- processo descontínuo. (Tese de Doutorado, Escola Politécnica da USP), São Paulo, 1986.
3. Greene, H.C. & Fred, E.B. - Maintenance of vigorous mold stock cultures. *Ind. Eng. Chem.*, 26: 1297-1299, 1934.
 4. Macêdo, G.R. - Influência do pH e da temperatura na produção de amiloglicosidase por *Aspergillus niger* NRRL 337 (Dissertação de Mestrado, Escola Politécnica da USP). São Paulo, 1982.
 5. Park, Y.K. & Santi, M.S.S. - Induction of high amyloglucosidase-producing mutant from *Aspergillus awamori*. *J. Ferment. Technol.*, 55: 193-195, 1977.
 6. Schmidell, W & Fernandes, M.V. - Comparação entre hidrólise ácida e enzimática de amido para determinação de açúcares redutores totais. *Rev. Microbiol.*, 8: 98 - 101, 1977.
 7. Schmidell, W. & Menezes, J.R.G. - Influência da glicose na determinação da atividade da amiloglicosidase. *Rev. Microbiol.*, 17: 194-200, 1986.

Recebido para publicação em 29/08/90.

YEASTS FROM HUMAN MILK COLLECTED IN RIO DE JANEIRO, BRAZIL

Carlos A. Rosa¹
Franz R. Novak²
João A. G. de Almeida²
Leda C. Mendonça-Hagler¹
Allen N. Hagler¹

SUMMARY

Yeasts were detected in milk from 50 of 158 donors, but were less than 10/ml in 90% and above 1000/ml in only 0.4% of the samples. The prevalent species of 147 isolates were, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Candida famata*, *Candida sorbophila*, *Rhodotorula minuta*, *Candida albicans*, *Candida sphaerica*, and *Pichia ohmeri*.

Key words: yeasts, human milk bank, *Candida*

INTRODUCTION

Human milk and colostrum are important for nutrition and resistance to disease especially for newborn and premature babies, but often not available from their mother's for physiological or emotional motives(1,2,3,11). To resolve this problem, human milk banks have been established to collect, process, and distribute mother's milk. The microbiological quality of human milk distributed by these banks is a public health concern since the children that will consume this product have a low resistance to infections. When standards of hygiene are not obeyed samples can have high microbial counts, and yeasts are often included in these microbial populations. A few species of yeasts can ferment lactose, more species can assimilate it, and diverse species including many basidiomycetes and their anamorphs have proteolytic abilities. Among the yeast species often associated with humans are opportunistic pathogens including *Candida albicans*. These are responsible for for common diseases in

infants for example thrush and intestinal infections (4). The lactose fermenting yeast *Kluyveromyces marxianus* and lactose assimilating yeasts *Candida famata*, *Cryptococcus* spp., and *Rhodotorula* spp. have been isolated from Brazilian dairy products (Robbs et al., unpublished data). Our objective was to characterize the yeast populations that were isolated from quality control procedures in a human milk bank and determine if they included known pathogens and potential spoilage organisms.

METHODS

Three separate milk samples were collected hygienically with sterilized materials as instructed by the milk bank into sterile bottles by each of 158 healthy volunteer donors in the city of Rio de Janeiro. Samples were stored frozen for up to 2 weeks before transport to the laboratory. Decimal dilutions of samples were made in Buttersfield's phosphate diluent and 1 ml volumes inoculated in dupli-

1 Instituto de Microbiologia, Bloco I, CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 21944, Brazil

2 Instituto Fernandes Figueira, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Rui Barbosa 716, Flamengo, Rio de Janeiro, 22250, Brazil.

cate in potato dextrose agar (PDA) pour plates (9). Counts of yeasts and molds were made after 2 to 4 days of incubation at 25°C (2). Representative yeast like colonies observed to have typical budding cells in Gram stains were isolated by streaking on PDA and incubating at 25°C. Cultures were maintained in the milk bank quality control laboratory on PDA slants at 25°C and transfers made each 15 days. When received for characterization, cultures were re-streaked on 2% glucose, 1% peptone, 0.5% yeast extract, 2% agar medium to assure purity and maintained on 2% glucose, 0.5% yeast extract, 1% malt extract, 0.2% monobasic sodium phosphate, 1.7% agar (GYMP agar) grown 3 days at 25°C and stored under a layer of sterile mineral oil at 8 ± 4°C. Yeasts were characterized and identified according to conventional methods (7).

RESULTS AND DISCUSSION

Yeasts counts were obtained for 470 of the 474 milk samples received (table 1). Yeasts were detected in samples from 50 donors, but were not detected (<0.5 per ml) in any samples from the other 108 donors. Yeasts were present in all 3 samples from 48 of the donors and detected in only 1 sample each of 2 donors. Yeast counts were less than 10 per ml in 90% of the samples and above 1000 per ml in only 0.4%. A list of the species identified from the 147 isolates is presented in table 2. Ability to grow at 37°C was noted for 117 strains, but only 23 of the cultures assimilated lactose and 3 fermented it.

TABLE 1 - Distribution of yeast counts for 470 human raw samples from 158 donors.

Count interval UFC/ml	number of samples
<5 x 10 ⁻¹	324
<5 x 10 ⁻¹ to <10 ¹	99
10 ¹ to <10 ²	28
10 ² to <10 ³	17
10 ³ to <10 ⁴	2

Pathogenic yeasts including *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, and *Candida lusitana* were all isolated from unpasteurized human milk. The high proportion of isolates capable of growing at 37°C was consistent with an origin from humans. With the

exception of *Candida sphaerica* all the yeasts isolated in this study have been found in polluted waters of Rio de Janeiro and many have been found in other natural substrates of this region (5,10). Since most isolates were common in the local environment they could have entered the milk as contaminants. Bacteria isolated from human milk are frequently species associated with human skin (8) and the opportunistic pathogens we isolated can also be associated with skin. The presence of these yeasts could reflect insufficient hygiene on the part of some donors or problems during storage and transport of the milk that allowed contamination or growth of contaminants. Although yeasts would easily be killed by pasteurization, quality control of yeast levels in unprocessed milk could be a good indicator of problems with hygiene, storage or transport.

TABLE 2 - Yeasts and their frequency of occurrence among 147 isolates from human milk collected in Rio de Janeiro.

Species	frequency %
<i>Candida parapsilosis</i>	34.0
<i>Candida guilliermondii</i>	14.3
<i>Rhodotorula minuta</i>	6.8
<i>Candida famata</i>	9.6
<i>Candida sorbophila</i>	6.1
<i>Candida albicans</i>	4.8
<i>Candida sphaerica</i>	4.1
<i>Pichia ohmeri</i>	3.4
<i>Candida tropicalis</i>	2.8
<i>Candida intermedia</i>	2.8
<i>Cryptococcus albidus</i>	2.8
<i>Candida parapsilosis?</i>	2.0
<i>Rhodotorula glutinis</i>	2.0
<i>Candida holmii</i>	0.7
<i>Candida ingens?</i>	0.7
<i>Candida Krusei</i>	0.7
<i>Candida lusitanae?</i>	0.7
<i>Candida sp.</i>	0.7
<i>Rhodotorula rubra</i>	0.7

Nonpathogenic yeasts could also be important in spoilage of the milk. Several of the species isolated including *Candida famata*, *Candida intermedia*, *C. sphaerica*, and *Cryptococcus albidus* assimilate lactose and the anamorphs of basidiomycetes including *C. albidus* and *Rhodotorula* spp. produce proteases that can degrade casein (7). These microorganisms could alter product quality during storage and transportation before control of microbial populations by pasteurization.

Some isolates of *C. famata*, *C. parapsilosis*,

C. intermedia, and *C. albidus* varied in a few characteristics from the standard descriptions. Yeasts isolated from little studied substrates or geographical areas have frequently shown minor variations from standard descriptions. The description of *C. famata* contains many variable characteristics and that of *Candida ingens* has mostly negative characteristics often resulting in inclusion of undescribed species in these taxa (Nakase and Phaff personal communication). Our isolates identified as *C. famata* and *C. ingens?* probably included undescribed species with biotypes similar to them. The perfect form of *C. sphaerica* is *Kluyveromyces marxianus*, a lactose fermenting yeast often associated with milk and dairy products (7). Our isolates of *C. sphaerica* and those of *K. marxianus* isolated previously from Brazilian dairy products (Robbs et al. unpublished data) differed from the standard descriptions usually by failing to assimilate D and L Arabinose). Our results for North American isolates of this yeast were in agreement with the standard description.

The presence of pathogenic yeasts in unpasteurized milk suggests that this could be a source of infection for infants during breast feeding. It is possible that the true incidence of *C. albicans* is considerably higher than indicated in our study because this species does not compete well with other microbes on isolation media and the method used by us for isolation was not specific for it (4). However the levels of contamination of mother's milk by yeasts was found to be very low for most samples and could have originated from handling of the milk during collection and transport, and may not be very significant for breast feeding. These results should not discourage breast feeding, because much higher levels of yeasts including some opportunistic pathogens are found in other food products such as fresh fruits (10) and other contacts with the child's environment (5,6). The benefits of breast feeding probably outweigh the risk of contamination by yeasts that the child will normally contact anyway and often in higher numbers from other foods and association with people. Our results should encourage a study focused on yeast populations in mother's milk collected aseptically and analysed immediately in the laboratory to allow differentiation between yeasts in the milk itself and those that could enter as contamination during handling. Since occurrence of yeasts was relatively common in mother's milk and *C. albicans* is an important pathogen such a study use more specific media and conditions for its isolation.

RESUMO

Leveduras de leite humano coletado na cidade do Rio de Janeiro, Brasil.

Leveduras foram detectadas em leite em 50 de 158 doadores. As contagens de leveduras foram menores do que 10/ml em 90% das amostras e acima de 1000/ml em somente 0,4%. As espécies predominantes foram *Candida parapsilosis*, *Candida guillhermondii*, *Candida famata*, *Candida sorbophila*, *Rhodotorula minuta*, *Candida albicans*, *Candida sphaerica*, and *Pichia ohmeri*.

Palavras chaves: leveduras, banco de leite materno, *Candida*

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Newton Carlos Marcial Gomes for his dedicated technical assistance and CNPq, and FINEP for financial support.

REFERENCES

1. Almeida, J. A. G. - Qualidade de leite humano coletado e processado em banco de leite, Viçosa, 1986 (M. Sc Thesis, Univ. Fed. Viçosa).
2. Almeida, J. A. G., Novak F. R. & Almeida, C. H. G. - Avaliação parcial da flora microbiana do leite humano ordenhado no IMIP. *Rev. Inst. Materno Infantil de Pernambuco* 3: 13-16, 1989.
3. Assis, M. A. A. - Estudo Sobre a Preservação do Colostro Humano para Bancos de Leite, Campinas, 1981, (M. Sc. thesis, UNICAMP).
4. Buck, J. D. & Bubucis, P. M. - Membrane filter procedure for enumeration of *Candida albicans* in natural waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 35: 237-242, 1978.
5. Hagler, A. N. and Mendonça-Hagler, L. C. -Yeasts from marine and estuarine waters with different levels of pollution in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41: 173-178, 1981.
6. Hurley, R., de Louvois, J. & Mulhall, A. -Yeasts as human and animal pathogens, In. A. H. Rose and J. S. Harrison, The Yeasts second edition vol. 1, London, Academic Press, p 207-281, 1987.
7. Kreger-van Rij, N. J. W. - The yeasts: a taxonomic study, third edition. Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam. 1082 pp, 1984.
8. Lucas, A. & Roberts, C. D. - Bacteriological quality control in human milk banks. *Br. Med. J.* 1: 80-82, 1979.
9. American Public Health Association. - Compendium of methods for the microbiological examination of foods, second edition. M. L. Speck (Ed.), Washington D. C., 914 pp, 1986.
10. Robbs, P. G., Hagler, A. N., & Mendonça-Hagler, L. C. - Yeasts associated with a pineapple plantation in Rio de Janeiro, Brazil. *Yeast*, 5: 485-489, 1989.
11. Tavares, M. B. - Aleitamento Materno. Imp. Univ. Federal do Para, Belem, 56pp, 1985.

Recebido para publicação em 13/06/90

ISOLAMENTO DE *YERSINIA ENTEROCOLITICA* EM UM LABORATÓRIO PARTICULAR DA CIDADE DE SÃO PAULO

Vanira R. S. M. Ceccarelli
Charles Schmidt
Luiz R. Trabulsi

NOTA BREVE

RESUMO

Comunica-se o isolamento de 10 amostras de *Y. enterocolitica*, das fezes de crianças e adultos, atendidos no Laboratório Bio-Ciência Lavoisier. O isolamento destas 10 amostras sugere que a *Y. enterocolitica* é mais frequente em São Paulo do que era indicado por trabalhos anteriores.

Palavras-chaves: *Yersinia enterocolitica*, fezes.

A *Y. enterocolitica* foi descrita em 1939, recebendo sua designação atual em 1984. Desde então, e particularmente nos últimos anos a importância médica da bactéria vem crescendo de maneira significativa. Em vários países escandinavos a *Y. enterocolitica* representa um dos principais agentes de enterocolite na criança, sua frequência sendo também relativamente alta no Canadá, U.S.A e Austrália.

As infecções intestinais por *Y. enterocolitica* são seguidas de complicações infecciosas e não infecciosas (reativas) com frequência maior do que as infecções intestinais por outros germes enteropatógenos (Timothy, I., Cover, M. D., Robert, C. & Aber. M. D. - *New Engl. J. Med.* 121: 16-23, 1989).

A frequência de *Y. enterocolitica* na América Latina foi relatada recentemente por Falcão (*Contr. Microbiol. Immunol.* 9: 68-75, 1987) sendo baixa, de modo geral (Falcão, D.P., *Rev. Microbiol.* 12: 5-10, 1981). Em São Paulo, foram realizados dois estudos sobre a frequência de *Y. enterocolitica* na diarreia de crianças de baixo nível sócio-econômico, estudando-se um total de 1.201

crianças, sem que a bactéria fosse isolada de nenhuma delas (Kitagawa, S.M.S., Toledo, M.R.F., Trabulsi, L.R., Ramos, S. R. T. S., Murahoushi, J., Neto, U. F. Candeias, J. A. N., *Rev. Paul. Ped.* 6: 16-25, 1989. e Gomes, T. A. T. and al. - Prevalence of enteropatogenes in infants with diarrhoeal disease and age-matched controls. Dados a serem publicados). Em um dos estudos foi empregado enriquecimento a frio e vários meios seletivos em placa (Timothy, I., Cover, M. D., Robert, C. & Aber. M. D. - *New Engl. J. Med.* 121: 16-23, 1989). Entre 1.000 crianças-controle, estudadas pelos mesmos métodos, *Y. enterocolitica* foi isolada somente de uma (Kitagawa, S. M. S., Toledo, M. R. F., Trabulsi, L. R., Ramos, S. R. T. S., Murahouschi, J.; Neto, U.F. & Candeias, J. A. N. *Rev. Paul. Pediatr.* 6: 16-25, 1989). A experiência do Laboratório Bio-Ciência Lavoisier vem mostrando que a *Y. enterocolitica* não é tão rara como os estudos mencionados sugerem, uma vez que no decorrer de um ano foram isoladas 10 amostras da bactéria, sem se empregar processos de enriquecimento ou meios seletivos específicos (as dez amostras foram isoladas em placas de MacConkey

* Laboratório Bio-Ciência Lavoisier (Av. Angélica, nº 1.832 - CEP 01228) - São Paulo - SP, Brasil.

e SS). No mesmo período foram isoladas as seguintes enterobactérias enteropatogênicas: 137 *Shigella*, 47 *Salmonella*, 45 *E. coli* enteropatogênica clássica (Epec) e 19 *E. coli* entero-invasora (Eicc). No período foram realizadas 980 coproculturas.

As 10 amostras de *Y. enterocolitica* pertenciam ao sorotipo 03.

O objetivo desta nota é apenas informar que a *Y. enterocolitica* não é uma bactéria tão rara em certas populações, e portanto, o bacteriologista deve estar sempre atento com relação ao seu possível encontro. Entretanto, devemos ter em mente que a maior frequência da bactéria na população que frequenta o Laboratório Bio-Ciência Lavoisier, e provavelmente outros laboratórios particulares, é um reflexo de situações epidemiológicas que devem ser investigadas.

Quanto à identificação da *Y. enterocolitica*, deve ser salientado que a bactéria forma colônias pequenas e lactose-negativas e que, além disto, hidroliza a uréia com bastante intensidade. Desta maneira, torna-se importante usar um meio de triagem de enteropatógenos que contenha uréia e que revele facilmente a hidrólise desta substância, como o meio

EPM (Toledo, M. R. F., Fontes, C. F. & Trubulsi, L. R. - *Rev. Microbiol.* 13: 309-315, 1982).

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Profa. Dra. Deise P. Falcão pela confirmação da sorotipagem e por outros estudos realizados com 5 das 10 amostras.

SUMARY

Isolation of *Yersinia enterocolitica* in São Paulo, Brazil.

It is described the isolation of 10 strains of *Y. enterocolitica* from the feaces of children and adults, visiling the Laboratory Bio-Ciencia Lavoisier. Isolation of these strains suggests that *Y. enterocolitica* is more frequent in São Paulo than indicated by previous studies.

Recebido para publicação em 20/05/90.

UM NOVO MEIO PARA A CONSERVAÇÃO DE *NEISSERIA*

Artur Smania Junior
Marcio Luiz Gil &
Elza de Fatima Albino Smania

NOTA BREVE

RESUMO

Um novo meio (MSE) foi desenvolvido para a conservação e estocagem de espécies de *Neisseria* patogênicas para o homem. Dez amostras de meningococo e 10 de gonococo foram estocadas neste meio e mantiveram a viabilidade até 8º e 5º mês, respectivamente.

Palavras chaves: *Neisseria*, Conservação, Meio Semi-Sólido

As espécies de *Neisseria* patogênicas para o homem são conservadas classicamente através do processo de liofilização ou do congelamento a -70°C. Cody (Health Lab. Sci. 15:206-209, 1978.) comenta o insucesso de duas outras técnicas, manutenção em ágar inclinado a 37°C (5) e no meio de Thayer-Martin para transporte (Cross. R.C. e col. Appl. Microb. 20: 281, 1970) e demonstra a eficiência do uso do ágar inclinado quando a temperatura é mantida a 30°C. Até então, estas foram as técnicas encontradas na bibliografia consultada. Dentre elas, três são consideradas eficientes, porém todas implicam na aquisição de equipamentos onerosos.

Diante do exposto e considerando as limitações da maioria dos laboratórios nos países em desenvolvimento, este trabalho teve por objetivo desenvolver uma metodologia eficiente e de baixo custo para a manutenção das amostras de meningococo e gonococo.

Para a realização desta técnica foi preparado um meio semi-sólido a partir do caldo Mueller-Hinton (Merck) com 0,5% de ágar (Difco) e 0,5% de gelatina (Difco). O meio foi adicionado de 3%

de hemácias de carneiro e mantido em banho de água a 80°C por 15 minutos. Em seguida foi resfriado a 56°C e enriquecido com suplemento VX (Laborclin) para a concentração final de 1% (Meio Semi-Sólido Enriquecido — MSE). O meio completo foi distribuído, assepticamente, em quantidades de 3,5 ml, em tubos (14x140 mm) com tampa de borracha e foram mantidos por 18 horas a 36°C para testar a esterilidade.

Para comparar a eficiência do meio MSE foram também utilizados neste experimento o ágar chocolate inclinado, ACI, (Cody, R.M., Health Lab. Sci. 15:206-209, 1978) e o tryptic soy broth com 50% de soro inativado de coelho, TSBS, (Morelli e colab. Manual clinical Microbiol. 4th ed. p.176-192, 1985). Os meios MSE e ACI, foram conservados em geladeira, por um período máximo de 20 dias, e o TSBS em "freezer" (-20°C) por até 2 meses.

Os meios MSE, ACI e TSBS foram testados com 10 cepas de gonococo e 10 cepas de meningococo do sorogrupo B (3 pertencentes ao sorotipo B:4:P1-16, 2 ao sorotipo B:8:nt, 1 ao sorotipo B:4:P1-15, 1 ao sorotipo B:4:nt e 3 não foram

submetidas a tipagem sorológica), isoladas a partir de secreção uretral e do líquido cefalorraquidiano, respectivamente. As amostras foram semeadas em ágar chocolate suplementado (suplemento VX, Laborclin), usando-se como base o ágar GC (Difco), e incubadas em condições de microaerofilia (5-10% CO₂) a 36°C por 24 a 48 horas. Após o crescimento, as colônias foram suspensas em solução salina estéril até atingir uma turvação correspondente ao tubo nº 2 da escala McFarland (6.10⁸ UFC/ml). O inóculo para todos os meios foi constituído de duas gotas da suspensão, recém preparada, distribuídas com pipeta de 1,0 ml (aproximadamente 100µl).

Após a semeadura, as bactérias foram incubadas durante 18 horas a 36°C, em ambiente de aerobiose. Posteriormente, a superfície do MSE e do ACI foi coberta com 2,0 ml de óleo mineral (Icopral) e os tubos foram mantidos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. No caso do TSBS, os tubos foram congelados a -20°C.

A viabilidade das amostras foi testada a cada 10 dias durante 2 meses, e a seguir mensalmente até o 8º mês. O meio utilizado para o replique e as condições de cultivo foram as mesmas descritas para a obtenção do inóculo.

Sempre que se fez necessário testar a pureza das amostras, foram repetidos os testes realizados para identificação das neisserias (bacterioscopia pelo Gram, prova da oxidase e utilização de carboidratos).

Os resultados obtidos no presente experimento são apresentados na figura 1. Como pode-se notar, 100% das amostras de meningococo permaneceram viáveis até o 8º mês no MSE (após este período a preservação das mesmas não foi avaliada), enquanto que para os gonococos esta mesma porcentagem de viabilidade foi conseguida somente até o 5º mês, baixando para 40% no 6º mês e 10% no 7º mês. No ACI, as amostras de meningococo retiveram 100% de viabilidade até o 4º mês, 50% até o 5º mês e 40% até o 8º mês (após este período a preservação das mesmas não foi avaliada) e as de gonococo permaneceram uniformemente viáveis até o 5º mês. Em TSBS, as amostras foram mantidas viáveis durante um intervalo de tempo bem menor daquele observado com o uso dos outros dois meios. Foram recuperadas 90% das amostras de meningococo até o 10º dia, 30% até o 20º dia e 10% até o 40º dia. Somente 20% das amostras de gonococo permaneceram viáveis até o 20º dia.

De acordo com os resultados, as amostras de *Neisseria* foram mantidas viáveis durante um maior

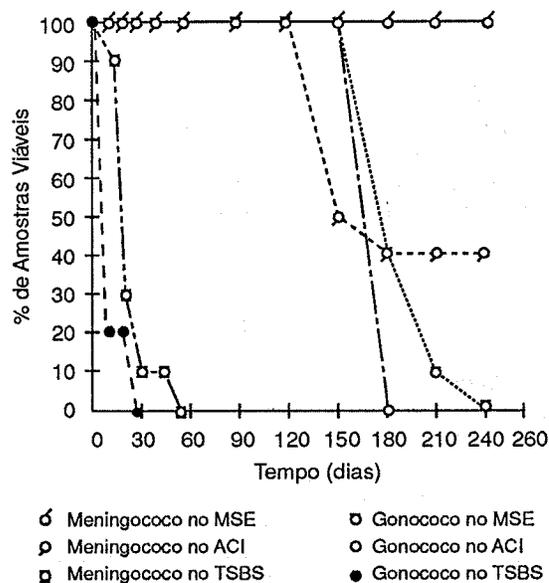


FIGURA 1 - Representação gráfica da viabilidade das amostras de *Neisseria* nos meios testados.

intervalo de tempo quando foram estocadas em meio semi-sólido ou sólido, à temperatura ambiente, em relação ao meio líquido a -20°C. Entretanto, comparando-se a manutenção das amostras no MSE com relação ao ACI, 60% das de meningococo e 40% das de gonococo permaneceram por mais tempo viáveis no MSE do que no ACI e, para as demais amostras, o tempo de viabilidade foi semelhante, para cada espécie. O maior tempo de viabilidade obtido com o uso do MSE pode estar relacionado com a presença do amido (Davis e colab. Microbiologia, 2ª ed. p.887-889, 1979) no caldo Mueller-Hinton e com a consistência semi-sólida deste meio. Porém, deve-se salientar que o tipo de inóculo e a cobertura da superfície do meio com óleo mineral (Cody, R.M., Health Lab. Sci. 15:206-209, 1978), comuns a ambos os meios, também devem ter contribuído para a obtenção dos presentes resultados. Com relação ao TSBS, a temperatura de congelamento utilizada poderá ter sido o principal fator do insucesso. Algumas das amostras testadas não foram recuperadas já no 10º dia de estocagem e no 50º dia todas já haviam perdido a viabilidade. Sendo assim, não é recomendado o uso deste meio para este fim, nas condições em que foi realizado o presente experimento.

Os resultados deste trabalho demonstraram que o MSE foi o mais eficiente na manutenção das amostras testadas. Com o uso deste meio, nas con-

dições descritas é possível manter viáveis as amostras de neisseria de maneira simples e econômica. Assim, esta metodologia representa uma alternativa às técnicas tradicionais onde são empregados equipamentos dispendiosos. Desta forma sugerimos que este meio também seja utilizado em outros laboratórios e, inclusive seja testado para outras espécies de difícil manutenção.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Dr. Rudi Lopes do Departamento Autônomo de Saúde Pública e as Dras. Cássia Maria Zoccolo e Denise Esteves Moritz do Laboratório Médico Santa Luzia pelas facilidades e cooperação na obtenção dos espécimes biológicos. Esta pesquisa foi amparada financeiramente pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico — CNPq (Processo nº 40.3255/88) e pela Pró-Reitoria de Administração da Universidade Federal de Santa Catarina.

SUMMARY

A new medium (MSE) for the preservation of *Neisseria*.

A new medium was developed for the maintenance and storage of species of *Neisseria* pathogenic to humans. Ten isolates of meningococci and 10 of gonococci were stored in the media. All isolates of meningococci maintained viability in the media for a period of 8 months while the gonococci isolates maintained 100%, 40% and 10% viability for a periods of 5 months, 6 months and 7 months, respectively.

Key words: *Neisseria*, maintenance, new culture medium.

Recebido para publicação em 21/05/90

ERRATA

Tabela 1 – Relação das 123 cepas testadas

Espécies ou Gêneros	Número de Cepas
<i>Escherichia coli</i>	50
<i>Shigella</i> (1 <i>S. sonnei</i> , 2 <i>S. flexneri</i>)	3
<i>Salmonella</i> (2 <i>S. typhi</i> , 2 <i>S. spp</i>)	4
<i>Citrobacter freundii</i>	3
<i>Klesbsiella</i> (12 <i>K. pneum.</i> , 2 <i>K. oxytoca</i>)	14
<i>Enterobacter</i> (8 <i>E. cloacae</i> , 3 <i>E. aerogenes</i> , 1 <i>E. agglomerans</i>)	12
<i>Hafnia alvei</i>	1
<i>Serratia liquefaciens</i>	1
<i>Proteus</i> — <i>Providencia</i> (14 <i>Proteus indole</i> -, 7 <i>Proteus indole</i> +, 2 <i>P. stuartii</i>)	23
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	1
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1

No trabalho de Caetano-Pisciottano, M.N., Alves, A.J., Simeon de Buochberg, M., Atisso, M., Zuccarelli, M. & Dusart, G. — "Atividade de três ureidopenicilinas sobre bacilos Gram negativos isolados no Recife", publicado na *Revista de Microbiologia*, São Paulo, 20(4): 396-401, Out/Dez. 1989, ficaram faltando as tabelas 1 e 2 apresentadas abaixo e ao lado.

TABELA 2 - Valores extremos obtidos com a azlocilina, a mezlocilina e a piperacilina, e valores de CIM e CBM capazes de inibir 50 e 90% das amostras testadas e percentagens das cepas resistentes.

Cepas	ANT	Valores das CIM em µg/ml			Valores das CBM em µg/ml			% de cepas resistentes
		Extremos	50%	90%	Extremos	50%	90%	
<i>Escherichia coli</i> N = 50	AZL	4 — >128	5,65	>128	4 — >128	5,8	>128	16
	MZ	0,125 — 8	0,80	3,6	0,50 — 16	0,94	5,7	0
	PIP	0,50 — >128	0,82	100	0,50 — >128	1	>128	6
Grupo K.E.S. N = 28	AZL	4 — >128	12	56	4 — >128	14,3	>128	17,9
	MZ	0,50 — 16	2,8	7,8	1 — 16	3,1	9	0
	PIP	0,25 — >128	2,2	>128	0,50 — >128	2,9	>128	17,9
<i>Proteus Providencia</i> N = 23	AZL	0,50 — >128	2,46	34	1 — >128	3,5	82	4,3
	MZ	0,125 — 32	0,60	2,9	0,25 — 64	0,96	3,41	0
	PIP	<0,03 — 64	0,235	1,6	<0,03 — 64	0,38	3,5	0
<i>Shigella</i> N = 3	AZL	2 — >128			4 — >128			33,3
	MZ	0,25 — 8			0,50 — 8			0
	PIP	0,25 — >128			0,25 — >128			33,3
<i>Citrobacter</i> N = 3	AZL	8 — 16			8 — 16			0
	MZ	2 — 2			2 — 4			0
	PIP	1 — 1			1 — 2			0
<i>Salmonella</i> N = 4	AZL	8 — 16			8 — 16			0
	MZ	2 — 4			4 — 4			0
	PIP	1 — 2			2 — 4			0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> N = 9	AZL	4 — 16			8 — 32			0
	MZ	16 — 32			16 — 32			0
	PIP	2 — 4			4 — 8			0

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA
VOLUME 21, 1990

CONTEÚDO-CONTENTS

	PÁG
Volume 21, Número 1	
Toledo, M.R.F.; Trabulsi, L.R. Frequência de <i>Escherichia coli</i> enteroinvasora em crianças com diarreia 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 palaeo-karstic of Lagoa Santa Plateau— MG, Brazil.....	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.; Ernandez, 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. Sebrevivência 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. Sucessão fúngica em folhas de <i>Quercus robur</i> L. (Carvalho) submersas em um lago situado no município de Itapeccerica da Serra, SP Fungal succession on <i>Quercus robur</i> L. leaves submerged in a lake in the municipality of Itapeccerica 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 anaeróbio 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
Milanesi-Rubilar, A.A.; Maugeri, F. Modelling alcohol production and cell viability in a cascade reactor with immobilized cells.....	79
Ruiz, R.L.; Mós, 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
Volume 21, Número 2	
Araujo, M.A.; Guimarães, V.F.; Mendonça-Hagler, L.C.S.; Hagler, A.N. <i>Staphylococcus aureus</i> e estreptococo em água doce e marinha superficiais do Rio de Janeiro, Brasil <i>Staphylococcus aureus</i> and fecal Streptococci in fresh and marine surface waters of Rio de Janeiro, Brazil.....	141
Silva, H.M.; Corrêa, B.; Santos, R.A.; Rascop, S.B.; Iaria, S.T. Microbiota fúngica, espécies aflatoxigênicas do gênero <i>Aspergillus</i> e detecção de aflatoxinas em pimenta vermelha (<i>Capsicum</i> sp) comercializado no município de Goiânia - GO Isolation of fungi, production of aflatoxins by <i>Aspergillus</i> sp and aflatoxins in samples of red pepper (<i>Capsicum</i> sp) commercialized in Goiania, GO, Brazil.....	149
Timenetsky, J. Isolamento de <i>Acholeplasma</i> em diferentes culturas celulares Isolation of <i>Acholeplasma</i> in different cell cultures.....	153
Dias, J.M.C.S.; Oliveira, K.S.; Facciotti, M.C.R.; Netto, W.S. Determinação da concentração inicial ótima de glicerol para a produção de <i>Azospirillum brasilense</i> Determination of optimum glycerol initial concentration for production of <i>Azospirillum brasilense</i> ..	157

Leite, S.G.F.; De França, F.P. Determinações do etanol intracelular e da viabilidade de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em fermentações alcoólicas Intracellular ethanol and cellular viability of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> in ethanol fermentation.....	163
Graziano, K.U.; Cianciarullo, T.I.; Gontijo F^o, P.P. Avaliação da atividade esterilizante de pastilhas de paraformaldeído Evaluation of the sporocidal activity of paraformaldehyde tablets.....	167
Castilho, C.J.C.; Sato, H.H.; Pastore, G.M.; Park, Y.K. Detecção de leveduras produtoras de fator "killer" presentes nas bebidas "chicha" e "masato" Detection of killer factors in yeast isolated from chicha and masato.....	171
Blanco, S.E.; Tosetti, M.I.S.; Segovia, R.F.; Ferreti, F.H. Influencia del pH sobre la transformacion microbiologica da flavanona y 2'-hidroxichalcona por <i>Aspergillus niger</i> NRRL 3 pH influence on the microbiological transformation of flavanone and 2'-hydroxychalcona by <i>Aspergillus niger</i> NRRL 3.....	175
Pappano, N.B.; Centorbi, O.N.P.; Ferreti, F.H. Determinación de la concentración inhibitoria mínima a partir de parâmetros criticos de crecimiento Minimum inhibitory concentration determination by kinetic parameters of growth.....	183
Sessa, E.; Furlanetto, S.M.P. Condições bacteriológicas de amostras de leite de lactários obtidas em hospitais Bacteriological quality of dispensary milk from hospitals.....	189
Suassuna, J.H.R.; Ruzany, F.; Souza, E.R.M.; Sampaio, J.C.; Machado, R.O. Correlações clínico-virológicas nos quadros infecciosos causados por citomegalovirus em pacientes com transplantes renais Virological and clinical observations in cytomegalovirus infections of patients with renal transplants.....	199
Hofer, E.; Ribeiro, R. Ocorrência de espécies de <i>Listeria</i> em camarão industrializado Occurrence of <i>Listeria</i> species in frozen shrimp.....	207
Informações Técnico-Científicas (SBM).....	209
 Volume 21, Número 3	
Leal, N.C.; Almeida, A.M.P.; Ferreira, L.C.S. Avaliação de diferentes métodos para extração do DNA plasmidial para caracterização de cepas de <i>Yersinia pestis</i> Evaluation of different plasmid DNA extraction methods in the molecular characterization of <i>Yersinia pestis</i> strains.....	213
Hirooka, E.Y.; Yoshimoto, Y.; Vicente, E.; Ugolini, R.A.; Vanzella, N.M. B.; Menezes, J.R.; Soares, L.M.V. Aflatoxiose em cunicultura de Londrina, Pr. Aflatoxicosis in rabbit farm in Londrina, Paraná, Brazil.....	219
Hirooka, E.Y.; Viotti, N.M.A.; Marochi, M.A.; Ishii, K.; Ueno, Y. Leucoencefalomalácia em eqüinos do Norte do Paraná Leukoencephalomalacia in equines in the North of Paraná, Brazil.....	223
Jorge, A.O.C.; Vieira, S.; Hofeing, J.F.; Almeida, O.P. de Determinação da dose letal 50% para <i>Staphylococcus aureus</i> (NCTC 8530) em camundongos portadores de tumor de Ehrlich Lethal dose 50% (LD 50) to <i>Staphylococcus aureus</i> (NCTC 8530) in mice bearing Ehrlich's tumor.....	228
Rodrigues, E.C.; Tanaka, Y.; Pizzirini-Kleiner, A.A. Observações citológicas em conídios e células miceliais de <i>Humicola</i> sp Cytological observations in conidial and mycelial cells of <i>Humicola</i> sp.....	232

Correa, C.M.C.; Tibana, A.; Gontijo F ^o , P.P. Avaliação de vegetais como fonte de infecção por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> para pacientes hospitalizados. 1. Nível de contaminação dos alimentos servidos aos pacientes Vegetables as source of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> infections for hospitalized patients. 1. Contamination level of vegetables served in hospitals.....	238
Correa, C.M.C.; Tibana, A.; Gontijo F ^o , P.P. Avaliação de vegetais como fonte de infecção por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> para pacientes hospitalizados. 2. Detecção de marcadores epidemiológicos em cepas provenientes de alimentos e de pacientes Vegetables as source of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> infections for hospitalized patients. 2. Epidemiological markers of vegetables and patients strains.....	243
Souza, E.M.B. e; Paula, C.R.; Purchio, A.; Gambale, W.; Corrêa, B.; Cury, A.E. Aspectos morfo-fisiológicos, fatores de virulência e sensibilidade a antifúngicos de amostras de <i>Candida albicans</i> , sorotipos A e B, isoladas em São Paulo, Brasil Morphology, physiology, virulence factors and susceptibility to antifungal drugs of <i>Candida albicans</i> isolated in São Paulo, Brazil.....	247
Reis, J.H.; Moreira, Y.K.; Nogueira, M.G.A.; Moreira, E.C. Leveduras associadas à porção terminal do intestino grosso de <i>Rana catesbeiana</i> , Shaw (1802), em diferentes fases de crescimento Yeasts associated with the terminal portion of large intestine of <i>Rana catesbeiana</i> , Shaw (1802), at different growth stage.....	254
Pires, M.F.C.; Assis, C.M. de; Szeszs, M.W.; Pukinskas, S.R.B.S.; Giudice, M. C.; Paula, C.R.; Purchio, A. <i>Rhodotorula rubra</i> em cabelos humanos simulando quadro de piedra branca Similar white piedra by <i>Rhodotorula rubra</i>	262
Mcknight, I.C.S.; Leitão, M.F.F.; Leitão, R.F.F. <i>Bacillus cereus</i> em macarrões industrializados. II. Ocorrência em produtos comerciais e sua multiplicação no alimento preparado para consumo <i>Bacillus cereus</i> in macaroni. II. Occurrence in commercial products and evaluation of its behavior in the prepared food.....	268
Borges, M.F.B.; Brandão, S.C.C.; Pinheiro, A.J.R. Sobrevivência de <i>Salmonella</i> spp em queijo Minas Padronizado durante a maturação Survival of <i>Salmonella</i> in standard Minas cheese during maturation.....	276
Alvarez, D.P.; Luque, A.G. Patogenicidade de cepas de <i>Microsporium fulvum</i> , aisladas de suelos tratados con herbicidas Pathogenicity of <i>Microsporium fulvum</i> , isolated from soil treated with herbicides.....	282
Neirotti, E.; Tanaka, Y.; Azevedo, J. L. de Formação de esferoplastos em <i>Humicola</i> sp Sphaeroplast formation process in the fungus <i>Humicola</i> sp.....	287
Domingues, R.M.C.; Coutinho, S.P.; Ferreira, M.C.S. Aderência de cepas de <i>Bacteroides fragilis</i> a cultura de célula primária Adherence of <i>Bacteroides fragilis</i> strains to a primary cell culture.....	290
Informações Técnico-Científicas (SBM).....	293
Volume 21, Número 4	
Magalhães, M.; Silva, G.P. da; Magalhães, V.; Antas, M.G.; Andrade, M.A.; Taten, S. <i>Vibrio fluvialis</i> e <i>Vibrio furnissii</i> associados a diarreia aguda infantil <i>Vibrio fluvialis</i> and <i>Vibrio furnissii</i> associated with infantile diarrhea.....	295
Gilho, A.E.; Moreira, A.F.; Baldacci, E.R.; Okay, Y.; Manissadjian, A.; Nascimento Mós, E. do; Santos, M.A.; Carpio, J.P.H.; Durigon, E.L. Pesquisa de <i>Clostridium difficile</i> em fezes de crianças internadas em enfermaria geral pediátrica Detection of <i>Clostridium difficile</i> in stools of children in a pediatric ward.....	299

Oliveira Santos, B.M. de; Tanaka, A.M.U. <i>Staphylococcus aureus</i> em portadores sãos de diferentes categorias de enfermagem do HC - FMRPUSP: Fagótipos e resistência a antibióticos. <i>Staphylococcus aureus</i> among healthy carries working in different nursing categories at HC - FMRPUSP: phagotypes and resistance to antibiotics.....	304
Oliveira Santos, B.M. de; Aguillar, O.M.; Takakura, M.S. Colonização simultânea de <i>Staphylococcus aureus</i> na cavidade nasal e mãos de portadores sãos de um hospital-escola Behavior of <i>Staphylococcus aureus</i> strains from simultaneous areas of healthy carriers working in different nursing category in a general teaching hospital.....	309
Queiroz de Freitas, M.A.; Magalhães, H. Enterotoxigenicidade de <i>Staphylococcus aureus</i> , isolados de vacas com mastite Enterotoxigenicity of <i>Staphylococcus aureus</i> isolated from Mastitic Cows.....	315
Carmo, L.S. do; Bergdoll, M.S. Toxinfecção alimentar por <i>Staphylococcus</i> em Belo Horizonte (Brasil) Staphylococcal food poisoning in Belo Horizonte (Brazil).....	320
Rossi Jr., O.D.; Iaria, S.T.; Santos, I.F. dos; Berchieri Jr., A. Carne mecanicamente separada de origem bovina. I - Influência de dois sistemas de desossa manual sobre as características microbiológicas do produto recém obtido Mechanically separated beef. I - Influence of two deboning systems on the microbiological characteristics of the newly obtained product.....	324
Calderon, D.F.; Furlanetto, S.M.P. Análise bacteriológica de carnes suínas comercializadas em açougues da cidade de São Paulo Bacteriological quality of fresh pork.....	331
Mayer, M.P.A.; Zelante, F.; Simionato, M.R.L. Efeito das condições de cultura na produção de mutacina Effect of culture conditions on mutacin production.....	337
Tauk, S.M.; Malagutti, E.N.; Medeiros, A.M. Nutrientes, atividades enzimáticas e microrganismos do solo tratado com vinhaça e ou torta de filtro em cultura de cana-de-açúcar Nutrients, enzymatic activities and microorganisms of soil treated with vinasse and/or filter cake in sugar cane culture.....	342
Nahas, E.; Assis, L.C. de; Silva, A.P. Sensibilidade do <i>Aspergillus niger</i> ao thiram Sensitivity of <i>Aspergillus niger</i> to thiram.....	350
Aguero, J.M.Z.; Macêdo, G.R. de; Facciotti, M.C.R.; Schmidell, W. Influência do pH na síntese e liberação de glicamilase por <i>Aspergillus awamori</i> NRRL 3112 e <i>Aspergillus niger</i> NRRL 337 Influence of pH on glucoamylase synthesis and secretion by <i>Aspergillus awamori</i> NRRL 3112 and <i>Aspergillus niger</i> NRRL 337.....	355
Rosa, C.A.; Novak, F.R.; Almeida, J.A.G.; Mendonça-Hagler, L.C.; Hagler, A.N. Leveduras de leite humano coletado na cidade do Rio de Janeiro, Brasil Yeasts from human milk collected in Rio de Janeiro, Brazil.....	363
Ceccarelli, V.R.S.M.; Schmidt, C.; Trabulsi, L.R. Isolamento de <i>Yersinia enterocolitica</i> em um laboratório particular da cidade de São Paulo Isolation of <i>Yersinia enterocolitica</i> in São Paulo, Brazil.....	364
Smania Jr., A.; Gil, M.L.; Smania, E.F.A. Um novo meio para a conservação de <i>Neisseria</i> A new medium (MSE) for the preservation of <i>Neisseria</i>	366