

Revista de Microbiologia



SBM

**Sociedade
Brasileira de
Microbiologia**

São Paulo — Brasil

Volume 22 Número 1 Jan. - Mar. 1991

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
	2ª Secretária Rosana F. Vazoller USP - São Carlos	2º Tesoureiro Roberto M. Yanaguita Inst. de Ciências Biomédicas - USP Deptº de Microbiologia Av. Prof. Lineu Prestes, 1.374 05508 - São Paulo - SP
Conselho Fiscal	Paulo S. Minami (FCF/USP) Claudete R. Paula (ICB/USP) Sebastião Timo Laria (ICB/USP)	
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	

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 significante 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 FORMAÇÃO DOS MANUSCRITOS: Datilografie 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. Lineu Prestes, 1374
Cidade Universitária - USP
05508 - São Paulo - SP - Brasil

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



REVISTA DE MICROBIOLOGIA
PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA
VOLUME 22 JANEIRO-MARÇO 1991 NÚMERO 1
REV. MICROBIOL. (S. PAULO), 22(1)

CONTEÚDO-CONTENTS

PÁG

Garcia Jr., O.

- Isolamento e purificação de *Thiobacillus ferrooxidans* e *Thiobacillus thiooxidans* de algumas minas de urânio e carvão do Brasil
Isolation and purification of Thiobacillus ferrooxidans and Thiobacillus thiooxidans from some cool and uranium mines of Brazil..... 1

Cruz Pradella: J.G. da; Zuccolo, M.; Lopes, S.A.R.; Oliveira, M.S.

- Produção de micélio vegetativo de *Pisolithus tinctorius*: efeito de fontes de nitrogênio e cultivo em fermentador agitado
Pisolithus tinctorius vegetative mycelia production: effects of nitrogen sources and cultivation in stirred tank fermenter..... 7

Yokoya, F.; Oliva-Neto, Pedro de

- Características da floculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum*
Flocculation of yeast cells by Lactobacillus fermentum..... 12

Facchin, I.; Barros, N. M. de

- Produção de enzimas extracelulares por *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson
Production of extracellular enzymes by Nomuraea rileyi (Farlow) Samson..... 17

Levy, C.E.; Montelli, A.C.; Furtado, J.S.; Pereira, A.A.; Mamizuke, E.M.: Silva; M.L.R.; Francisco, W.

- Resistência a drogas em cepas bacterianas de pacientes de serviços hospitalares. Laboratórios de Referência do Sistema COBA..... 21

Dias, J.C. de A.R.; Hernandez, D.; Hofer, E.

- Resistência e antimicrobianos em *Vibrio cholerae* não 01 e *V. parahemolyticus*
Antibiotic resistance in non-01 Vibrio cholerae and V. parahaemolyticus..... 28

Martins, F. M.; Silva, M.G. da; Gontijo Filho, P.P.

- Relação entre a resistência a antibacterianos e antissépticos em *Pseudomonas aeruginosa*
Relationship between antimicrobial and antiseptic resistance in Pseudomonas aeruginosa strains..... 34

Silva, M. do R. R. S.; Fernandes, O. de F. L.; Silva, H. M. e

- Agentes etiológicos de micetomas ocorridos em Goiânia - Goiás
Etiologic agents of mycetoma found in the State of Goiás - Brazil..... 39

Ferreira, M. C.; Domingues, R. M. C. P.; Silva Neto, I.D.; Uzedo, M. de	
Microscopia eletrônica de varredura de <i>Bacteroides fragilis</i> exposto a agentes antimicrobianos	
Scanning electron microscopy of <i>Bacteroides fragilis</i> exposed to antimicrobial agents.....	44
Fantinato, V.; Zelante, F.	
<i>Streptococcus salivarius</i> : detecção de cepas produtoras de substâncias semelhantes à bacteriocinas contra bactérias bucais	
Bacteriocin like-substances production by <i>Streptococcus salivarius</i> against oral bacteria.....	49
Liberal, M. H. T.; Bonghton, E.	
Observações preliminares sobre a sensibilidade "in vitro" de amostras de <i>Myoplasma e Acholeplasma</i> de origem bovina	
Preliminary observations on "In Vitro" sensitivity of <i>Mycoplasma and Acholeplasma</i> strains of bovine origin.....	55
Novo, M. do C. de S.S.; Lopes, E. S.; Ortolan, M. C. A.	
Levantamento da nodulação, persistência de herbicidas e isolamento de <i>Bradyrhizobium</i> spp de áreas com rotação cana-de-açúcar/amendoim	
Spontaneous nodulation, isolation of rhizobia and persistance of herbicides in area of sugar cane / peanut rotations.....	60
Fonseca, H.	
Sistema de amostragem para análise de aflatoxinas em grãos	
Sampling plan for analysis of aflatoxins in grains.....	66
Hagler, A. N.; Mendonça-Hagler, L. C.	
Teste do azul de diazonium B para leveduras cultivadas por três dias em meio contendo uréia	
A diazonium blue B test for yeasts grown three days on yeast carbon base - urea agar.....	71
Moura, S. M.; Destro, M. T.; Franco, B. D. G. M.; Brancaccio, R. M.	
Proposição de um novo iluminador para pesquisa de <i>Listeria</i>	
Low cost illumination system for <i>Listeria</i> spp research.....	75
Informações Técnico-Científicas (SBM).....	78

ISOLATION AND PURIFICATION OF *THIOBACILLUS FERROOXIDANS* AND *THIOBACILLUS THIOOXIDANS* FROM SOME COAL AND URANIUM MINES OF BRAZIL.

Oswaldo Garcia Júnior

SUMMARY

Thirteen *T. ferrooxidans* isolates and eight *T. thiooxidans* isolates were obtained and purified from acid effluents or solid samples of coal and uranium mines in Brazil. The species were identified by tests of utilization of inorganic substrates as energy source (Fe^{2+} , S° and $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) and by growth patterns on solid medium. Growth of some *T. ferrooxidans* isolates was also measured on the basis of substrate oxidation (Fe^{2+}), turbidity and plate counts. Fe^{2+} determination during bacterial growth, expressed as oxidation percentage, shows good correlation with growth, as indicated by counts and culture turbidity.

Key words: *Thiobacillus ferrooxidans*, *Thiobacillus thiooxidans*, bacterial isolation.

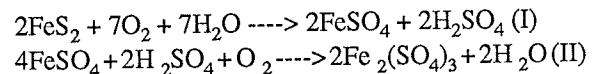
INTRODUCTION

In 1922, Waksman and Joffe (19) isolated a sulfuroxidizing bacterium from the soil, which was classified under the name of *Thiobacillus thiooxidans*. This bacterium oxidizes elemental and reduced sulfur compounds producing sulfuric acid, and the energy derived from this oxidation is utilized to fix atmospheric CO_2 for growth.

In 1950s, Colmer et al. (2) and Temple & Colmer (12) characterized a bacterium from the acid drainage of coal mines whose energy for autotrophic growth was derived from ferrous iron oxidation or from oxidation of metallic sulfides and reduced sulfur compounds such as elemental sulfur, thiosulfate, etc. This bacterium was designated *Thiobacillus ferrooxidans*.

The two bacteria, and the second in particular, are the organisms responsible for metal solubilization from rocks containing mineral sulfides (18). This process, known as bacterial leaching of metals, is currently applied to recover copper and uranium from low grade ores (4). The metal solubili-

zation in the bacterial leaching process is due to the presence of an acid ferric sulfate solution generated by bacterial oxidation of pyrite (FeS_2) according to the following reactions:



Since the discovery of bacterial participation in the mineral leaching process, a number of papers have been published about the isolation of thiobacilli cultures (9, 10, 15). In Brazil, however, little work has been done on the practical aspects of this process (1, 14).

The objective of the present study was to isolate and purify cultures of *T. ferrooxidans* and *T. thiooxidans* from different sites of uranium and coal mines, and also to study some aspects of *T. ferrooxidans* growth. This study is very important as a fundamental step for the development of applied bacterial leaching programs and also for the organization of a thiobacilli collection for basic studies.

1. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química - UNESP, Caixa Postal 355 - 14.800 - Araraquara - SP - Brasil.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection — Samples were collected from various sites in uranium and coal mines and also from acid solutions obtained in leaching tests of uranium ores. The general characteristics of each sample is presented in Table 1.

Sampling sites were chosen after a rapid paper pH test to check the acidity of the sample; only the acid samples ($\text{pH} < 4.0$) were selected.

Culture media — *Ferrous iron medium*. The 9K medium described by Silverman & Lundgren was utilized (11). The composition of this medium was as follows: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 3.0 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.5 g; K_2HPO_4 - 0.5 g; KCl - 0.1 g; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ - 0.01 g; 1N H_2SO_4 - 1 ml; H_2O - 700 ml. Ferrous iron, as the energy source, was supplied as $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ with 300 ml of a 14.74% (w/v) solution. Components were sterilized in two separate solutions in order to eliminate iron precipitation. The first one, by autoclaving at 121°C for 20 minutes and the iron solution by membrane filtration (0.45 µm pore size). The solutions were aseptically mixed and the final pH of the medium was about 2.8.

Sulfur medium — The same salt solution of the 9K medium was utilized, with elemental sulfur replacing ferrous iron solution as energy source. The salt solution was completed to 1000 ml with H_2O and aliquots of 100 ml were dispensed in 250-ml Erlenmeyer flasks containing 1 g of sulfur, previously sterilized by autoclaving at 110°C for 1 hour.

Thiosulfate medium — This medium was prepared according to Colmer et al. (2). Its composition was as follows: KH_2PO_4 - 3 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0.2 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.1 g; CaCl_2 - 0.2 g and $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 5.0 g as energy source. The salts were dissolved in 1000 ml of distilled H_2O and autoclaved at 121°C for 20 minutes. The final pH was about 4.8.

For purification purposes, two solid media were utilized. *T. ferrooxidans* was purified in 9K medium solidified with 0.45% agarose and *T. thiooxidans* was purified in thiosulfate medium solidified with 1.5% agar.

Isolation and purification procedure — Each sample (5.0 ml and 1.0 g for liquid and solid samples, respectively) was inoculated in both liquid media, 9K - Fe^{2+} and 9K - S^0 , and incubated at 30°C in rotary shaker (150 rpm) as an enrichment

step for the isolation of *T. ferrooxidans* and *T. thiooxidans* cultures, respectively. After bacterial growth, indicated either by ferrous iron oxidation (green to red-brown colour) in 9K - Fe^{2+} medium or by a decrease in pH ($\text{pH} < 1.0$) in 9K - S^0 medium, the cultures were reinoculated (5% w/v) into the respective fresh media. Five to ten transfers in liquid medium were carried out before the final purification, which was made by dilution plating and single-colony isolation on 9K - Fe^{2+} - agarose medium for *T. ferrooxidans* and thiosulfate-agar medium for *T. thiooxidans*. Single colonies of each culture were picked out and inoculated as described above into the respective liquid medium. After growth, they were sprayed again onto solid medium. This procedure was repeated three times to assure the purification of the cultures.

Substrate utilization — All purified cultures were tested for substrate utilization (Fe^{2+} , S^0 and $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) as a routine step for definitive identification of the two species. Bacterial growth was evaluated by ferrous iron oxidation in 9K - Fe^{2+} medium, by pH decrease in 9K - S^0 medium, and by thiosulfate oxidation in thiosulfate liquid media.

Growth of *T. ferrooxidans* — Percentage of Fe^{2+} oxidation is normally used to evaluate the growth of *T. ferrooxidans*. To correlate this oxidation with colony numbers and turbidity, an experiment was done using four *T. ferrooxidans* isolates.

Growth was carried out in triplicate in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of the T&K medium described by Tuovinen & Kelly (13) inoculated with each *T. ferrooxidans* isolate (5% v/v) and incubated at 30°C in a rotary shaker (150 rpm). T&K medium was chosen for this type of experiment because its pH (<1.8) prevents Fe^{2+} precipitation. Periodically, 1-ml samples were withdrawn from the flasks for Fe^{2+} determination. At the same time, 1-ml samples were used for colony counting, through serial dilutions in H_2O pH 2.8, and by plating the appropriated dilution onto 9K - Fe^{2+} agarose medium. Samples of 2 ml were also collected from the flasks to determine turbidity after the discoloration procedure reported by Mandl(7), with slight modifications.

Analytical determinations — Ferrous iron (Fe^{2+}) was determined by volumetric titration with potassium dichromate (17). Thiosulfate utilization was followed by thiosulfate disappearance as indicated by titration with iodine solution, using a

starch solution (2%) to determine the end point (17). Measurements of pH were made directly on the liquid samples and on ore suspensions, which had been prepared previously by shaking a 1:1 (w/v) mixture of solid sample and distilled water in a rotary shaker for 1 hr (150 rpm).

RESULTS AND DISCUSSION

By combining enrichment-dilution and single-colony isolation techniques, thirteen isolates of *T. ferrooxidans* and eight of *T. thiooxidans* were purified from the samples used in this study. Table 1 shows these isolates as well as the origin and some characteristics of the samples. As can be seen, all samples collected were acid, probably as a consequence of the oxidative activity of these species on the sulfide substrate present in the ores. As mentioned earlier, sulfuric acid is produced during bacterial pyrite oxidation.

It is interesting to notice that *T. ferrooxidans* was isolated from all samples, whereas *T. thiooxidans* was not found in all samples. Specific environmental conditions at the sites of samples collection may explain this finding. Different pHs, mineral composition, substrate availability and

dissolved metal contents of each sample were more advantageous for *T. ferrooxidans* than for *T. thiooxidans*.

T. ferrooxidans cultures were purified on ferrous iron medium solidified with agarose, since common agar types tested inhibited colony formation. Only purified types of agar such as agarose or other gelling agents, without organic contaminants (e.g. sugar) such as silicic acid gel, are useful for *T. ferrooxidans* colony production. Difficulties in growing *T. ferrooxidans* on solid medium have been reported by Tuovinen & Kelly (13), Manning (8), Mishra et al. (9) and Visca et al. (15).

Figure 1 shows a *T. ferrooxidans* isolate and figure 2 shows a single colony of the same isolates, 10 days after plating. The colonies are small (c.a. 0.5 mm in diameter), with irregular margins and show a red-brownish colour due ferric iron precipitation.

In contrast, *T. thiooxidans* colonies were obtained in common agar medium (with thiosulfate as energy source) without noticeable problems. As can be seen in figures 3 and 4, they are also small with more regular margins and show a white-yellow colour 10 days after plating.

The two species were identified by growth pattern on solid medium and substrate utilization,

TABLE 1 - Samples utilized for *T. ferrooxidans* and *T. thiooxidans* isolation.

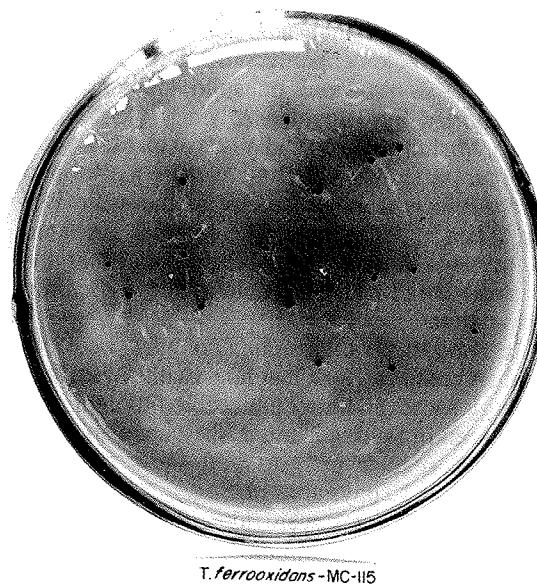
Source	Characteristics ⁽¹⁾	Sample pH	Species isolated	Code
Uranium mine Poços de Caldas-MG	pyritic uranium ore effluent of heap leaching	3.1 1.5	<i>T. ferrooxidans</i> <i>T. ferrooxidans</i> <i>T. thiooxidans</i>	Tf-PCE Tf-PCP01 Tt-PCP01
	acid drainage from wastes	2.7	<i>T. ferrooxidans</i> <i>T. thiooxidans</i>	Tf-001E Tt-001E
Uranium mine Figueira-PR	pyritic uranium ore effluent of column leaching	3.8	<i>T. ferrooxidans</i>	Tf-FG02
	acid drainage from wastes	1.0 2.4	<i>T. thiooxidans</i> <i>T. ferrooxidans</i> <i>T. thiooxidans</i>	Tt-FG01 Tf-FG460 Tt-FG460
Uranium mine Lagoa Real-BA	effluent of column leaching	1.5	<i>T. ferrooxidans</i>	Tf-LR
Coal mine Figueira-PR	pyritic wastes	1.9	<i>T. ferrooxidans</i> <i>T. thiooxidans</i>	Tf-ELC Tt-ELC
	pyritic wastes	2.4	<i>T. ferrooxidans</i>	Tf-MCPI
	acid drainage from wastes	1.7	<i>T. ferrooxidans</i>	Tf-MC01
	acid drainage from wastes	2.1	<i>T. ferrooxidans</i>	Tf-MC04
	acid drainage from wastes	2.1	<i>T. ferrooxidans</i>	Tf-MC115
Coal mine Siderópolis-SC	acid drainage from wastes	1.7	<i>T. ferrooxidans</i> <i>T. thiooxidans</i>	Tf-SSP Tt-SSP
	acid drainage from wastes	2.0	<i>T. ferrooxidans</i> <i>T. thiooxidans</i>	Tf-SLP Tt-SLP

(1) Samples were collected at different points in the same mine.

a procedure widely utilized for this purpose(16). Table 2 shows that all *T. ferrooxidans* isolates were capable of utilizing Fe^{2+} , S^0 and $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ as energy source for growth. Some significant differences in substrate utilization efficiency were de-

tected among isolates. As expected, isolates of *T. thiooxidans* did not utilize Fe^{2+} as energy source, according to the results shown in table 3, whereas sulfur and thiosulfate were normally utilized.

The growth pattern of four *T. ferrooxidans*



T. ferrooxidans - MC-115

FIGURE 1 - Colonies of a *T. ferrooxidans* isolate(Tf-MC115) grown on ferrous iron-agarose medium.

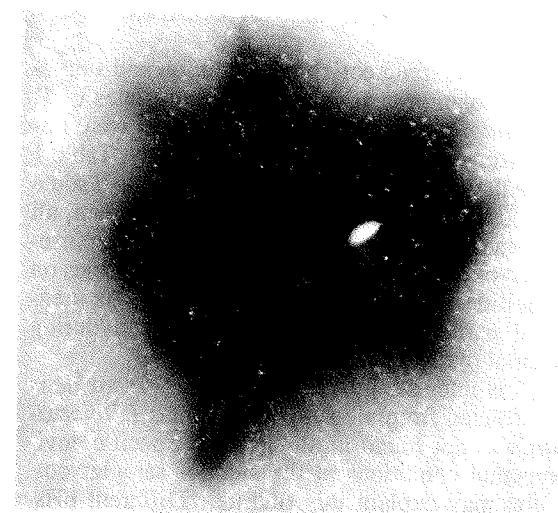
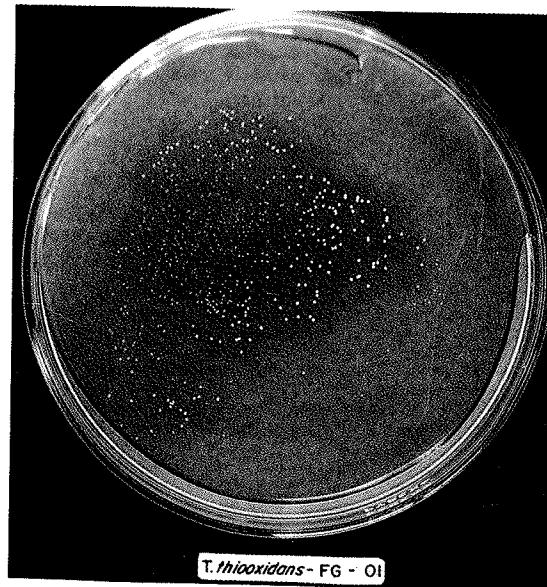


FIGURE 2 - Colony of a *T. ferrooxidans* isolate(Tf-MC115) grown on ferrous iron-agarose medium (50X).



T. thiooxidans - FG - 01

FIGURE 3 - Colonies of a *T. thiooxidans* isolate(TtFG01) grown on thiosulfate-agar medium.

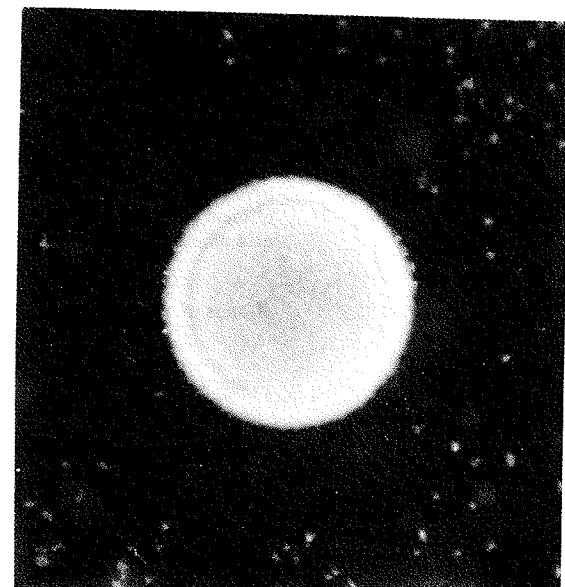


FIGURE 4 - Colonies of a *T. thiooxidans* isolate(Tt-FG01) grown on thiosulfate-agar medium (50X).

isolates was investigated by ferrous iron oxidation, culture turbidity and colony counts on agarose -Fe²⁺ plates. Figure 5 (a,b and c) shows the growth curves for one *T. ferrooxidans* isolate (Tf-PCE). The same growth patterns were obtained with the other isolates. We can see that the parameters utilized to evaluate bacterial growth showed good correlation. However, it should be pointed out that bacterial viability quickly declined (Fig. 5c) after maximum growth (C.a 8,0 x 10⁷ cells/ml) was reached (60 hours), with the next point (72 hours) showing half the bacterial number. This may have been due to the Fe³⁺ accumulation in the liquid medium, which became toxic to *T. ferrooxidans* at high concentration, mainly in the absence of Fe²⁺ or of another energy source (5,6). Thus, it is very important to store the culture flask under refrigeration after complete Fe²⁺

TABLE 2 - Substrate utilization by different *T. ferrooxidans* isolates.

Isolate	Fe ²⁺⁽¹⁾ (%)	S ⁽²⁾ (pH)	S ₂ O ₃ ²⁻⁽³⁾ (%)
If-PCE	100.1	1.1	45.9
Tf-PCP01	95.5	1.2	50.8
Tf-001E	73.0	0.9	46.0
Tf-FG02	100.0	0.8	36.3
Tf-FG460	100.0	0.8	51.0
Tf-ELC	77.5	0.9	46.0
Tf-MC01	100.0	0.7	58.8
Tf-MCPI	100.0	0.7	15.6
Tf-MC04	55.0	0.9	41.0
Tf-MC115	100.0	0.7	41.0
Tf-SSP	64.0	0.9	28.0
Tf-SLP	100.0	0.8	36.0
IF-LR	74.0	0.9	26.1

1. Percent oxidation after 48 hours of growth.

2. pH values after 10 days of growth.

3. Percent oxidation after 15 days of growth.

TABLE 3 - Substrate utilization by different *T. thiooxidans* isolates.

Isolate	Fe ²⁺⁽¹⁾ (%)	S ⁽²⁾ (pH)	S ₂ O ₃ ²⁻⁽³⁾ (%)
Tt-PCP01	ND ⁽⁴⁾	1.1	40.0
Tt-001E	ND	0.7	70.1
Tt-FG01	ND	1.1	20.1
Tt-FG460	ND	0.9	50.1
Tt-ELC	ND	0.6	65.2
Tt-MC01	ND	0.6	51.0
Tt-SSP	ND	1.0	40.0
Tt-SLP	ND	0.9	40.0

1. Percent oxidation after 10 days of growth.

2. pH values after 5 days of growth.

3. Percent oxidation after 10 days of growth.

4. Not detected

oxidation in liquid medium to avoid the pronounced loss of viability.

Independently of this aspect, the good correlation concerning the growth measurements indicates that percentage of ferrous iron oxidation is sufficient to evaluate the growth of *T. ferrooxidans*, as previously demonstrated by Hoffman & Hendrix (3). It is an easier and more reliable method than plate cell count or turbidity measurements.

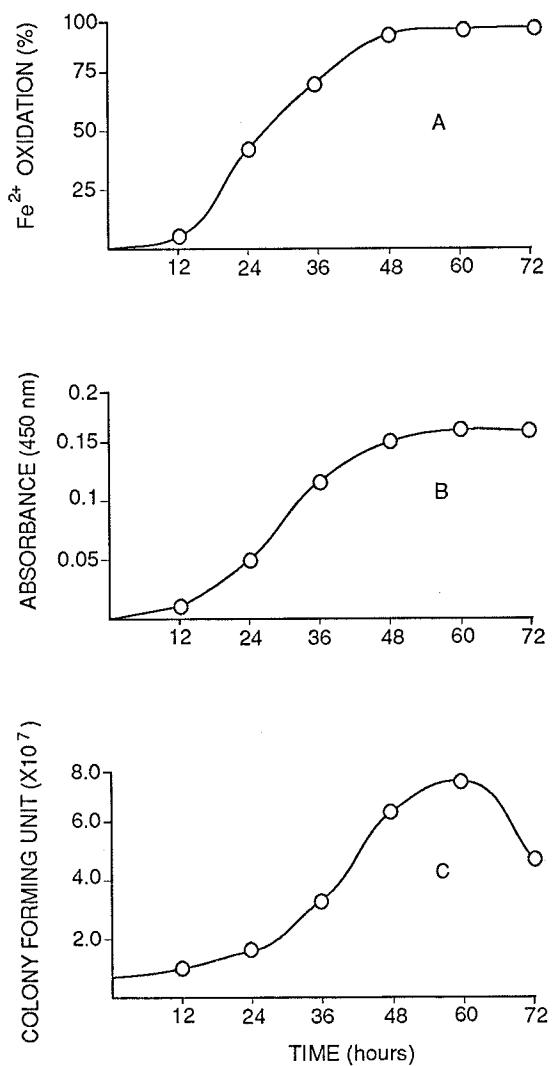


FIGURE 5 - Growth curves of an isolated of *T. ferrooxidans* (Tf-PCE) on ferrous iron medium.

The results shown here, represent the initial part of a bacterial leaching uranium program. This type of study is very important as a fundamental step in acquiring knowledge about isolation procedures and some basic physiological characteristics of *T. ferrooxidans*, and also for the organization of a collection of this species for use in basic and applied research.

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to thank "Empresas Nucleares Brasileiras" (currently Urânia do Brasil S/A) for the permission to publish this paper and Prof. Dermeval C. de Lima and Prof. Maria Celia Bertolini for their help in preparing this manuscript. Part of this work was supported by CNPq.

RESUMO

Isolamento e purificação de *Thiobacillus ferrooxidans* e *Thiobacillus thiooxidans* de algumas minas de urânio e carvão do Brasil.

Utilizando-se efluentes ácidos ou mesmo amostras sólidas de algumas minas de urânio e de carvão do Brasil, isolou-se e purificou-se 13 culturas de *T. ferrooxidans* e 8 culturas de *T. thiooxidans*. As espécies foram identificadas por testes de utilização de substratos inorgânicos como fonte de energia (Fe^{2+} , SO_4^{2-} e $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) e pelo padrão de crescimento em meio sólido. Medidas de crescimento de alguns isolados de *T. ferrooxidans* pela avaliação da oxidação do substrato (Fe^{2+}), turbidez da cultura e contagem de unidades formadoras de colônias em placas foram também realizadas; a dosagem do Fe^{2+} (substrato energético) durante o crescimento bacteriano, expresso como porcentagem de oxidação, mostrou excelente correlação com o crescimento, indicado pelo número de colônias e turbidez.

Palavras chaves: *Thiobacillus ferrooxidans*, *Thiobacillus thiooxidans*, isolamento.

REFERENCES

- Andrade, T. R. Lixiviação bacteriana de minério de cobre de baixo teor. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 82 p., 1984.
- Colmer, A. R.; Temple, K.L. & Kinckle, M.E. An iron-oxidizing bacterium from the acid drainage of some bituminous coal mines. *J. Bacteriol.*, 59: 317-328, 1950.
- Hoffman, L.E. & Hendrix, J.L. Inhibition of *Thiobacillus ferrooxidans* by soluble silver. *Biotechnol. Bioeng.*, 18: 1161-1165, 1976.
- Hutchins, S.R.; Davidson, M.S.; Brierley, J.A. & Brierley, C.L. Microorganisms in reclamation of metals. *Ann. Rev. Microbiol.*, 40: 311-336, 1986.
- Jones, C.A. & Kelly, D.P. Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on ferrous iron in chemostat culture: influence of product and substrate inhibition. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 33: 241-261, 1983.
- Kelly, D.P. & Jones, C.A. Factor affecting metabolism and ferrous iron oxidation in suspensions and batch cultures of *Thiobacillus ferrooxidans*: relevance to ferric iron leach solution regeneration. In: L.E. Murr; A.E. Torma & J.A. Brierley (Eds.); Metallurgical Applications of Bacterial Leaching and Related Microbiological Phenomena, Academic Press, N. York, p. 19-44, 1978.
- Mandl, M. Growth and respiration kinetics of *Thiobacillus ferrooxidans* limited by CO_2 and O_2 . *Biológia* (Bratislava), 39: 429-434, 1984.
- Manning, H.L. - New medium for isolating iron-oxidizing and heterotrophic acidiphilic bacteria from acid mine drainage. *Appl. Microbiol.*, 30: 1010-1016, 1975.
- Mishra, A.K.; Roy, P. & Mahapatra, S.S.R. Isolation of *Thiobacillus ferrooxidans* from various habitats and their growth pattern on solid medium. *Curr. Microbiol.*, 8: 147-152, 1983.
- Razzell, W.E. & Trussell, P.C. Isolation and properties of an iron-oxidizing *Thiobacillus*. *J. Bacteriol.*, 85: 595-603, 1963.
- Silverman, M.P. & Lundgren, D.G. Studies on the chemoaerotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. *J. Bacteriol.*, 77: 642-647, 1959.
- Temple, K.L. & Colmer, A. R. The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium: *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.*, 62: 605-611, 1951.
- Tuovinen, O.H. & Kelly, D.P. Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. I. Use of membrane filters and ferrous iron agar to determine viable number and comparison with $^{14}\text{CO}_2$ -fixation and iron oxidation as measures of growth. *Arch. Microbiol.*, 88: 285-298, 1973.
- Vaisbich, S.; Pinto, M.L.M. & Borzani, W. Lixiviação bacteriana de rejeito de minério de cobre de Camaráquã pela ação de bactéria isolada do próprio minério. *Rev. Bras. Tecnol.*, 10: 289-302, 1979.
- Visca, P.; Binchi, E.; Polidoro, M.; Buonfiglio, V.; Valentini, P. & Orsi, N. - A new solid medium for isolating and enumerating *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 35: 71-81, 1989.
- Vischniac, W.V. The genus *Thiabacillus*. In: R.E. Buchanan & N. E. Gibbons (Eds.); Bergy's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., Williams and Wilkins, Baltimore, p. 456-461, 1974.
- Vogel, A.I. Textbook of quantitative inorganic analysis, including elementary instrumental analysis. 4th Edition, Longman Group, LTD, London, 925p.
- Vuorinen, A.; Hiltunen, P.; Hsu, J. C. & Tuovinen, O. H. -Solubilization and speciation of iron during pyrite oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Geomicrobiol. Jour.* 3: 95-119, 1983.
- Waksman, S. A. & Joffe, J. S. Microorganisms concerned in the oxidation of sulfur in the soil. III. *Thiobacillus thiooxidans*, a new sulfur-oxidizing organism isolated from the soil. *J. Bacteriol.*, 7: 230-256, 1922.

Received for publication in 4/10/90.

PISOLITHUS TINCTORIUS VEGETATIVE MYCELIA PRODUCTION: EFFECTS OF NITROGEN SOURCES AND CULTIVATION IN STIRRED TANK FERMENTER

José Geraldo da Cruz Pradella
Marisa Zuccolo
Sônia Aparecida Reis Lopes
Margaretti Simões Oliveira

SUMMARY

Vegetative mycelia of *Pisolithus tinctorius* strain isolated from *Eucalyptus* sp. were cultivated in erlenmyers flasks and bench scale stirred fermenters for the utilization in the ectomycorrhizal inoculum production. Starting from the MMN liquid medium it was studied the influence of various nitrogen sources (NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, peptone and sodium glutamate) concentrations on micela growth rate improvement. It was showed that yeast extract, sodium glutamate and peptone additions improved cell growth rate almost 100% related to the cultivation in the MMN medium. The NH_4NO_3 was not able to increase the micelia growth rate, and the $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, at concentration of 3.8 g/L, had a deleterious effect on cell growth. It was performed an ectomycorrhizal mycelia cultivation in a repeated batch way with a yeast extract MMN medium, attained a cell concentration of 3.5 g dry matter/L of fermenter volume after 15 to 20 days. This system was run for about 2.5 months without interruptions.

Key words: *Pisolithus tinctorius*, submerged culture, mycelia production.

INTRODUCTION

The growth of effective fungus strains in stirred tank fermenter is a very reasonable option in the large scale ectomycorrhizal inoculant production. This technique provides the best environmental conditions for the axenic growth of the high cell concentration at smaller fermentation time and the possibility to achieve the quality control of the produced vegetative mycelia.

Informations about the submerged cultivation of *Pisolithus tinctorius* strains isolated from *Pinus* sp. is very scarce. It concerns only some results in

small stationary cultures of *P. tinctorius* related to medium composition (3, 8, 9) temperature(3) and respiratory activity (9). The mycelia growth rate is very small with fermentation times of 15 to 20 days, attained cell mass concentration of about 4.0 to 5.0 g dry wheigth L^{-1} culture medium.

Related to the nitrogen sources, Taber and Taber (9) showed that *P. tinctorius* could utilize ammonium ion, nitrate ion, urea, and peptone as nitrogen sources, with NH_4NO_3 as the best one for cell growth. Smith (8) found that amine nitrogen leaded to a slightly better *P. tinctorius* growth than on nitrate nitrogen source.

The utilization of *P. tinctorius* strains for *Eucalyptus* sp. mycorrhization is a much more recent experience. Large scale mycorrhizal field experiments have been taking place in Australia(10).

No information about the cultivation of these *P. tinctorius* strains are available in the literature.

The purpose of this work is to contribute to the understanding of the nitrogen sources influence and cell cultivation in submerged fermentation of *P. tinctorius* isolated from *Eucalyptus* sp.

MATERIALS AND METHODS

Microrganism - It was utilized a *P. tinctorius* strain (ITA-6) isolated from *Eucalyptus* sp. by Bioplanta Co. (Campinas, SP, Brazil). The strain was maintained by subculture in MMN (Modified Merlin-Norkans) culture agar medium.

Culture media — The composition of the MMN culture media (4) for 1L of solution was the following: glicose 10.0 g, CaCl_2 0.05 g, NaCl 0.025, KH_2PO_4 0.5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.25 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g, malt extract 3.0 g, tiamine HCl 100 μg , FeCl_3 solution (1% w/v) 1.2 mL. The MMN culture medium added with 1.0 g L^{-1} of yeast extract utilized in some experiments was named basic medium.

The influence of various nitrogen sources in the cell growth was performed with the basic medium. The following nitrogen sources were utilized: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 3.8 g L^{-1} , NH_4NO_3 2.0 g L^{-1} , sodium glutamate 8.5 g L^{-1} , peptone 4.5 g L^{-1} .

Inoculum preparation — Mycelium completely grown coming from a 1 L erlenmeyer flask with 200 mL of the MMN medium was separated in a Büchner funnel, suspended in 50 mL of physiological saline solution and disrupted in a mixer. The obtained suspension was utilized as inoculum for the experiments.

Analytical methods — A known volume of the samples taken from the experiments was filtered through filter paper Whatman 42, dried at 70°C for 48h and weighted. The cell mass concentration was calculated and expressed as g dry weight per L of culture medium. The glucose concentration was measured in the filtered sample by the DNS method (1). The pH was read with a pHmeter in the filtered sample.

Experiments — The experiments on the influ-

ence of nitrogen sources was run in stationary erlenmeyers flasks with 50 mL of culture media at 30°C. The experiments in fermenter was run in a repeated batch mode. About 400mL of the cell suspension coming from a preceding batch was utilized as the inoculum for the next batch in four successive cycles. The utilized fermenter was a New Brunswick MF-107, with 3.0 L of working volume, 0.8 L min^{-1} air flow rate, 300 min^{-1} agitation speed and 30°C of temperature.

RESULTS AND DISCUSSION

Figures 1, 2 and 3 presents the results of the influence of various nitrogen sources in the *P. tinctorius* growth.

The introduction of 1.0 g L^{-1} yeast increased the cell mass concentration from 3.0 g L^{-1} to 4.8 g L^{-1} at fermentation time of 34 days, with a much higher sugar consumption. In a previous work it was showed that higher yeast extract concentration could not improve the cell growth rate (7). We believe that yeast extract at 1.0 g L^{-1} can supply the *P. tinctorius* isolate micronutrients requirements. Taber and Taber (9), studying the growth of *P. tinctorius* proposed a 0.7 g L^{-1} culture medium at a 10.0 g L^{-1} initial glucose concentration for the fungus cultivation in liquid media.

Following this suggestion, experiments were performed with different nitrogen sources at an initial nitrogen concentration of 0.7 g L^{-1} . The intro-

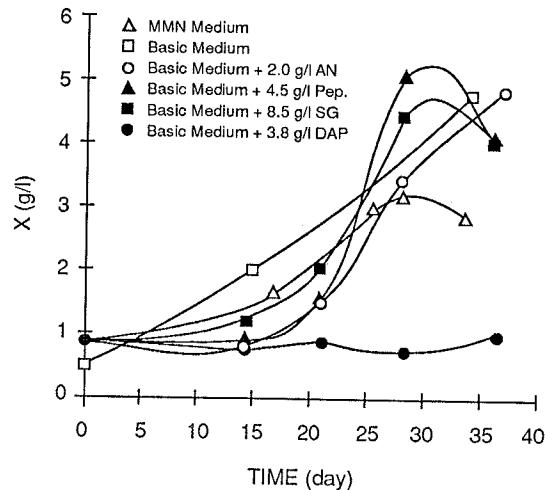


FIGURE 1 - Cell growth of *P. tinctorius* cultures in various nitrogen sources.

(AN: NH_4NO_3 , Pep: peptone, SG: sodium glutamate, DAP: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$)

duction of NH_4NO_3 had no influence in the growth of *P. tinctorius*. On the other hand, the two organic nitrogen sources utilized, sodium glutamate and peptone, were able to increase the biomass concentration at 28 days of fermentation time, attained cell concentration respectively of 4.9 and 4.5 g^{-1} . Possible beneficial buffer (see Figure 3) and nutricional effects could explain the best performance of these cultural media. The

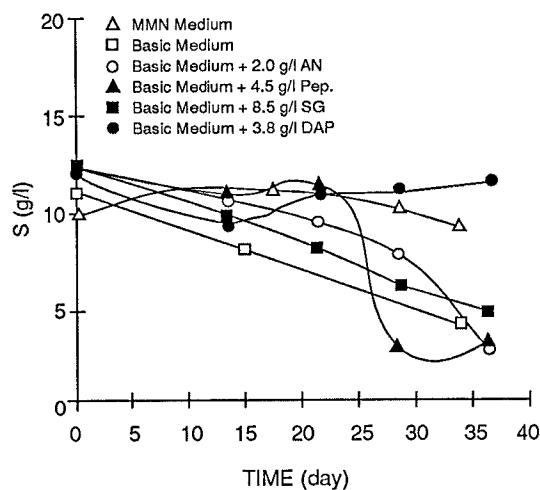


FIGURE 2 - Sugar consumption of *P. tinctorius* cultures in various nitrogen sources (Legend same as Figure 1).

growth in the MMN culture medium is less effective than in any other tested media, excepted for the 3.8 g^{-1} $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ medium. In this case no appreciable growth was observed.

The results of the repeated batch experiment are presented in the Figure 4.

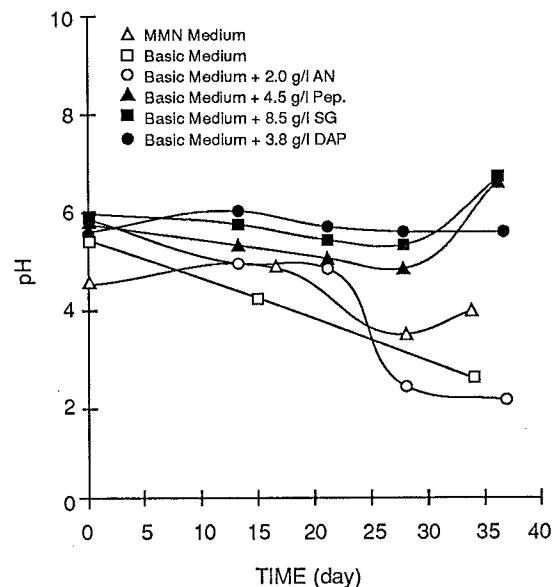


FIGURE 3 - Evolution of pH values of *P. tinctorius* cultures in various nitrogen sources (Legend same as Figure 1).

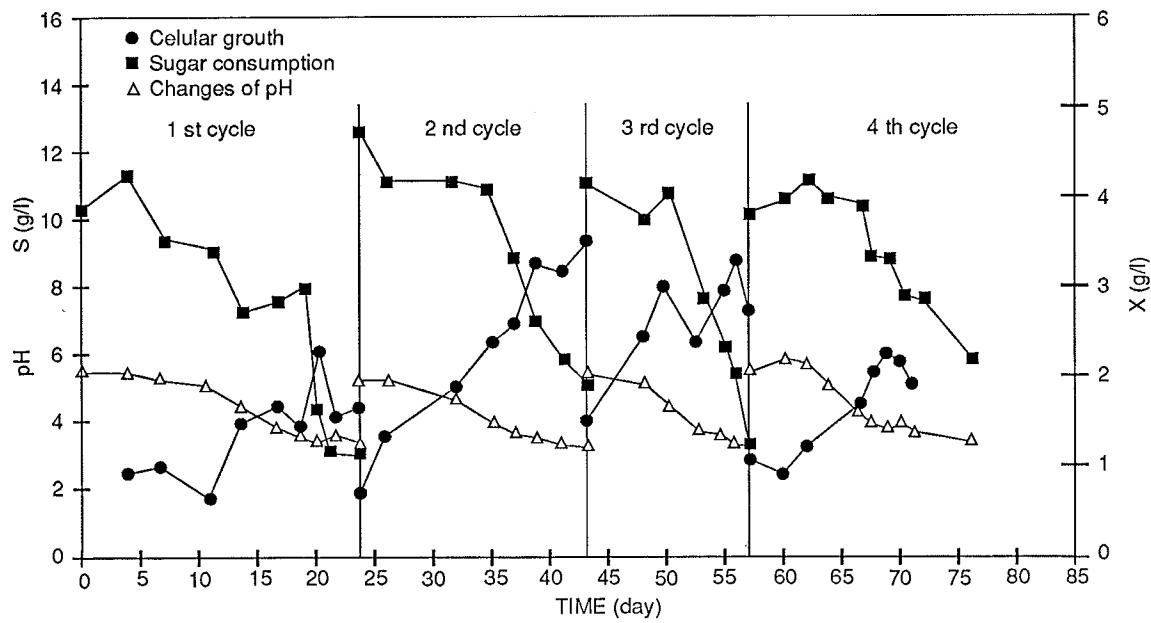


FIGURE 4 - Repeated batch of *P. tinctorius* cultivation in submerged fermenter

Despite the differences related to the cell mass concentration attained at the end of each cycle, there is a reproducible similar pattern of cell growth, sugar consumption and pH changes throughout all the experiment. Table 1 shows that maximum cell mass concentration in fermentation liquid phase is about 3.0 to 3.5 g^{L-1}. However, it should be pointed out that about 30 to 50% of the total produced biomass was not in the fermentation liquid phase but remained attached on the fermentor inner parts at the end of the cycles. Cell mass productivity increased from first to second cycle almost 50% and fell to the initial value in the last cycle with a reasonable cell mass concentration of 2.2 g^{L-1}. In all cycles the pH came from a initial value of about 5.0-5.5 and went to 3.0-3.5. At the end of the cycles, the pH remained stable around this value and it appears from Figure 4 that there is a similar behaviour for the cell mass concentration. We believe that the very active micropellets forms (1 to 3 mm diameter) of *P. tinctorius* vegetative mycelia obtained at the end of each cycle could be utilized as a inoculum source for the ectomycorrhizal inoculant production, as proposed by Tommerup et al (10).

Table 2 shows a comparison of parameters values from literature and this work. It can be seen that the media proposed for *P. tinctorius* cultivation (basic medium and basic medium plus peptone or sodium glutamate) leaded to productivities values smaller than the values reported by others (3, 5, 8). These differences could be explained by the utilization of a optimized carbon-nitrogen sources ratio, as studied by Smith (8) and Melhuishi and Hackskaylo (2); and the use of a actively growing

TABLE 1 - Parameters value for repeated batch of *Pisolithus tinctorius* ITA-06 cultivation.

Cycle	X _{max} (g/L)	P _x ^(a) (g/L.d)
1 st	2.2	0.10
2 nd	3.5	0.15
3 rd	3.2	0.13
4 th	2.2	0.10

(a) Cell productivity calculated by:

$$P_x = \frac{X_{max} - X_0}{t_{max}}$$

mycelia suspensions as inocula for the experiments, as proposed by Smith (8). The high P_x and X_{max} values founded by Litchfield and Arthur (3) probabily are due to the utilization of high concentrations of peptone and yeast extract, besides the presence of NH₄NO₃ as nitrogen source in the Pridham-Gottlieb medium.

Moreover, Table 2 suggests that the MMN medium resulted in a poor mycelia *P. tinctorius* growth in liquid media, as showed by the data from Pons et al (6) and this work.

The parameters values obtained in the fermenters are very close to the static flasks experiments. Improvements in these figures would be possible if problems like cell mass attachments inside the fermenter were overcomed.

In conclusion, we may say that the utilization of a yeast extract addition in the MMN medium was able to increase the growth rate of *P. tinctorius* liquid media cultivation.

Besides, nitrogen organic sources such as sodium glutamate and peptone can be used to improve the *Pisolithus tinctorius* cultivation for ectomycorrhizal inoculant production purpose.

The yeast extract (1.0 g^{L-1}), MMN medium could be used in a repeated batch fermentation at-

TABLE 2 - Comparison with literature parameters values for *Pisolithus tinctorius* cultivation.

Culture media ^(a)	X _{max} (g/L)	P _x ^(b) (g/L.d)	References
Priddy-Gottlieb	11,4	0,28	(2)
Glucose + (NH ₄) ₂ SO ₄	6,6	1,00	(3)
Glucose + ammonium tartrate	3,0	0,21	(8)
Glucose + ammonium tartrate	2,8	0,12	(9)
MMN	1,0	0,04	(10)
MMN	3,0	0,06	This work
Basic	4,8	0,11	This work
Basic + peptone	4,9	0,14	This work
Basic + sodium glutamate	4,5	0,13	This work
Basic (fermenter, 2 nd cycle)	3,5	0,15	This work

(a) Presented only carbon and nitrogen sources when it was not utilized a known culture media.

(b) P_x calculated as Table 1.

tained reasonable mass concentration at the end of the cycles.

A reproducible pattern of growth without appreciable loss of cell mass productivity through the cycles suggests that a repeated batch mode of fermentor operation can be used for ectomycorrhizal biomass production.

It was verified that the process needs research efforts in order to solve problems like cell mass attachment inside the fermenter and pH change influence on to cell growth rate.

Nomeclature

P_x — cell mass productivity (g/Ld)

S — glucose concentration (g/L)

t — fermentation time (d)

X — cell mass concentration (g/L)

Subscripts

O — relative to initial fermentation time

max — relative to maximum cell mass concentration

RESUMO

Produção de micélio vegetativo de *Pisolithus tinctorius*: efeito de fontes de nitrogênio e cultivo em fermentador agitado.

Micélio vegetativo de *Pisolithus tinctorius* isolado de *Eucalyptus* sp. foi cultivado em erlenmeyers e fermentadores de bancada, para utilização na produção de inóculo ectomicorrízico. Partindo-se do meio de cultura MNM, foi estudada a influência de várias fontes de nitrogênio (NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, peptona e glutamato de sódio) na velocidade de crescimento micelial. A adição de extrato de levedura, glutamato de sódio e peptona ao meio de cultura, aumentou a velocidade de crescimento celular em quase 100% em relação ao cultivo no meio MNM. O NH_4NO_3 não foi capaz de aumentar a velocidade de crescimento micelial e o $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ em concentração de 3,8 g/L teve efeito deletério sobre o crescimento celular. Foi re-

alizado um cultivo do micélio ectomicorrízico em uma fermentação em batelada repetida usando-se o meio MNM com extrato de levedura, atingindo-se uma concentração celular de 3,5 g/L após 15 a 20 dias de cultivo. Esse sistema foi operado por cerca de 2,5 meses sem interrupções.

Palavras chave: *Pisolithus tinctorius*, cultura submersa, produção de micélio.

ACKNOWLEDGMENTS

This project was supported by grants from Secretaria de Ciência e Tecnologia e Desenvolvimento Econômico do Estado de São Paulo.

REFERENCES

- Bernfeld, P. Amylases α and β . In: Colowick, S.P and Kaplan, N.O (eds.) *Enzymology*, 1: 149-150, 1955.
- Booker, C.E. Free and Bound Amino Acids in the Ectomycorrhizal Fungus *Pisolithus tinctorius*. *Mycologia*, 72: 869-881, 1980.
- Litchfield, J.H & Arthur, M.F. Growth of Selected Ectomycorrhizal Fungi in Aerated Liquid Cultures. *Dev. Ind. Microbiol.*, 24: 289-293, 1983.
- Marx, D. H. Antagonism of Mycorrhizal Fungi to Root Pathogenic Fungi and Soil Bacteria. *Phytopathology*, 59: 153-163, 1969.
- Melhuish, J. H. J. & Hacskeylo, E. Fatty-Acid Content of *Pisolithus tinctorius* in Response to Changing Ratios of Nitrogen and Carbon Source. *Mycologia*, 72: 1041-1044, 1980.
- Pons, S.; Mudge, K. W. & Negm, F. B. Effect of Mannitol on the *In vitro* Growth, Temperature Optimum, and Subsequent Ectomycorrhizal Infectivity of *Pisolithus tinctorius*. *Can. J. Bot.*, 64: 1812-1916, 1986.
- Pradella, J. G. C. *Technical Report N. 28345*. IPT, Brazil, 1990.
- Smith, R. A. Nutritional study of *Pisolithus tinctorius*. *Mycologia*, 74: 54-58, 1982.
- Taber, W.A. & Taber, R. A. Nutrition and Respiration of Biomass and Mycelium of *Pisolithus tinctorius*. *Phytopathology*, 2: 316-322, 1982.
- Tommerup, I. C.; Kueck, C. & Malajczuk, N. Ectomycorrhizal Inoculum Production and Utilization in Australia. Proceedings of the 7th North American Conference on Mycorrhizae. 293-296, 1987.

Received for publication in 06/08/90

CARACTERÍSTICAS DA FLOCULAÇÃO DE LEVEDURAS POR *LACTOBACILLUS FERMENTUM*

Fumio Yokoya
& Pedro de Oliva-Neto

RESUMO

Foi investigada a floculação das células de levedura por cepas de *Lactobacillus fermentum* isoladas de destilaria de álcool (Usina Santa Adelia, S.P.). Algumas linhagens eram capazes de provocar a floculação e outras não. A presença de íon cálcio estimulou a floculação mas uma floculação parcial foi obtida na ausência do mesmo. O intervalo de pH para produzir a desfloculação era diferente daquele encontrado nas leveduras floculantes. O tratamento térmico ou por protease causou a destruição da propriedade floculadora da bactéria. É discutido o efeito da floculação bacteriana na fermentação alcoólica industrial.

Palavras chave: Leveduras, floculação, *Lactobacillus fermentum*

INTRODUÇÃO

Dentre os problemas com contaminantes, a floculação da levedura é um dos mais sérios na fermentação industrial de álcool, especialmente devido a redução na produtividade e aumento na dificuldade de separação da levedura por centrifugação.

Com o uso do reciclo de células para aumentar a produtividade, reduzir o tempo e o custo de fermentação, o problema torna-se mais acentuado pois a causa tende a se acumular a cada ciclo do processo.

Um levantamento dos microorganismos na indústria alcooleira de São Paulo indicou que cerca de 65% das espécies bacterianas isoladas das dornas de fermentação eram do gênero *Lactobacillus* (Gallo, 1990). A observação das usinas de açúcar e álcool tem mostrado que a causa principal da floculação é de origem bacteriana (Serra et al., 1976). Os *Lactobacillus spp.* devem ser de maior significado, uma vez que os *Leuconostoc spp.* não

sobreviveram por um período muito longo nas condições normais de fermentação alcoólica (Kaji, 1989).

As características das leveduras floculantes foram estudadas recentemente por Stratford e Keenan (1988) e Stratford, Coleman e Keenan (1988). O estudo da floculação de leveduras devido a contaminação bacteriana foi conduzido por Serra et al. (1976). Eles concluíram que *Sporolactobacillus sp.* era responsável pela floculação.

A contaminação bacteriana na fermentação industrial de álcool foi descrita por alguns autores, mas a informação sobre o efeito dessas bactérias sobre a floculação da levedura é bastante superficial (Lima, 1975; Stupiello e Horie, 1981, Amorim e Oliveira, 1982).

Este trabalho apresenta os resultados da floculação de suspensão de células de levedura por algumas linhagens de *Lactobacillus sp.* usando o método adaptado de Stratford e Keenan (1988).

Foram testados o efeito de pH da suspensão, do íon cálcio, da concentração de células de bac-

téria e levedura e tratamento das células a alta temperatura e enzima protease.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo da Suspensão de Bactéria e Levedura

A suspensão celular de levedura foi preparada a partir do fermento prensado comercial (Produtos Alimentícios Fleischman Royal Ltda), lavando-se duas vezes com 25 mM EDTA (ácido etíleno diamino tetracético) e ressuspenso em tampão citrato 50 mM, pH 3,0 com 5 mM EDTA. A cada lavagem, a centrifugação foi feita com centrífuga Fanem, Mod. 209, 4000 rpm por 15 min.

A cultura bacteriana foi isolada da amostra de pé-de-cuba floculada coletada na Usina Santa Adélia, Jaboticabal, SP. Duas cepas, uma de *Lactobacillus fermentum* Nº 20, que provocava a flocação das células de levedura e a outra Nº 4, que não causava a flocação, foram selecionadas para o estudo. Essas culturas foram cultivadas no frasco Fernbach de 2800 ml com 750 ml de caldo MRS, Difco, por 48 horas a 30°C no incubador estático, utilizando-se inóculo de 50 ml cultivado no mesmo meio.

As células bacterianas foram coletadas por centrifugação em uma centrífuga refrigerada (International Equipment Company, Mod. B20-A) a 8.000 rpm por 10 min. A partir desta foi feita lavagem por duas vezes com 25 mM EDTA e a suspensão final, em concentração adequada para cada teste, foi feita em tampão citrato 50 mM, pH 3,0 com 5 mM EDTA.

Testes de Flocação - O teste de flocação foi conduzido de acordo com o método de Stratford e Keenan (1988) adaptado para operar com suspensão mista de bactéria e levedura. Um volume total de 40 ml da suspensão de bactéria e levedura foi colocado em frasco cônico de 125 ml. Pouco antes de iniciar a agitação, foi agregada 10 ml de solução de cloreto de cálcio 50 mM, ou 10 ml de água destilada (controle). A agitação foi conduzida a 90 rpm no agitador-incubador orbital (Superohm, Piracicaba, SP.) por 10 min. a 30°C. Em seguida, a amostra do sobrenadante foi retirada cuidadosamente após 10 min. de repouso. A turbidez da amostra foi medida a 600 nm em espectrofotômetro Bausch and Lomb. Spectronic-70, acoplado a leitura digital Celm-100.

Observação Microscópica e Contagem - As amostras do sobrenadante foram diluídas em HCl 0,1N e agitadas vigorosamente no agitador de tu-

bos para dispersão das células de bactéria e levedura. Uma gota da suspensão foi colocada na lâmina de microscópio e contadas no microscópio após coloração com cristal de violeta. A concentração celular foi ajustada para se conseguir campo facilmente contável (número total de células de 30 a 300 por campo). As células nas amostras das partículas floculadas foram contadas da seguinte forma: inicialmente o líquido sobrenadante foi cuidadosamente removido por sucção e as células das partículas foram dispersas na solução de HCl 0,1N com agitação vigorosa por 5 min. A seguir, foi feito um esfregaço e contadas microscópicamente após coloração com cristal de violeta. As células de levedura e bactéria do sobrenadante e partículas floculadas foram contadas em pelo menos 10 campos distribuídos ao acaso (total aproximado de 1000 células), obtendo-se assim a relação entre número de células bacterianas e de leveduras.

Determinação da Massa Seca - A massa seca das leveduras e bactérias foi determinada pela técnica de filtração na membrana usando o filtro Millipore Tipo HAWP047, secando as células depositadas a 105°C, de acordo com o método descrito por O'Toole (1983). A relação entre esses resultados e a medida de turbinez foi usada para converter os dados de turbinez em valores de massa seca.

Efeito do pH na Desflocação - Após a obtenção da flocação a pH 3,0 com a mistura da suspensão de bactéria e levedura, o pH foi alterado adicionando-se a solução concentrada de H₂SO₄ ou NaOH, conforme o caso. A medida da flocação no novo pH foi feita de maneira usual (ver acima).

Determinação do Efeito da Temperatura e do Tratamento com Protease - O efeito da temperatura sobre a capacidade floculadora da bactéria foi determinada aquecendo os tubos (16x150 mm) contendo suspensão de células de bactérias ou leveduras em um banho a 55°C. A cada intervalo de tempo, um tubo era retirado do banho e resfriado rapidamente em água contendo gelo. A seguir, o teste de flocação foi conduzido normalmente usando a suspensão de células tratadas pelo calor.

O efeito do tratamento com protease foi determinado incubando-se a suspensão de células de bactérias ou leveduras com cerca de 150 unidades/ml de protease de *Streptomyces griseus* (Sigma, Cat. P.0652) a 30°C sob agitação no incubador orbital. A cada intervalo foram retiradas amostras para medir a capacidade floculadora agregando-se à suspensão de células de levedura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Floculação de Leveduras

Os resultados do teste de floculação das leveduras por bactérias (cepas floculante e não-floculante) estão apresentados na Figura 1.

Lactobacillus não-floculante não provocou nenhuma floculação nas diversas concentrações testadas. Algum incremento na turbidez do sobrenadante foi observado com o aumento da concentração de células bacterianas por causa da contribuição destas células na turbidez global. Quando o *Lactobacillus* floculante era adicionado a suspensão de levedura, observou-se uma redução drástica na turbidez do sobrenadante. Essa redução foi mais elevada quando a proporção da célula de bactéria era 51 mg para 1.150 mg de levedura para cada frasco com 50 ml da suspensão. Com o aumento da concentração de células de bactéria, a turbidez do sobrenadante permaneceu virtualmente constante.

Como no caso das leveduras floculantes (Stratford e Keenan, 1987), a agitação da suspensão foi essencial para que haja floculação (dados não apresentados). Também, o íon cálcio estimulou a floculação, mas em contraste com a levedura floculante, a sua ausência não inibia completamente a floculação (Figura 1).

A parte do sobrenadante da cultura de bactéria após retirada das células por centrifugação não

apresentou nenhum efeito floculante. Isso indica que o fator floculante está intimamente ligado a célula bacteriana e não é constituído por metabólitos liberados no meio de cultivo durante o crescimento.

Efeito de Proporção entre Células de Bactéria e Levedura.

Há uma relação ótima entre a quantidade de células de bactéria e levedura para causar a floculação. A Figura 2 mostra o resultado de floculação com diferentes concentrações de levedura e uma quantidade fixa de bactéria. Com 84 mg de célula bacteriana em 50 ml de suspensão, a floculação máxima foi observada com 1.380 mg de levedura. A relação em massa de bactéria/levedura foi de 0,061. Pela contagem microscópica observou-se a relação de 4,8 (bactéria/levedura). Com 230 mg de levedura em 50 ml foi observado um sobrenadante bastante turvo. Exame microscópico mostrou somente a presença de células bacterianas. Por outro lado, quando foi adicionado 1.840 mg de levedura, a turbidez do sobrenadante também foi aumentada, mas neste caso, o exame microscópico do sobrenadante mostrou células bacterianas e de leveduras na proporção de 1,38. Esses resultados indicaram que quando a bactéria estava em excesso, toda a célula de levedura era floculada, mas quando a levedura estava em excesso, havia sempre uma parte de células bacterianas associada a levedura. Isso pode explicar os resultados da Tabela 1. Essa Tabela mostra que a relação bactéria/levedura na turbidez mínima do sobrenadante (floculação máxima) varia com a concentração de microrganismos. Essa relação reduz com o aumento da concentração microbiana. Assim, com 117 mg de levedura em 50 ml, a relação em peso foi de 0,12 e com 1.840 mg, essa relação foi de 0,061, o que corresponde a cerca de metade do valor da relação na suspensão mais diluída. A relação microscópica apresentou uma diferença ainda maior (Tabela 1).

Efeito do pH, Protease e Temperatura na Floculação

A Figura 3 mostra a turbidez do sobrenadante a diferentes valores de pH. As concentrações de levedura e bactéria utilizadas foram respectivamente 1.380 mg e 84 mg em 50 ml da suspensão.

A desfloculação foi observada a valores de pH superiores a pH 12 e inferiores a pH 2,5. Entre o pH 2,5 e pH 3,0 havia uma faixa de transição. Esses resultados foram um tanto diferentes daqueles apresentados por leveduras floculantes que

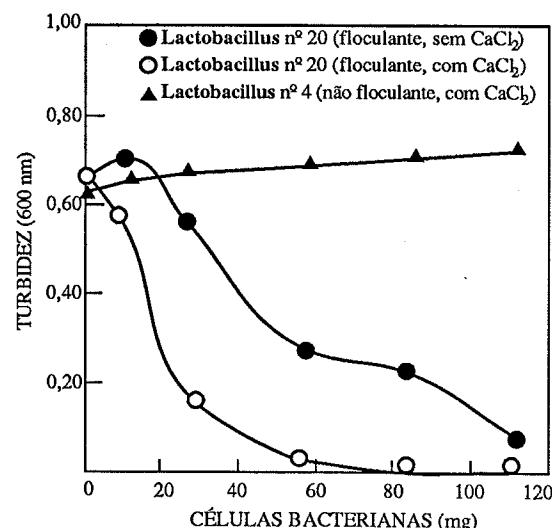


FIGURA 1 - Turbidez do sobrenadante com suspensão de levedura e *Lactobacillus* floculante e não floculante. Massa de levedura foi de 1.150 mg por frasco.

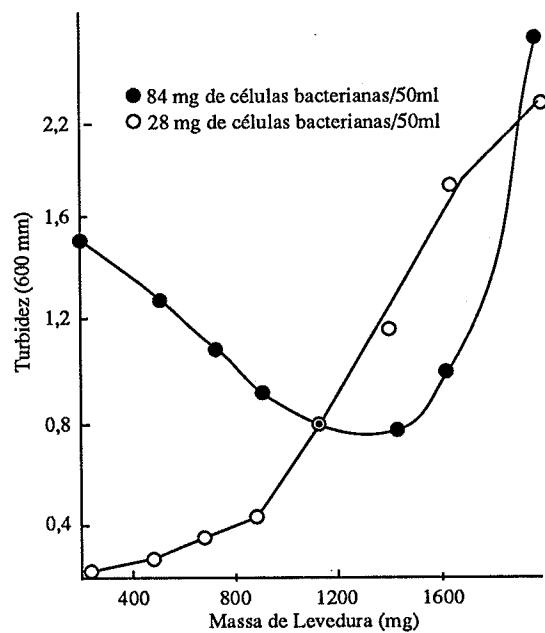


FIGURA 2 - Efeito da relação entre células de bactérias e levedura sobre turbidez do sobrenadante.

TABELA 1 - Proporção de bactéria e levedura com o mínimo de turbidez do sobrenadante. A relação de massa (bactéria/levedura) foi considerada em base a massa seca. A relação do número de células foi obtida baseando-se na contagem microscópica das células de partículas floculadas.

Massa de levedura (mg)	Relação de massa	Relação de número	Turbidez do sobrenadante
1.840	0,061	6,5	3,93
1.380	0,061	5,3	4,26
550	0,102	19,3	2,46
138	0,203	14,1	0,96
117	0,120	31,5	0,44

desflocularam a pH inferior a 2,0 e superior a 7,0 (Stratford, Coleman e Keenan, 1988), mas concordantes com a maioria da floculação observada nas destilarias de álcool.

A desfloculação com a acidificação da suspensão de levedura ("leite de levedura") é comumente observada nas destilarias de álcool. Esse fenômeno é reversível, fato que foi observado também nos nossos ensaios, onde a floculação foi reestabelecida quando o pH era ajustado a valores superiores a 2,5.

Os resultados apresentados até aqui mostram que a floculação de levedura na fermentação alcoólica pode ser causada por *Lactobacillus*, mas nem todas as linhagens são capazes de causar o problema. Isso pode explicar os resultados inconsistentes encontrados na prática industrial, quando relaciona a floculação e a presença de *Lactobacillus*. Além disso, para que haja floculação, o número de células de bactéria deve atingir um valor crítico com relação ao número de células de levedura, o que vem explicar a aparição repentina de floculação na indústria de fermentação alcoólica. No geral, uma floculação é acompanhada de uma mudança sensível na variação das características do "vinho", como pH, acidez e açúcar residual.

O tratamento da bactéria a 55°C destruiu completamente a capacidade floculadora em poucos minutos (Tabela 2). Isso mostra que essa propriedade é termolábil. Já o tratamento das células de levedura nas mesmas condições não afetou a capacidade floculadora. Nem mesmo o tratamento da levedura com água em ebulição destruiu a capacidade de ser floculada.

O tratamento das células bacterianas com protease de *Streptomyces griseus* também destruiu a capacidade floculadora da bactéria (Tabela 3), indicando que o fator responsável deve ser de natureza proteica.

Uma substância de natureza proteica foi detectada em algumas linhagens de *L. fermentum* e era responsável pela aderência da célula a mucosa estomacal de camundongos (Conway e Kjelleberg, 1989). Talvez a floculação das células de levedura por bactéria seja causada por um fator semelhante ao de aderência.

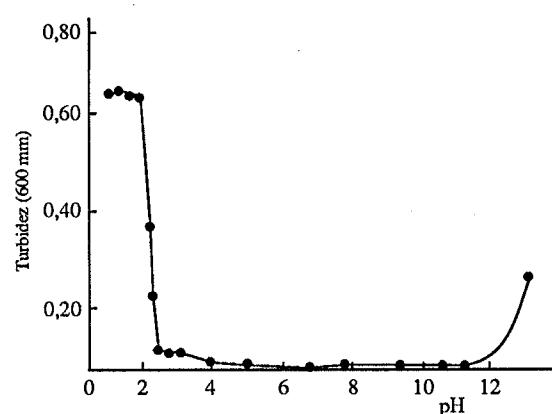


FIGURA 3 - Efeito do pH na turbidez do sobrenadante. Massa de células bacterianas e de levedura foi o 84 mg e 1.380 mg por 50 ml, respectivamente.

TABELA 2 - Efeito do tratamento térmico (55°C) na destruição da capacidade floculadora *Lactobacillus fermentum* Nº 20.

Tempo (min.)	Turbidez do sobrenadante
0	6,7
2	70,3
5	75,1

TABELA 3 - Efeito do tratamento com protease do *Streptomyces griseus* na destruição da capacidade floculadora de *Lactobacillus fermentum* Nº 20.

Tempo (min.)	Turbidez do sobrenadante
0	2,8
60	16,0
90	58,5
120	67,2
180	74,0

Concluindo podemos afirmar que:

1. foi desenvolvido um método para detectar a floculação de células de leveduras provocada por bactérias; 2. existe uma relação quantitativa de células de levedura e de bactéria que resulta na máxima floculação. Essa relação varia com a concentração celular; 3. a floculação por bactéria é estimulada por íon cálcio e inibida a valores de pH extremos e 4. o fator responsável pela capacidade de provocar a floculação de leveduras é termolábil e sensível a protease indicando ser este de natureza proteica.

SUMMARY

Flocculation of yeast cells by *Lactobacillus fermentum*

The flocculation of yeast cells by *Lactobacillus fermentum* was investigated. Some strains of this bacterium were able to flocculate yeast cells but others were not. The presence of calcium ion

stimulated flocculation but partial flocculation was found in absence of this ion. The pH range of deflocculation was different from those found in flocculating yeasts. The treatment of bacterial cells with heat and protease destroyed the flocculating ability. The effect of bacterial flocculation of yeast in alcohol fermentation industry is discussed.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", Campinas, SP., Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amorim, H.V. & Oliveira, A.J. - Infecção na fermentação: Como evitá-la. *Álcool e Açúcar* 5: 12-18, 1982.
2. Conway, P.L. & Kjelleberg, S. - Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus fermentum* strain 737 mouse stomach squamous epithelium. *J. Gen. Microbiol.* 135: 1175-1186, 1989.
3. Gallo, C.R. - Determinação de microbiota de fermentação alcoólica. Tese de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP. Campinas, SP., Brasil, 1989.
4. Kaji, D.A. - Influência de temperatura e infecção láctica na fermentação alcoólica. Tese de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP. Campinas, SP., Brasil, 1989.
5. Lima, U.A. - Produção de etanol. In: Lima, U.A.; Aquarone, E. & Borzani, W. (Ed.): "Biotecnologia - Tecnologia das Fermentações". Vol. 1, Ed. Edgar Blucher, Ltd. São Paulo, Brasil, 1975.
6. O'Toole, D.K. - Weighing technique for determining bacterial dry mass based on rate of moisture uptake. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 506-508, 1984.
7. Serra, G.E.; Cereda, M.P.; Feres, R.J.F.; Bertoso, M.T. & Vicente, A.L. - Contaminação da fermentação alcoólica "floculação do fermento". *Brasil Açucareiro* 93: 336-341, 1976.
8. Stratford, M.; Coleman, H.P. & Keenan, M.H.J. - Yeast flocculation: A dynamic equilibrium. *Yeast* 4: 207, 1988.
9. Stratford, M. & Keenan, M.H.J. - Yeast flocculation kinetics and collision theory. *Yeast* 3: 201-206, 1987.
10. Stratford, M. & Keenan, M.H.J. - Yeast flocculation: Quantitation. *Yeast* 4: 107-115, 1988.
11. Stupiello, J.P. & Horii, J. - Condução da fermentação alcoólica. *Saccharum*. 17: 43-46, 1981.

Recebido para publicação em 08/05/90.

PRODUCTION OF EXTRACELLULAR ENZYMES BY *NOMURAEA RILEYI* (FARLOW) SAMSON

Isabel Facchine
Neiva Monteiro de Barros

SUMMARY

Production of extracellular enzyme in solid culture media was analysed in *Nomuraea rileyi* strains using specific substrates, amylase, lipase and protease production was tested in 3 strains from different sites in the state of Rio Grande do Sul. Production of extracellular enzyme in solid culture media, determined by the formation of halo around the colony and the diameters of both halo and colony was analysed in order to determine the variability among different *Nomuraea rileyi* strains. Results of in vitro tests demonstrated that *N. rileyi* secreted protease, lipase and amylase. The strain Sr 86151 presented significantly lower production of amilolytic enzyme and high proteolytic enzyme as compared to the other two strains.

Key words: Extracellular enzymes, *Nomuraea rileyi*.

INTRODUCTION

The fungus *N. rileyi* is a natural enemy of the caterpillar *Anticarsia gemmatalis*, one of the main pests of soybeans. This pathogen has induced epizooties in the pest population, providing a satisfactory control and permitting a reduction in the use of pesticides.

The fungus *N. rileyi* penetrates the insect, frequently via the tegument, using mechanical pressure and enzymatic activity supplied by protease, chitinase and lipase secretion.

The production of enzymes and toxins is important in the induction of insect disease (3). Studies on the enzymatic activity of entomopathogenic fungi have demonstrated that enzymes may act by penetrating the cuticle, thus opening the way to invasion of the insect body by the fungus (4) since the cuticle of insects is composed of protein and chitin covered with lipids (6).

In vitro tests with *Entomophthora coronata*, *E. apiculata* and *E. virulenta* have shown that these fungi are capable of producing extracellular enzymes with lipolytic, proteolytic and chitinolytic activities. These lytic activities may help elucidate the invasive process of the tegument and other host tissues by this group of fungi (5).

Inhibitory proteases detected in the hemolymph of various invertebrates have been found to act in the defense against invasion by microorganisms. Entomopathogenic fungi similar to *N. rileyi* require the hydrolase complex (proteases, lipases and chitinases) to penetrate and colonize the tissue of the host insect (1).

In studies with *Metarhizium anisopliae* infecting *Galleria mellonella* larvae, it was observed that the diseases are not caused exclusively by a toxic enzyme, but result from the interaction of several enzymes in the system of both host and pathogen. It is possible that the inhibitor against

G. melonella acts not only in the regulation of the endogenous enzymatic activity, but also through the action of the defense mechanism against proteolytic enzymes of the *M. anisopliae* pathogen and perhaps also against other types of proteases (8).

In a study of extracellular production by *Saccharomyces lipolytica*, enzyme production in solid medium was compared with enzyme production in liquid medium. The results showed that the size of the degradation zone is a good indicator of protease production, since, with few exceptions, it expresses the values obtained in qualitative test (10).

This paper reports the enzymatic activity in vitro of three strains of fungus *N. rileyi*.

MATERIAL AND METHODS

The three strains of *N. rileyi* used in the present study were isolated from infected caterpillars collected at three different sites in the State of Rio Grande do Sul: Vacaria (Va 8607), Casca (Ca 87451) and Santa Rosa (Sr 86151).

Enzyme activities were evaluated by inoculating the strains on solid media, which were prepared according to Hankin e Anagnostakis (7), modified by Silva (11).

Media for detection of amylolytic activity were prepared contained 2,3% Difco nutrient agar and 0,2% soluble starch at pH 6. After 7 days of incubation, plates were flooded with iodine.

Colonies showing amylolytic activity were surrounded by a yellow zone on the blue staining agar.

Media for detection of proteolytic activity were prepared contained 2,3% Difco nutrient agar plus 0,5% gelatin at pH 6. After 7 days of incubation, plates were flooded with a saturated solution of $(\text{NH}_4)_3 \text{SO}_4$ to precipitate undegraded protein and reveal the existence of clear zones of degradation.

Media for detection of lipolytic activity were prepared contained per liter Difco peptona, 10 g; Na Cl, 5 g; $\text{CaCl}_2 \text{H}_2\text{O}$, 0,1 g; agar, 20 g; pH 6. Tween 80 (Difco), used as the lipid substrate was sterilized separately and 1 ml added per 100 ml of sterile and cooled basal medium.

Indication of lipolytic activity was shown either by a visible precipitate due to the formation of crystals of the calcium salt of the lauric acid liberated by the enzyme, or as a clearing of such a precipitate around a colony due to complete degradation of the salt of the fatty acid.

Conidial suspensions from sporulated slant cultures of *N. rileyi* were diluted in distilled water containing 0,1% tween 80 and inoculated at four equidistant points on the culture plate using a sterile loop.

Each experiment was replicated eight times.

Inoculated plates were incubated at 25°C in an oven for 7 days and then submitted to the determination of diameter of clear zone and enzymatic indices by the method of Hankin and Anagnostakis (7).

To determine degree of enzyme productivity among the strains used, data were analyzed statistically by analysis of variance and by the Tukey test using an IBM/PC/XT microcomputer, with the level of significance set at $P<0.05$, regarding mean halo + colony diameter.

RESULTS AND DISCUSSION

Results of experiments demonstrated that strains of *N. rileyi* produce extracellular amylolytic, lipolytic and proteolytic activities.

The results of amylolytic activity are presented in table 1. Significant differences in amylase production were observed among strains, with strain Va 8607 presenting the highest index, followed by strain Ca 87451 and strain Sr 86151.

Extracellular amylase production has also been studied by other authors (9) who have reported that the amounts of extracellular amylase determined by the Bucher method (2) are significantly higher when the isolate originates directly from the insect considering the chemical nature of the cuticle than when the isolate is maintained in culture medium with successive replating.

The results of lipolytic activity are presented

TABLE 1 - Mean results obtained in "in vitro" tests of amylolytic activity for three strains of the fungus *N. rileyi*

<i>N. rileyi</i> strain	Mean colony diameter (mm)	mean halo + colony diameter (mm)	Enzyme activity index
Va 8607	3,69	16,60	0,22
Sr 86151	2,79	11,66	0,24
Ca 87451	3,64	16,12	0,23

TABLE 2 - Tukey test for comparison of mean diameters of degradation halo plus colony size in amylolytic activity

<i>N. rileyi</i> strains	Means
Va 8607	16,60 *
Sr 86151	11,66
Ca 87451	16,10 *
D. H. S. (0,05) = 4,09	

*significant at the 5% level of probability

in tables 3 and 4. All strains found to be presented lipolytic activity, with no significant differences among them at the 5% level of probability.

The results of proteolytic activity are presented in tables 5 and 6. Strain Sr 86151 showed the highest enzymatic index, whereas strains Ca 87451 and Va 8607 did not differ from one another at the 5% level of significance.

The proteolytic activity of the fungus *N. rileyi* has been studied by other authors (9) who have reported that protease production is elevated and appears within 36 hours after inoculation.

The results of the in vitro tests showed that all

TABLE 3 - Mean results obtained in "in vitro" tests of lipolytic activity for three strains of the fungus *N. rileyi*

<i>N. rileyi</i> strain	Mean colony diameter (mm)	mean halo + colony diameter (mm)	Enzyme activity index
Va 8607	3,05	17,13	0,18
Sr 86151	4,10	16,76	0,24
Ca 87451	3,97	15,70	0,25

TABLE 4 - Tukey test for comparison of mean degradation halo diameters plus colony size in lipolytic activity

<i>N. rileyi</i> strains	Means
Va 8607	17,13 n. s.
Sr 86151	16,76 n. s.
Ca 87451	15,70 n. s

D. H. S. (0,05) = 4,54

n. s. Not significant at the 5% level

TABLE 5 - Mean results obtained in "in vitro" tests of proteolytic activity for three strains of the fungus *N. rileyi*

<i>N. rileyi</i> strain	Mean colony diameters (mm)	mean halo + colony diameters (mm)	Enzyme activity index
Va 8607	3,31	10,37	0,32
Sr 86151	3,88	19,40	0,20
Ca 87451	3,88	7,41	0,52

TABLE 6 - Tukey test for mean degradation halo diameters plus colony size in proteolytic activity.

<i>N. rileyi</i> strains	Means
Va 8607	10,37
Sr 86151	19,40 *
Ca 87451	7,41

D. H. S. (0,05) = 7,12

*Significant at the 5% level of probability

strains of *Nomuraea rileyi* found to be presented lipolytic, amylolytic and proteolytic activity. The strain Sr 86151 was presented significantly lower production of amylolytic enzyme as compared the other two strains.

ACKNOWLEDGMENT

The Authors are grateful to CNPq and to the Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, where the study was conducted.

RESUMO

Produção de enzimas extracelulares por *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson.

A produção de enzimas extracelulares em linhagens de *Nomuraea rileyi* foi analisada em meio de cultura sólido usando substratos específicos, amilase, lipase e protease. A produção foi testada em 3 linhagens de diferentes locais do estado do Rio Grande do Sul. A produção de enzimas extracelulares em meio de cultura sólido foi determinada pela formação de um halo ao redor da colônia e o diâmetro de ambos halo e colônia foi analisado

para determinar a variabilidade entre as diferentes linhagens de *Nomuraea rileyi*. Resultados de testes "in vitro" demonstraram que *Nomuraea rileyi* secretou protease, lipase e amilase. A linhagem Sr 86151 apresentou menor produção de enzima amilolítica e maior produção de enzima proteolítica quando comparada com as outras duas linhagens.

Palavras chave: enzimas extracelulares, *Nomuraea rileyi*.

REFERENCES

1. Boucias, D. G. e Pendland, J. C. — Detection of Protease Inhibitors in the Hemolymph of Resistant *Anticarsia gemmatalis* which are Inhibitory to the Entomopathogenic Fungus, *Nomuraea rileyi*. *Experientia*, 43: 336-339, 1987.
2. Bucher, G. E. — Potential bacterial pathogens of insects and their characteristics. *J. Insect Pathol.*, 2, 172-195, 1960.
3. Burges, H. D. e Hussey, N. W. — *Microbial control of insects and mites*. London, Academic Press, 861 p., 1971.
4. Ferron, P. — Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Ann. Rev. Entomol.*, 23: 409-442, 1978.
5. Gabriel, B. P. — Enzymatic Activities of some Entomophthoros Fungi. *J. Invert. Pathol.*, 11: 70-81, 1968.
6. Hackman, R. H. — Chemistry of the insect cuticle. In: "The Physiology of Insecta" (M. Rockstein, ed.), 2nded., vol. 6, p. p. 215-270. Academic Press, New York, 1974.
7. Hankin, L. e Anagnostakis, S. L. — The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, 67: 597-607, 1975.
8. Kucera, M. — Proteases from the fungus *Metarrhizium anisopliae* Toxic for *Galleria mellonella* Larvae. *J. Invert. Pathol.*, 35: 305-310, 1980.
9. Mohamed, A. K. A.; Bell, J. V. e Sikorowski, P. P. — Histopathology of *Nomuraea rileyi* in larvae of *Heliothis zea* and in vitro enzymatic activity. *J. Invert. Pathol.*, 31: 345-52, 1978.
10. Ogrydziak, D. M. e Mortimer, R. K. — Genetics of extracellular protease production in *Saccharomyces lipolytica*. *Genetics*, 87: 621-632, 1977.
11. Silva, J. C. — Virulência de mutantes exoenzimáticos de *Metarrhizium anisopliae* var. *anisopliae* e seus revertentes a *Rhodnius prolixus*. Campinas, 137p. (Tese de doutorado-Universidade de Campinas-S.P,1985.)

Received for publication in 04/10/90.

RESISTÊNCIA A DROGAS EM CEPAS BACTERIANAS DE PACIENTES DE SERVIÇOS HOSPITALARES. LABORATÓRIOS DE REFERÊNCIA DO SISTEMA COBA.

Carlos E. Levy
Augusto C. Montelli
João S. Furtado
Alexandre A. Pereira
Elsa M. Mamizuka
Maria L. R. Silva
Waldemar Francisco

O uso indiscriminado de antimicrobianos é motivo de preocupação crescente da comunidade médica-científica, à medida em que tanto as drogas consideradas clássicas, no arsenal terapêutico, como aquelas de introdução recente no comércio, vêm se tornando ineficientes frente aos mecanismos de resistência bacteriana. (1, 2, 3).

As bactérias contam com recursos genéticos de transmissão e aquisição de resistência aos antimicrobianos que vêm superando, rapidamente, a disponibilidade de novos recursos terapêuticos oferecidos pela indústria farmacêutica. (6) Este fato se torna ainda mais preocupante, à medida em que aumenta a população de pacientes imunodeprimidos hospitalizados e aumentam as estirpes bacterianas multirresistentes, para as quais, muitas vezes, não existe uma opção terapêutica sequer, podendo os surtos de infecção hospitalar resultar em elevada letalidade. (8) No entanto, as bactérias já contavam com estes mesmos mecanismos de resistência a drogas, antes mesmo da introdução do primeiro antimicrobiano no comércio. Os dados disponíveis reforçam a hipótese de que a resistência bacteriana é, em grande parte, consequente da "poluição" antimicrobiana dos dias atuais. (4)

Mais importante e racional que a rápida descoberta e disponibilidade de novas drogas parece ser a aplicação de uma política de controle do uso de antimicrobianos, tanto a nível hospitalar, como comunitário. A resistência bacteriana, em índices considerados alarmantes, em nosso meio, pode ser considerada reflexo, particularmente, do mau uso

dos antimicrobianos (1,8) que, por sua vez, é consequente de fatores, como:

- a. falta de critérios para escolha de drogas, tanto para fins terapêuticos, como profiláticos, a nível hospitalar,
- b. falta de informações sobre os padrões de resistência dos germes mais comumente isolados em função da topografia das infecções, levando ao uso indiscriminado de antimicrobianos de largo espectro,
- c. falta de credibilidade das informações produzidas por laboratórios que não empregam metodologia padronizada para os testes de sensibilidade bacteriana, que incluem, obrigatoriamente, o controle de qualidade e
- d. pressão seletiva sobre cepas resistentes, a partir da comunidade, tanto pela população que se automedica livremente, como pelo consumo de produtos alimentícios de origem animal, contaminados por antimicrobianos ou, ainda, por cepas selecionadas pelo uso indiscriminado de antibacterianos em veterinária.

No ambiente hospitalar, por outro lado, a pressão seletiva, geradora de cepas multiresistentes endógenas ou hospitalares, é devida, entre outros, a fatores como: (a) escolha incorreta da droga ou intervalo, duração ou associação de antimicrobianos; (b) indicação não criteriosa e por tempo excessivamente prolongado de procedimen-

tos invasivos (cateterismo vesical, venoso, traqueostomia, alimentação parenteral, entre outros); (c) falhas nos cuidados dispensados aos curativos, na higiene do paciente, no intervalo e técnica das diversas rotinas elaboradas para os procedimentos invasivos, que se tornam responsáveis pela introdução de cepas hospitalares nos diversos sítios e pela proliferação dos germes, facilitando a infecção por germes multiresistentes.

As mãos do pessoal encarregado dos cuidados diários dos pacientes, desempenham papel fundamental, na epidemiologia das infecções hospitalares. Mãos inadequadamente lavadas são responsáveis por infecções cruzadas, envolvendo, invariavelmente, cepas hospitalares de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Serratia marcescens*, com padrões de elevada resistência aos antimicrobianos.

A portaria nº. 196, do Ministério da Saúde, de junho de 1983, estabeleceu as Comissões de controle de Infecção Hospitalar e teve como uma de suas finalidades disciplinar o uso de antimicrobianos no meio hospitalar. Com o uso racionalizado destas drogas, pretende-se: (a) reverter, a médio prazo, os índices de resistências hoje considerados inadmissíveis para a maior parte das drogas disponíveis; (b) reduzir o consumo de antimicrobianos e, consequentemente, diminuir sua atual parcela nos gastos hospitalares; (c) reduzir as infecções hospitalares consequentes do uso inadequado de antimicrobianos para fins terapêuticos e profiláticos.

Considera-se imprescindível, para viabilizar as medidas de controle do uso de antimicrobianos, o conhecimento da etiologia das infecções e os respectivos padrões de resistência às drogas de cada hospital.

O suporte proporcionado pelo Laboratório de Microbiologia, com técnicas atualizadas e a utilização adequada dos resultados, pelo corpo clínico, é condição necessária para a produção de indicadores úteis à avaliação feita pela Comissão de Controle da Infecção Hospitalar, envolvendo: os agentes etiológicos, os serviços hospitalares, as topografias das infecções hospitalares e os padrões de resistência aos antimicrobianos padronizados pela Comissão.

A qualidade destas informações repercute no sucesso terapêutico e na documentação das infecções hospitalares, permitindo a investigação dos casos e dos possíveis surtos envolvendo as cepas tradicionalmente hospitalares e os agentes não usuais, numa determinada topografia ou serviço, ou ainda por apresentarem padrões de resistência incomuns.

O controle do uso de antimicrobianos envolve a introdução de modelo (ficha) padronizado, que forneça, objetivamente, as seguintes informações fundamentais: consumo dos diferentes antimicrobianos, por dose ou unidade de embalagem, por paciente/ano e por unidade de internação.

A análise permitirá relacionar estes dados à etiologia e aos padrões de resistência bacteriana. Resaldada em conceitos atualizados de profilaxia e terapêutica, pode-se atingir os objetivos propostos que parecem, em princípio, bastantes ideais: menor resistência bacteriana, menor gasto com antimicrobianos, resultando em menor custo da hospitalização e menores taxas de infecção hospitalar.

Bactérias prevalentes em serviços hospitalares Laboratórios de Referências do Sistema COBA (5)

Em 1986, foram processadas informações procedentes de 6 Hospitais que compõem o sistema referência do COBA (Hospital Universitário USP, S.Paulo; Hospital do Servidor Público Estadual, S.Paulo; Gastroclínica de São Paulo, São Paulo; Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, Ribeirão Preto; Hospital Universitário da UERJ, Rio de Janeiro; e Hospital São Lucas, PUC, Porto Alegre).

Ao todo foram consideradas 8.211 cepas bacterianas, isoladas representando:

enterobactérias 69,9%
cocos gram positivos 21,7%
bactérias não fermentadoras 8,4%

O número de isolamento de *E. coli*, *S. aureus* *Klebsiella-Enterobacter* spp. correspondeu a 75% do total germes processados (Fig. 1).

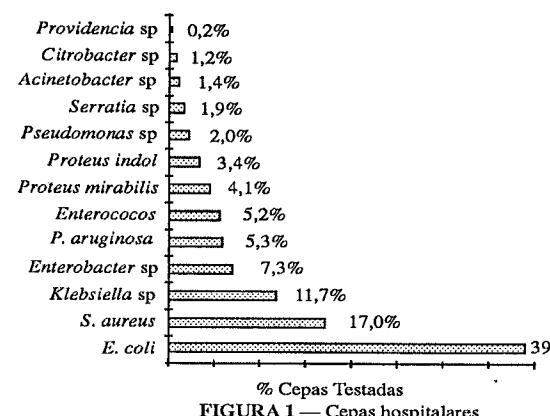


FIGURA 1 — Cepas hospitalares

Fig. 1. Distribuição das bactérias de serviços hospitalares, na amostragem total dos laboratórios de referência em 1986

Nos gráficos a seguir, o número à frente de cada droga representa o total de cepas testadas para o antimicrobiano. O asterisco (*) identifica a droga recomendada para germes de urina, ressaltando-se que o número de cepas testadas não significa necessariamente, que todos os germes tivessem sido isolados de urina.

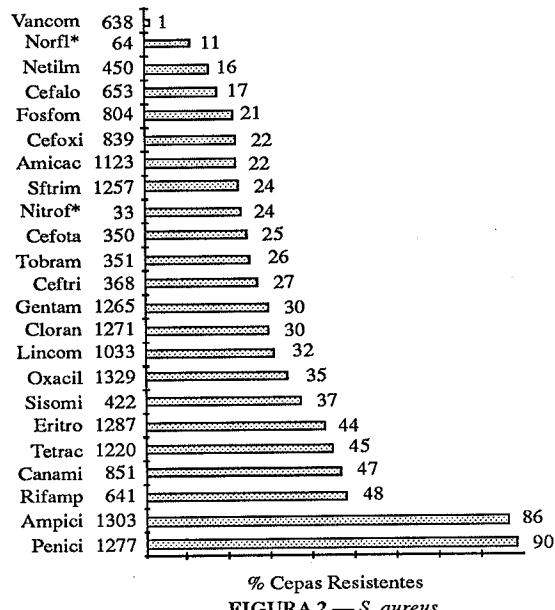
Índices de resistência das amostras **

(a) Cocos gram positivos

— *S. aureus* (Figura 2, abaixo)

Observou-se percentuais de resistência alta (51-100%) à penicilina e ampicilina. Resistência intermediária (21-50%) para drogas de uso clínico tradicional (rifampicina, tetraciclina, eritromicina, lincomicina e sulfametoxazol-trimetroprina) e mais restrito (oxacilina, cefotaxima e amicacina). Resistência baixa (0-20%) foi assinalada para vancomicina e cefalotina. Entre os aminoglicosídios, o melhor desempenho foi para netilmicina.

Das drogas recomendadas para germes do trato urinário, a maior efetividade foi registrada para norfloxacinio.



— *Enterococcus sp.* (Figura 3, ao lado)

Foi grande o número de drogas mostrando resistência alta, incluindo-se todos os aminoglicosídios.

** No final do texto há uma lista das abreviaturas empregadas.

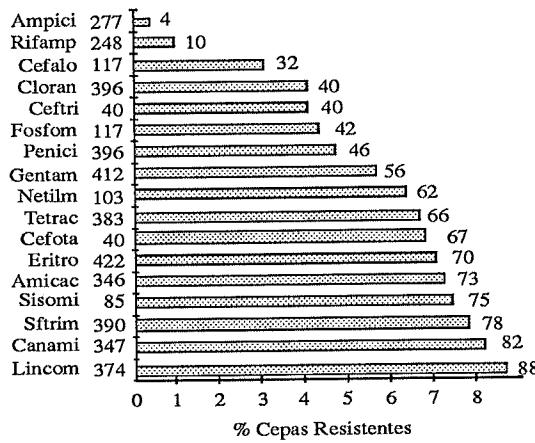


FIGURA 3 — *Enterococcus spp*

cosídios. Na faixa de resistência intermediária ficaram cefalotina, ceftriaxone e penicilina. Na de resistência baixa, ampicilina, vancomicina e rifampicina. O número mínimo de 30 cepas testadas de enterococos frente a drogas recomendadas para o trato urinário não foi alcançado.

(b) Enterobactérias

— *E. coli* (Figura 4, abaixo)

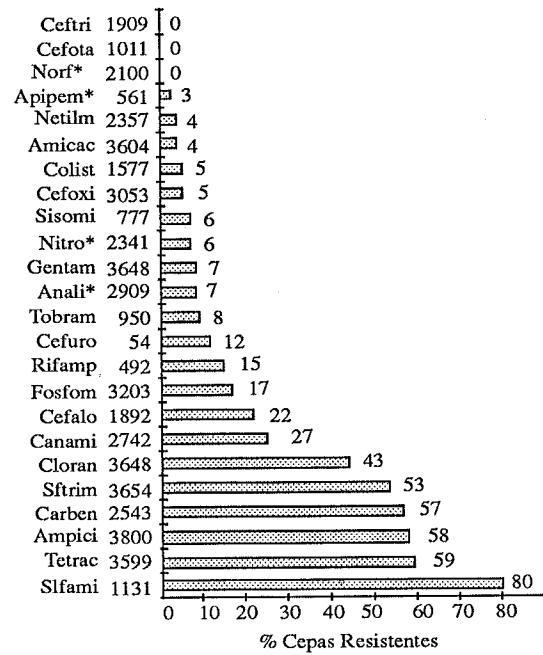


FIGURA 4 — *E. coli*

Tetraciclina, sulfametoxazol-trimetroprina e ampicilina são as drogas de resistência alta. São

drogas largamente empregadas na última década, tanto para pacientes hospitalizados, como para ambulatoriais. Resistência intermediária, de significativa importância, foi verificada para cefalotina (22%). Inúmeras drogas estão na faixa de resistência baixa, com destaque para cefotaxima e ceftriaxone (resistência nula). Para germes do trato urinário, destacam-se norfloxacino (resistência nula), seguida de ácido pipemídico (3%).

— *Klebsiella sp* (Figura 5, abaixo)

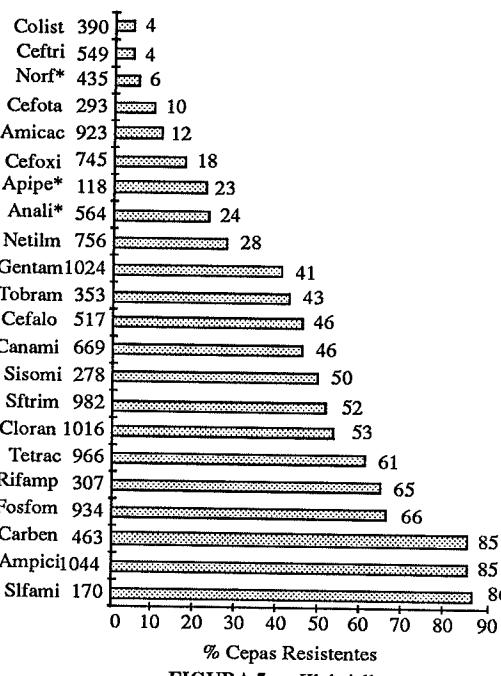


FIGURA 5 — *Klebsiella spp*

Das 24 drogas processadas, 8 estão na faixa de resistência alta, com destaque para tetraciclina, sulfametoazol-trimetoprina, ampicilina, fosfomicina e cloranfenicol; 9 na de resistência intermediária, incluindo os aminoglicosídios (com exceção de amicacina) e cefalotina. Na faixa de baixa resistência, ficaram amicacina e as cefalosporinas de 2a. e 3a. gerações (cefotaxima, cefotaxima e ceftriaxone). Para cepas de *Klebsiella*, isoladas do trato urinário, norfloxacino foi a droga com menor percentual de resistência.

— Outras enterobactérias (Fig. 6-10)

No conjunto, as demais enterobactérias representaram 17,6% das cepas isoladas e seu padrão de resistência a drogas variou em função do gênero ou da espécie (Tab. 1). Daí a necessidade, em cada laboratório, de identificar o germe corretamente e proceder o antibiograma em estreita observância às exigências do método Kirby-Bauer.

TABELA 1—Coeficiente (%) de resistência a 4 antimicrobianos, de cepas isoladas nos Laboratórios de Referência do Sistema COBA, 1986.

Germe.....	Ampi.....	Cefalo.....	Genta.....	Amica
Enterobacter.....	86.....	83.....	41.....	24
Citrobacter.....	74.....	71.....	34.....	44
Serratia.....	97.....	95.....	59.....	47
P. indol +.....	76.....	74.....	23.....	03
P. mirabilis.....	38.....	22.....	12.....	03

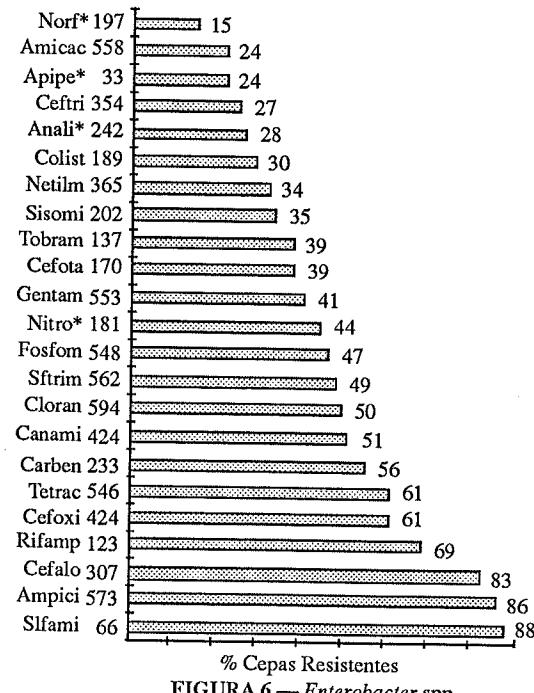
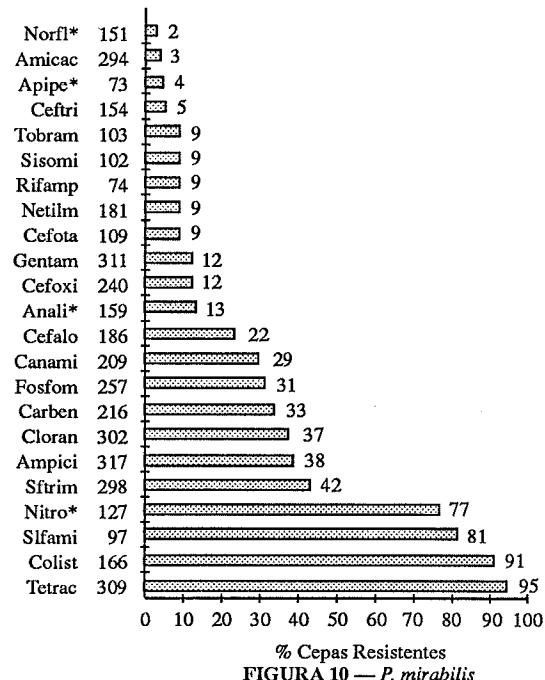
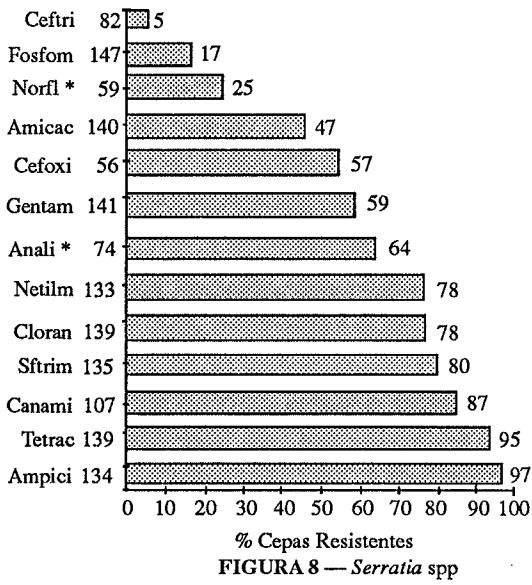
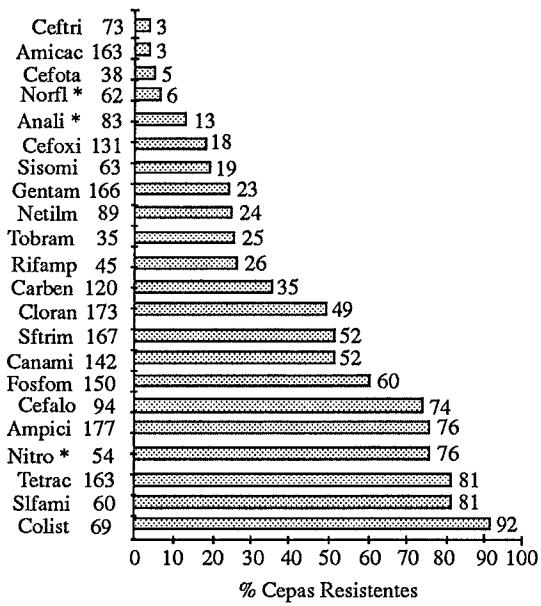
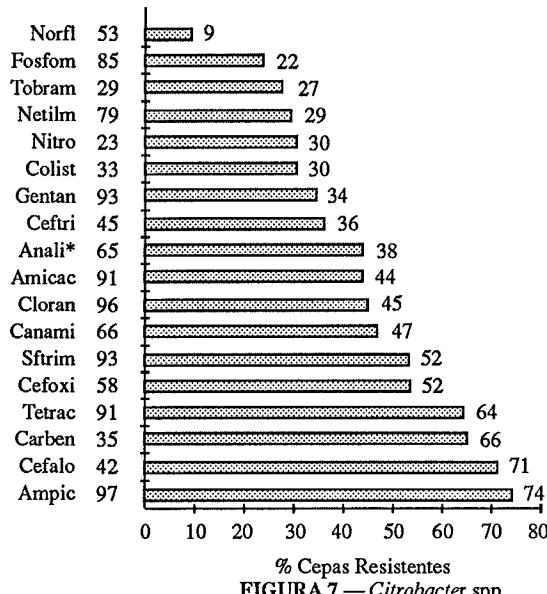


FIGURA 6 — *Enterobacter spp*

Quanto às drogas recomendadas em urina, frente a *Enterobacter*, *Citrobacter*, *P. mirabilis*



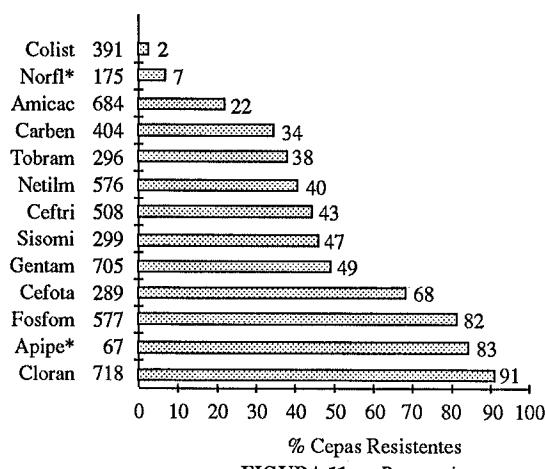
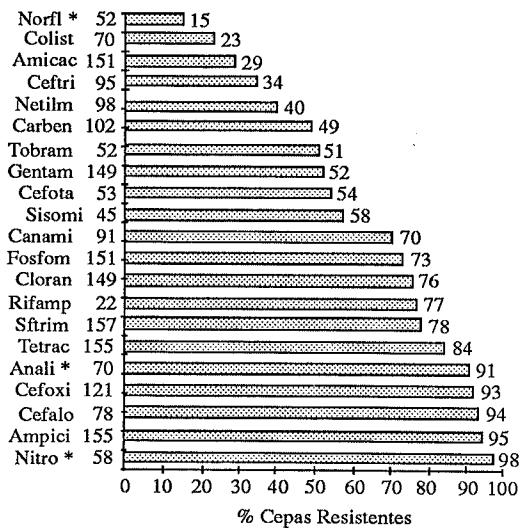
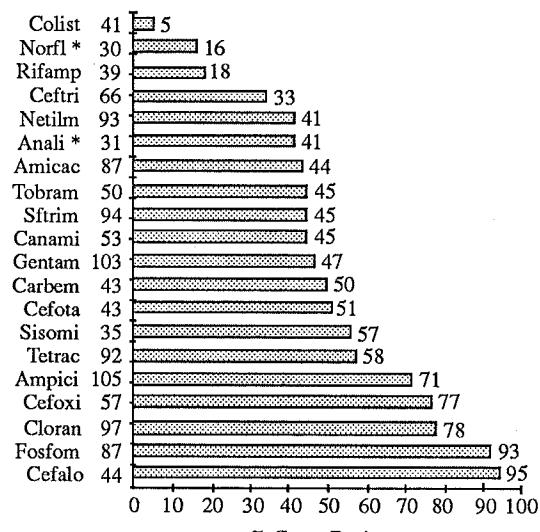
e *P. indol*, os percentuais de resistência mais baixos foram observados para norfloxacino, seguido de ácido pipemídico e ácido nalidíxico. Para *Serratia*, os coeficientes de resistência são, em geral altos, para todas as drogas. Norfloxacino

no ficou na faixa de 25%, estando entre os 3 índices mais baixos.

(c) Bactérias não fermentadoras

— *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 11, abaixo)

As drogas atualmente mais empregadas, para tratamento de infecções por *P. aeruginosa*, amino-glicosídios e carbencilina, estão na faixa de resistência intermediária. Destas, amicacina mostra maior atividade (22% de cepas resistentes). Em resistência baixa, encontra-se apenas norfloxacin (de uso exclusivo para germes do trato urinário) e colistina (de uso muito restrito).

FIGURA 11 — *P. aeruginosa*— Outras spp. de *Pseudomonas* e *Acinetobacter* sppFIGURA 12 — *Pseud.* outras sppFIGURA 13 — *Acinetobacter* spp

Estes germes representaram apenas 3,2% das cepas processadas em 1986. São agentes oportunistas típicos, que vêm apresentando índices sensivelmente crescentes nas estatísticas das infecções hospitalares e com o agravante de apresentarem poucas opções terapêuticas na faixa de resistência baixa.

COMENTÁRIOS GERAIS

Ressalta-se a necessidade de cada hospital ou, até mesmo, cada serviço hospitalar conhecer sua flora microbiana e a respectiva sensibilidade aos antimicrobianos. Isto porque as informações poderão variar, de acordo com:

- as características próprias de cada serviço (predomínio de pacientes clínicos ou cirúrgicos, pacientes imunodeprimidos, idosos ou de terapia intensiva, entre outros exemplos);
- o uso de procedimentos invasivos, em quantidade e complexidade;
- o estágio da implantação da política de controle do uso de antimicrobianos, permitindo maior ou menor disponibilidade de drogas de gerações mais recentes;
- qualidade e obediência às normas e rotinas estabelecidas, reduzindo ou não as infecções cruzadas e por fontes exógenas.

Os dados da Tab. 2 exemplificam a variação das taxas de resistência de cepas de *Klebsiella*, isoladas em diferentes cidades brasileiras (7). A análise do conjunto dos Laboratórios de Referência do Sistema COBA reflete, portanto, apenas a média (percentual), para exemplificar índices de germes isolados em hospitais frente a antimicrobianos usualmente empregados no combate a infecções por eles causadas.

TABELA 2—Comparação de coeficientes (%) de resistência de cepas de *Klebsiella* isoladas em 7 cidades, frente a 3 drogas, em 1986.

Cidades.....	Gentamicina.....	Amicacina.....	Cefalospororina
São Paulo.....	44.....	23.....	59
Rib. Preto S.P.....	42.....	22.....	53
R. Janeiro.....	43.....	08.....	67
B. Horizonte.....	45.....	32.....	61
Curitiba.....	57.....	37.....	73
Porto Alegre.....	31.....	13.....	Não Testada
Goiânia.....	33.....	07.....	63

A utilização dos dados COBA fica restrita a serviços que não dispõem de dados próprios, com a finalidade de reavaliar esquemas terapêuticos ou orientar indicações terapêuticas para espécies bacterianas e drogas não testadas; a serviços que dispõem de dados próprios e se interessam pelo estudo comparativo, na avaliação de possíveis discrepâncias.

Abreviaturas Empregadas

Vancom = Vancomicina, Norfl = Norfloxacina, Netilm = Netilmicina, Cefalo = Cefalotina, Fosfom = Fosfomicina, Afoxi = Afoxitina, Amicac = Amicacina, Sftrim = Sulfazotrim, Nitrof = Nitrofurantoína, Cefota = Cefotaxima, Tobram = Tobramicina, Ceftri = Ceftriaxone, Gentam = Gentamicina, Cloran = Cloranfenicol, Lincom = Lincomicina, Oxacil = Oxacilina, Sisomi = Sisomicina, Eritro = Eritromicina, Tetrac = Tetraciclina, Canami = Canamicina, Rifamp = Rifampicina, Ampici = Ampicilina, Penici = Penicilina, Apipem = Alido pipemidico, Colist = Colistina, Anal = Ácido Nalidixico, Cefuro = Cefuroxi- na, Carben = Carbenicilina, Sifami = Sulfamidicos.

Certamente, a maior contribuição dos dados do Sistema COBA é oferecer à comunidade médica e científica, subsídios para a melhor avaliação da problemática da resistência bacteriana em nosso meio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Eickhoff, T. C - Antibiotics and nosocomial infections. In: Bennett, J.; Brachman, P. S., eds. Hospital Infections. Boston: Little, Brown and Company, 1986. p. 171-192.
2. Finland, M. - Emergence of antibiotic resistance in hospitals, 1935-1975. *Rev. Infect. Dis.*, 1:4-21, 1979
3. Levy, S. B. - Microbial resistance to antibiotics: an evolving and persistent problem. *Lancet*, 2:83-88, 1982
4. McGowan, J. E. Jr. - Antimicrobial resistance in hospital organisms and its relation to antibiotic use. *Rev. Infect. Dis.*, 5:1033-1048, 1983
5. Montelli, A. C - Evolução da sensibilidade bacteriana aos antimicrobianos no Brasil (1980-1986). *Rev. Bras. Med.*, 45:43-48, 1988
6. Murray, B.E.; — Moellering, R.C. Jr. Patterns and mechanisms of antibiotic resistance. *Med. Clin. North A.*, 62: 899-923, 1978.
7. Pereira, A.A.; Levy, C.E.; Furtado, J.S. — Sistema COBA: resistência bacteriana a drogas em 1984, 1985, 1986. SBM, 1-24, 1987
8. Weinstein, R.A. — Multiply resistant strains: epidemiology and control. In: Bennett, J.; Brachman, P.S., eds. Hospital Infections. Boston: Little, Brown and Company, 1986. p 151-169

Recebido para publicação em 13/8/90

RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM *VIBRIO CHOLERAES* NÃO 01 E *V. PARAHAEAMOLYTICUS*

José Cavalcante de Albuquerque Ribeiro Dias
Djair Hernandez
Ernesto Hofer

RESUMO

Foram estudadas 106 amostras de víbrios, compreendendo 70 culturas de *Vibrio cholerae* não 01 originárias de águas de esgoto de estações de tratamento da cidade do Rio de Janeiro, RJ e 36 de *Vibrio parahaemolyticus*, provenientes de peixes, ostras e água do mar, relacionadas a diferentes pontos do litoral brasileiro, sendo em sua maioria originárias de área urbana e peri-urbana desta capital. O antibiograma, considerando onze fármacos (Su, Sm, Tc, Cm, Km, Ap, Nal, Gm, Nm, Rm e Ce) revelou a ocorrência de resistência antimicrobiana em 94,3% das culturas, distribuindo-se predominantemente em 97,1% para Su e 85,7% para Ap entre as amostras de *V. parahaemolyticus* e nas taxas de 95,3% para Su; 69,2% para Ap e 24,6% para Sm nas amostras de *V. cholerae* não 01. Os experimentos de conjugação com cepas padrão de *Escherichia coli* K12 possibilitaram o isolamento de transconjugantes nas freqüências de 57,1% (*V. parahaemolyticus*) e de 41,5% (*V. cholerae* não 01) resistentes a Su, Sm ou Ap.

Palavras chave: Víbrios; resistência antimicrobiana; águas de esgoto; água de mar e pescados.

INTRODUÇÃO

A resistência a antimicrobianos tem determinado impasses de ordem clínica e epidemiológica com repercussões a nível ambiental, como têm revelado os trabalhos com amostras de *Escherichia coli* isoladas de águas de esgoto (7 e 12), de águas de praias (10) e de pescados (21), que apontam uma disseminação de marcadores de resistência a drogas nessas bactérias.

No que concerne aos representantes da família *Vibrionaceae*, patogênicos ou potencialmente patogênicos, as pesquisas nacionais têm se concentrado no isolamento e caracterização dos

víbrios a partir de diferentes fontes, destacando-se os trabalhos de Hofer & Silva (14); Gelli e Cols (11); Hernandez e Cols (9); Leitão & Arima (20); Barros & Vianni (2); Hofer (15); Hofer & Silva (16); Zbral (33); Rodrigues & Hofer (26); Hofer (17); Sousa (29) e Hofer & Hernandez (18), sendo ainda discreto o número de pesquisas voltadas para a análise da resistência a fármacos (23 e 22).

Assim, com o intuito de se ampliar o conhecimento sobre bactérias Gram-negativas portadoras de fatores de resistência a drogas, em nosso meio, procedeu-se o rastreamento e a caracterização desta resistência em amostras de *Vibrio cholerae*

não 01, isoladas de águas de esgoto e de *Vibrio parahaemolyticus* de origem marinha.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Foram selecionadas 106 amostras de víbrios da coleção do Centro de Referência Nacional de Víbrio, do Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, correspondendo a 70 culturas de *V. cholerae* não 01 originárias de águas de esgoto, colhidas nas estações de tratamento da Ilha do Governador e Penha, na cidade do Rio de Janeiro, nos anos de 1976, 1977 e 1979 e 36 culturas de *V. parahaemolyticus*, sendo 24 isoladas de superfície de peixes marinhos de diferentes pontos do país, compreendendo 9 do Estado do Rio de Janeiro; 4 do Rio Grande do Sul; 3 da Bahia; 3 do Espírito Santo; 3 de São Paulo e 2 de Santa Catarina, no período de 1974 a 1975; 10 provenientes de ostras e 2 de água do mar, ambas da baía de Sepetiba, RJ, em 1981.

Antibiograma

Para as drogas sulfadiazina (Su), estreptomicina (Sm), tetraciclina (Tc), cloranfenicol (Cm), canamicina (Km), ampicilina (Ap), ácido nalidíxico (Nal), gentamicina (Gm) e netilmicina (Nm) fez-se uso do método de diluição em placa conforme técnicas descritas previamente (6). Para os antibióticos rifampicina (Rm) e cefoxitina (Ce), aplicou-se a técnica de Bauer e Cols (3), utilizando-se discos impregnados com os fármacos, provindos do Laboratório Roche. Em ambas as técnicas utilizou-se o meio Agar Mueller-Hinton (Disco) acrescido de 1,0 g% de NaCl. Submeteu-se também aos

testes de sensibilidade a cepa padrão de *Escherichia coli* ATCC 25922, como controle.

Conjugação

Foi realizada segundo procedimentos utilizados por Dias & Hofer (6). Fez-se uso das seguintes concentrações de antimicrobianos em µg/ml: 10 (Sm); 20 (Tc, Ap, Nm e Rm); 150 (Su) e 200 (Nal), em Agar Mueller-Hinton contendo 1,0 g% de NaCl. As culturas receptoras corresponderam às cepas padrão de *E. coli* K12 F⁻ Nal^r (Laboratório de Fisiologia Celular, Instituto de Biofísica, UFRJ) e *E. coli* K12⁻ F⁻ Sm^r (Departamento de Biologia Molecular, Universidade de Edimburgo, Escócia).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Centralizando a análise dos resultados na origem das amostras, tanto as de águas de esgoto como de fontes marinhas (Tabela 1), impressiona a detecção de resistência antimicrobiana em taxas superiores a 90,0% para ambas as espécies de *Vibrio* (Tabela 2), revelando a consequência do

TABELA 1 - Distribuição numérica das espécies de *Vibrio* segundo as fontes de isolamento.

Espécies	Fontes				Total
	Peixes	Ostras	Água do mar	Água de esgoto	
<i>Vibrio cholerae</i> não 01	—	—	—	70	70
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	24	10	2	—	36
Total	24	10	2	70	106

TABELA 2 - Distribuição numérica e percentual das espécies de *Vibrio* resistentes aos diferentes antimicrobianos

Amostragem	Total de culturas	Culturas resistentes	Determinantes de resistência										
			Su	Sm	Tc	Cm	Km	Ap	Nal	Gm	Nm	Rm	Ce
<i>Vibrio cholerae</i> não 01	70	65 (92,8)	62 (95,3)	16 (24,6)	2	0	0	45 (69,2)	2	0	1	10	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	36	35 (97,2)	34 (97,1)	0	0	0	0	30 (85,7)	3	0	0	0	0
Total	106	100 (94,3)	96 (96,0)	16 (16,0)	2	0	0	75 (75,0)	5	0	1	10	0

uso intensificado de fármacos aliado à seleção e dispersão de bactérias portadoras de plasmídios R (13 e 19), em diferentes nichos ecológicos.

Dentre os onze antimicrobianos analisados (Tabela 2) registra-se a maior sensibilidade das amostras de *Vibrio parahaemolyticus* a oito drogas (Sm, Tc, Cm, Km, Gm, Nm, Rm e Ce) e de *Vibrio cholerae* não 01 a quatro antibióticos (Cm, Km, Gm e Ce), caracterizando certa heterogeneidade de comportamento dos víbrios aos fármacos empregados. Por outro lado, independente do número de amostras de cada espécie, é interessante a similaridade de prevalência de resistência relacionada, quase que exclusivamente à Su e Ap, onde se destacam os percentuais de 97,1 e 85,7 (para *Vibrio parahaemolyticus*) e de 95,3 e 69,2 (para *Vibrio cholerae* não 01). Neste sentido, nossos dados se coadunam, parcialmente, com aqueles relatados por Morris e Cols (24) que consignaram o encontro de resistência unicamente para três drogas, entre elas sulfonamida e ampicilina, em amostras de *Vibrio cholerae* não 01 de fonte humana. Ainda com relação às amostras de *Vibrio cholerae* não 01 resistentes a Ap (69,2%) e Sm (24,6%), se observa na Tabela 2 identidade no tocante à detecção de marcadores, embora com percentuais inferiores, nos relatos de Sundaram & Murthy (31) que observaram para esta espécie, isolada de área endêmica de cólera, taxas de 13,4% (Ap) e 2,7% (Sm).

Mais recentemente, Martins (23) assinalou para estes marcadores percentuais de resistência de 63,2% para Ap e 36,8% para Sm em *Vibrio cholerae* não 01 provindos de águas cloacais. No que diz respeito às amostras de *Vibrio parahaemolyticus*, Rusu e Cols (27) também caracterizaram a resistência à ampicilina em culturas isoladas de fontes marinhas na taxa de 95,0%. Resistência à Su, Ap e Sm foi relatada por Dias e Cols (8) em víbrios oriundos de pescados capturados na Baía de Guanabara, RJ, consignando uma taxa global de resistência de 96,2%. Para o marcador Ap, Olssson-Liljequist & Möllby (25) detectaram resistência em amostras de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio cholerae* não 01 de proveniência clínica. Alude-se ainda às observações de Martins (23) para o encontro de resistência à Ap e Sm em *Vibrio parahaemolyticus* de águas do mar e o registro de apenas uma cultura resistente à Ap dentre 17 amostras originárias de ostras (22).

Adicionalmente, na Tabela 2, se detecta a resistência aos determinantes Tc, Nm e Rm relacionada ao *Vibrio cholerae* não 01, e ao Nal, entre as culturas de ambas as espécies, revelando uma ampla dispersão de marcadores de resistência antimicrobiana.

Aliás, Martins (23) observou sensibilidade absoluta unicamente para um antibiótico, a tetraciclina, dentre as dez drogas utilizadas em amostras de *Vibrio cholerae* não 01 de águas de esgoto.

Ampliando-se a análise destes dados procurou-se confrontá-los com aqueles de investigações realizadas em outros modelos bacterianos, sejam de áreas urbanas ou peri-urbanas da cidade do Rio de Janeiro. Assim, em amostras de *Escherichia coli* oriundas de afluentes de duas estações de tratamento de esgoto, fontes de origem das amostras de *Vibrio cholerae* não 01 deste estudo, os marcadores Su e Ap foram reconhecidos como os mais freqüentes (6). Para *Salmonella agona* também isoladas de afluentes de outras estações, Solari e Cols (28) registraram resistência à Ap na taxa de 21,42%. Ainda em outros sorotipos de *Salmonella*, Campos (5) obteve resistência a Su em 100% das culturas advindas de esgoto. Prevalência de resistência à Ap foi detectada por Farage (10) em culturas de *E. coli* provenientes de águas de praias poluídas, sendo recentemente apontado por Lima e Silva (21) a resistência à Ap (16,9%) em amostras advindas de pescados marinhos capturados em águas de baía e da orla litorânea.

Considerando a ecologia dos plasmídios R entre as bactérias Gram negativas (1 e 30), as evidências de prevalência dos marcadores Su e Ap em bactérias na região, constitui uma indicação de que a incidência destes marcadores em amostras de víbrios possa ser devido à estabilidade plasmidial nestas amostras entéricas e sua consequente disseminação a outras, como os víbrios. Assim, os resultados expostos na Tabela 3 consolidam este raciocínio, pois o perfil birresistente Su-Ap se destacou nas duas espécies, como a obtenção de transconjugantes Su^r (95,7%) e Ap^r (19,1%) reforça a natureza plasmidial destes marcadores. Chama-se também a atenção para a detecção de co-transferência de resistência à Sm em três culturas de *Vibrio cholerae* não 01 com o modelo Su-Sm-Ap, seja relacionada ao marco Su ou Ap (Tabela 3).

Questionando-se a origem desses marcadores nas amostras de víbrios são pertinentes as hipóteses de Rusu e Cols (27) que atribuíram a possibilidade de encontro de plasmídios R em *Vibrio parahaemolyticus* de fonte marinha (em áreas litorâneas) em função da microflora carreada ao mar através do lançamento de águas residuais, além de não descartar a pré-existência de plasmídios R nas bactérias halofílicas.

Reconhecendo-se os afluentes de estações de tratamento de esgotos como nicho natural da espécie

TABELA 3 - Níveis de transferência, de marcos de resistência antimicrobiana, obtidos através de conjugação na amostragem de *Vibrio*

Culturas	Perfis de resistência	Nº %	Transferência de marcos	Transconjugantes		
				Su ^r	Sm ^r	Ap ^r
<i>Vibrio cholerae</i> não 01	Su	10	Negativa			
	Ap	1	Negativa			
	Rm	1	Negativa			
	Su-Sm	3	Negativa			
	Sm-Ap	1	Negativa			
	Su-Ap	28 (43,0)	Su ^r Ap ^r (3); Su ^r Ap ^r (19)	22	-	3
	Su-Rm	5	Negativa			
	Su-Sm-Ap	9	Su ^r Sm ^r Ap ^r (2); Su ^r Sm ^r Ap ^r (1)	3	3	2
	Su-Tc-Ap	1	Negativa			
	Su-Ap-Nal	1	Negativa			
	Su-Ap-Rm	1	Negativa			
	Su-Nal-Nm	1	Su ^r Nal ^r Nm ^r (1)	1	-	-
	Su-Sm-Ap-Rm	1	Negativa			
	Su-Tc-Ap-Rm	1	Su ^r Tc ^r Ap ^r Rm ^r (1)	1	-	0
	Su-Sm-Tc-Ap-Rm	1	Negativa			
Total		65	27 (41,5)	27	3	5
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Su	1	Negativa			
	Ap	1	Negativa			
	Su-Ap	26 (74,2)	Su ^r Ap ^r (3); Su ^r Ap ^r (12); Su ^r Ap ^r (1)	15	-	3
	Su-Nal	4	Su ^r Nal ^r (2)	2	-	-
	Su-Ap-Nal	3	Su ^r Ap ^r Nal ^r (1); Su ^r Ap ^r Nal ^r (1)	1	-	1
Total		35	20 (57,1)	18		4
Total	Geral	100	47 (47,0)	45	3	9
				(95,7)	(6,38)	(19,1)

cie *Vibrio cholerae* não 01 (18), obviamente isto favorece a prevalência de cepas resistentes a antimicrobianos ou de expressão de multirresistência (4, 12 e 7), resultante talvez de uma transferência *in situ* para as amostras de víbrios, a partir de enterobactérias resistentes, oriundas de fezes humanas e de animais que afluem às estações.

Por outro lado, fundamentando-se nas observações de Timoney e Cols (32) que detectaram a emergência de cepas bacterianas resistentes a fármacos em área poluída por fons metálicos, admite-se a hipótese de que bactérias albergando, concomitantemente, plasmídios com genes para resistência a antimicrobianos e a metais pesados, estariam sendo selecionadas em função de eventuais descargas de resíduos contendo fons metálicos. Por sinal, os achados de Dias e Cols (8) registraram a ocorrência de relação entre a resistência ao mercúrio e a multirresistência antimicrobiana em 55,5% das amostras de víbrios isoladas de pescados de origem marinha. Deste modo, torna-se oportuna a proposição de estudos que visem o co-

nhecimento sobre a prevalência de plasmídios R em amostras de víbrios, a partir de investigações que envolvam a relação entre marcadores genéticos de resistência antimicrobiana e a metais pesados.

SUMMARY

Antibiotic resistance in non-01 *Vibrio cholerae* and *V. parahaemolyticus*.

To obtain additional information about Gram-negative bacteria bearing drug resistance factors, strains of non-01 *Vibrio cholerae* isolated from sewage and of *Vibrio parahaemolyticus* of marine origin were screened and characterized for resistance to antimicrobial agents. A total of 106 cultures were studied, including 70 cultures of non-01 *Vibrio cholerae* from sewage water (affluent) and 36 cultures of *Vibrio parahaemolyticus* from fish, oysters and seawater, maintained in the collection

of the National *Vibrio* Reference Center of the Departamento de Bacteriologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.

Eleven drugs were used for the antibiogram. Sulfadiazine (Su), streptomycin (Sm), tetracycline (Tc), chloramphenicol (Cm), kanamycin (Km), ampicillin (Ap), nalidixic acid (Nal), gentamicin (Gm) and netilmicin (Nm) were used in the plate dilution technique, and the sensitivity to the antibiotics rifampicin (Rm) and cefoxitin (Ce) was analyzed by the disk diffusion method. Mueller-Hinton agar (Difco) with 1.0 g% NaCl added was used in both techniques. The standard strain of *Escherichia coli* ATCC 25922 was used as control for the tests.

In conjugation experiments, transconjugant colonies were isolated on plates containing Mueller-Hinton agar plus 1.0 g% NaCl and the following concentrations of antimicrobial agents: 10 µg/ml Sm, 20 µg/ml Tc, Ap, Nm and Rm, 150 µg/ml Su and 200 µg/ml Nal. The receptor strains corresponded to the *E. coli* strains K 12 F^r Nal^r (Laboratório de Fisiologia Celular, Instituto de Biofísica, UFRJ) and *E. coli* K 12 F^r Sm^r (Department of Molecular Biology, University of Edinburg, Scotland).

Rates of antimicrobial resistance higher than 90% were detected in both *Vibrio* species studied, a result representing one more example of the impasse due to the indiscriminate use of drugs over the last decades and of the bacterial ability to transfer genetic markers which, because of the occurrence of bacteria in different ecological niches, has promoted a wide selection and distribution of R plasmids among bacteria.

Regardless of the number of *Vibrio* strains, resistance was prevalent in the Su and Ap markers, with percentages of 97.1 and 85.7 for *V. parahaemolyticus* and of 95.3 and 69.2 for non-01 *V. cholerae*. Resistance to Sm, Tc, Nal, Nm and Rm was also detected in strains of non-01 *V. cholerae*, but not in *V. parahaemolyticus*, which was only resistant to Nal.

The Su-Ap double-resistant profile was predominant, with a 74.2% rate for *V. parahaemolyticus* and of 43.0% for non-01 *V. cholerae*. Transconjugants for the Su and Ap markers were obtained in the *V. parahaemolyticus* strains and also for Sm in non-01 *V. cholerae*.

The predominance of Su and Ap markers and the transfer rates of 95.7% for Su and 19.1% for Ap suggest an intense circulation of these markers in the sampling possibly originating from enterobacteria. Studies with other bacterial models in the

state of Rio de Janeiro have also pointed out the prevalence or detection of these markers in *E. coli* strains isolated from sewage water, in *Salmonella agona* and in other *Salmonella* serotypes also from sewage water, and in *E. coli* from waters of polluted beaches in Rio de Janeiro and from the intestinal tract of fish of marine origin.

Keywords: *Vibrio*; antimicrobial resistance; sewage water; seawater; fish and oysters.

AGRADECIMENTOS

À Dra. DÁLIA DOS PRASERES RODRIGUES pela gentileza na cessão das amostras de *Vibrio parahaemolyticus*, isoladas em 1981.

À Dra. ANA CAROLINA PAULO VICENTE, pela colaboração técnica.

Aos Srs. Técnicos EVALDO SOARES DA SILVA e DEISE PARANHOS, pela dedicação no preparo de material e meios de cultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, E. S. The Ecology of Transferable Drug Resistance in the Enterobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, 22: 131-180, 1968.
- Barros, G. C. & Vianni, M. C. E. *Vibrio parahaemolyticus*: isolamento e identificação em águas da Baía de Guanabara. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.*, 22: 163-169, 1980.
- Bauer, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J. C. & Turck, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 45: 493-496, 1966.
- Câmara, F. P.; Costa, G. A.; Hofer, E. & Almeida, D. F. Drug Resistance in *Salmonella* Strains Isolated from Raw Sewage in Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Biol.*, 42: 421-424, 1982.
- Campos, L. C. Resistência a Antimicrobianos e Colicinogênio em *Salmonella*. Rio de Janeiro, RJ, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, 1987 (Tese de Mestrado).
- Dias, J. C. A. R. & Hofer, E. Bactérias Gram Negativas Resistentes a Antimicrobianos em Alimentos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 82: 411-421, 1985.
- Dias, J. C. A. R.; Vicente, A. C. P. & Hofer, E. Coliformes Fecais em Águas de Esgoto. I. Resistência a Antibióticos, Metais Pesados e Colicinogênio. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 82: 335-343, 1987.
- Dias, J. C. A. R.; Ermandez, D.; Lima e Silva, A. A.; Oliveira, L. M. R. R. & Silva, S. E. A. Resistência a antimicrobianos e ao cloreto de mercúrio em amostras de *Vibrio* de origem marinha. In: II Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental, Águas de Lindóia, SP, p. 32, 1988.
- Ermandez, D.; Percira, L. A.; Bezerra Filho, B. C. & Hofer, E. Classificação Bioquímica segundo Heiberg de Amostras de *Vibrio* Isoladas de Esgoto. In: VI Congresso Brasileiro de Microbiologia, Salvador, BA, p. 91, 1975.
- Farage, S. Resistência a antimicrobianos em coliformes

- isolados de praias poluídas. Rio de Janeiro, RJ, Instituto de Microbiologia, UFRJ, 1987 (Tese de Doutorado).
11. Gelli, D. S.; Tachibana, T. & Silva, T.M.P. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em ostra e outros produtos marinhos no litoral de São Paulo, Brasil. Revisão e Considerações sobre o risco potencial para a Saúde Pública. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 35/36: 9-16, 1975.
 12. Grabow, W. O. K.; Van Zyl, M. & Prozesky, O. W. Behaviour in Conventional Sewage Purification Processes of Coliform Bacteria with Transferable or Non-Transferable Drug-Resistance. *Water Res.*, 10: 717-723, 1976.
 13. Guiney, D. G., Jr. Promiscuous Transfer of Drug Resistance in Gram-Negative Bacteria. *J. Infect. Dis.*, 149: 320-329, 1984.
 14. Hofer, E. & Silva, C. H. D. Isolamento e Identificação de *Vibrio parahaemolyticus* de material de peixes de origem marinha. In: V Congresso Brasileiro de Microbiologia, Rio de Janeiro, RJ, p. 193, 1974.
 15. Hofer, E. Primeiro Isolamento e Identificação de *Vibrio parahaemolyticus* no Brasil de Infecção Gastro-intestinal Humana. *Rev. Microbiol.*, 14: 174-175, 1983.
 16. Hofer, E. & Silva, C. H. D. An Evaluation of the Efficiency of Enrichment Media in the Isolation Process of *Vibrio parahaemolyticus*. *Zbl. Bakter. Hyg. A*, 256: 456-465, 1984.
 17. Hofer, E. *Vibrio cholerae* não 01 associado à Infecção Entérica Humana no Estado da Bahia, Brasil. *Rev. Microbiol.*, 18: 1-4, 1987.
 18. Hofer, E. & Ernandez, D. Incidência de *Vibrio cholerae* não 01 em afluentes de estações de tratamento de esgotos da cidade do Rio de Janeiro, RJ. *Rev. Microbiol.*, 21: 31-40, 1990.
 19. Kunin, C. M.; Johansen, K. S.; Worming, A. M. & Daschner, F. D. Report of a Symposium on Use and Abuse of Antibiotics Worldwide. *Rev. Infect. Dis.*, 12: 12-19, 1990.
 20. Leitão, M. F. F. & Arima, H. K. *Vibrio parahaemolyticus* no ambiente marinho do Estado de São Paulo. *Col. Inst. Tecol. alim.*, 6: 149-167, 1975.
 21. Lima e Silva, A. A. Resistência a Antimicrobianos, a Metais Pesados e Colicinogênio em Coliformes Fecais Isolados de Peixes Marinhos. Rio de Janeiro, RJ, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, 1990 (Tese de Mestrado).
 22. Magalhães, V. *Vibrio parahaemolyticus*, causa insuspeita de gastroenterite do adulto, no Recife, PE, UFPB, 1990 (Tese de Mestrado).
 23. Martins, M. T. Ecologia de *Vibrio cholerae* no Ecossistema Aquático. São Paulo, SP, Instituto de Ciências Biomédicas, USP, 1988 (Tese de Livre-Docência).
 24. Morris, J. G. Jr.; Wilson, R.; Davis, B. R.; Wachsmuth, I. K.; Riddle, C. R.; Wathen, H. G.; Pollard, R. A. & Blake, P. A. Non-O Group 1 *Vibrio cholerae* Gastroenteritis in the United States. *Ann. Intern. Med.*, 94: 656-658, 1981.
 25. Olsson-Liljequist, B. & Möllby, R. In vitro activity of norfloxacin and other antibacterial agents against gastrointestinal pathogens isolated in Sweden. *APMIS*, 98: 150-155, 1990.
 26. Rodrigues, D. P. & Hoffer, E. Vibrio Species from the Water-Oyster Ecosystem of Sepetiba Bay in Rio de Janeiro State, Brazil. *Rev. Microbiol.*, 17:332-338, 1986.
 27. Rusu, V.; Dorobat, O. & Lazaroiu, D. Transmissible Antibiotic Resistance in Halophilic Vibrios. *Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol.*, 42: 141-145, 1983.
 28. Solar, C. A.; Reis, E. M. F.; Dias, J. C. A. R. & Hofer, E. Resistência Antimicrobiana de *Salmonella agona* oriundas de várias regiões do Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 81: 7-14, 1986.
 29. Souza, C. P. Incidência de *Vibrio parahaemolyticus* em Águas Marinhas Costeiras, Carne de Caranguejo (*Callinectes* sp.) e Ostras (*Crassostrea* sp.) em João Pessoa, PB, UFPB, 1989 (Tese de Mestrado).
 30. Stotzky, G. & Babich, H. Survival of, and Genetic Transfer by, Genetically Engineered Bacteria in Natural Environments. *Adv. Appl. Microbiol.*, 31: 93-138, 1986.
 31. Sundaram, S. P. & Murthy, K. V. Transferable plasmid-mediated drug resistance among non-01 *Vibrio cholerae* and rough strains of *Vibrio cholerae* from Tamilnadu, India. *J. Hyg., Camb.*, 92: 59-65, 1984.
 32. Timoney, J. F.; Port, J.; Giles, J. & Spanier, J. Heavy Metal and Antibiotic Resistance in the Bacterial Flora of Sediments of New York Bight. *Appl. Environm. Microbiol.*, 36: 465-472, 1978.
 33. Zebral, A. N. Isolamento e Caracterização de *Vibrio* Lactose-Positivo, de Mexilhões da Baía de Guanabara, Estado do Rio de Janeiro. *Rev. Microbiol.*, 16: 46-48, 1985.

Recebido para publicação em 05/10/90

RELAÇÃO ENTRE A RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E ANTISSÉPTICOS EM *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Fátima Moreira Martins¹
Marlei Gomes da Silva¹
Paulo Pinto Gontijo Filho¹

RESUMO

A relação entre a resistência a antimicrobianos e antissépticos foi avaliada em 190 amostras de *P. aeruginosa* provenientes do ambiente hospitalar (156) e não hospitalar (34). A atividade dos antimicrobianos e antissépticos foi testada pelo método de difusão e o de diluição em ágar, respectivamente. Observou-se que as amostras de origem hospitalar foram mais resistentes aos antimicrobianos (gentamicina - 34,8%, carbenicilina - 30,5%, amicacina - 18,2%), que aquelas de origem extra-hospitalar (carbenicilina - 2,9%, amicacina - 3%). A resistência a mais de dois grupos de antibióticos foi elevada (23%). As amostras hospitalares, independente da susceptibilidade ou multirresistência aos antimicrobianos mostraram um comportamento semelhante frente aos antissépticos, com exceção do timerosal, para o qual foi detectada uma relação significativa com a resistência aos antibióticos.

Palavras chave: *Pseudomonas aeruginosa*, antimicrobianos, antissépticos, resistência.

INTRODUÇÃO

A resistência intrínseca de *Pseudomonas aeruginosa* à maioria dos antibióticos, quimioterápicos, antissépticos e desinfetantes deve-se particularmente às características de sua parede celular (LPS e porinas), que difere de modo significante da encontrada em *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* (14). Além disso, este microrganismo é capaz de adquirir resistência aos antimicrobianos principalmente pela produção de enzimas que afetam de forma específica a estrutura destes agentes e por uma diminuição na permeabilidade da membrana externa; estes mecanismos são codificados por genes cromossomiais e plasmideais (6).

Ao contrário, pouco é conhecido sobre a resistência adquirida aos antissépticos e desinfetantes. A presença de marcadores de resistência

para antibióticos e germicidas em plasmídeos foi descrita em *Staphylococcus aureus* (3, 16), originando a preocupação que o emprego destes últimos (antissépticos e desinfetantes) poderia resultar na seleção de uma flora resistente aos antimicrobianos. Em *P. aeruginosa*, a resistência ao hexaclorofeno e aos compostos mercuriais orgânicos pode ser mediada por plasmídeos e geralmente os genes que a codificam estão relacionados com aqueles que determinam a resistência aos antibióticos (4). Nesta investigação a relação entre a resistência a germicidas e antimicrobianos foi estudada em amostras de *P. aeruginosa* de origem intra e extra-hospitalar utilizando-se apenas antibióticos pseudomonocidas. O termo antimicrobiano foi empregado para designar antibióticos e quimioterápicos.

1. Instituto de Microbiologia da UFRJ, Centro de Ciências da Saúde - Bloco I, Ilha Universitária - C.P. 68040, CEP: 21491 - Rio de Janeiro - RJ.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras — Foram estudadas 190 amostras de *P. aeruginosa*, sendo 156 provenientes do ambiente hospitalar e as restantes do extra-hospitalar. Das amostras do primeiro grupo, 149 foram isoladas de pacientes infectados e internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e 7, de pias de UTI. As amostras de origem extra-hospitalar foram recuperadas de verduras (14 amostras) e de água (20 amostras).

Antibiograma — O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizado pelo método de difusão em ágar descrito por Bauer e colaboradores (2). Foram testados os seguintes antimicrobianos: amicacina, azlocilina, carbenicilina, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, mezlocilina, polimixina B e tobramicina. Os discos foram procedentes da CECON (Centro de Controle e Produtos para Diagnóstico Ltda, São Paulo - SP), exceto os de ceftazidima, ceftriaxona, imipenem, azlocilina, ciprofloxacina e mezlocilina que foram fornecidos respectivamente pela Glaxo do Brasil S.A., Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A.; Merck, Sharp & Dohme Indústria Química e Farmacêutica Ltda e os três últimos pela Bayer do Brasil S.A. e foram preparados pela Oxoid. O controle de qualidade dos testes foi realizado utilizando-se as seguintes amostras-padrão: *P. aeruginosa* ATCC-27853, *E. coli* ATCC-25922 e *S. aureus* ATCC-25923 (1).

Determinação da concentração inibitória mínima dos antissépticos — Foi utilizado o método de diluição em ágar segundo Barry e colaboradores

(1). Foram testados o cloreto de cetilpiridínio e o cloreto de benzalcônio procedentes da Sigma Chemical Co., o timerosal fornecido pela Eli Lilly do Brasil Ltda e o polivinil-pirrolidona-iodo (PVPI) e o digluconato de clorohecidina fornecidos pela Ceras Johnson S.A. Com exceção deste último onde foi utilizada uma solução aquosa a 20%, os demais antissépticos foram testados a partir do sal puro. A avaliação foi realizada no meio de ágar tripticase soja (BBL); para o PVPI foi utilizado o meio de Dubos não suplementado (Difco) como recomendado por Prince e colaboradores (11).

Inóculo — Para a avaliação dos antissépticos, cinco a dez colônias isoladas em ágar tripticase soja foram repicadas em 5ml de caldo BHI e incubadas por 18 horas à 37°C. As suspensões resultantes foram diluídas de forma que cada pino do replicador tipo "Steers", empregado para inocular as placas, contivesse 10^4 unidades formadoras de colônias.

Análise estatística — A relação entre a susceptibilidade aos antissépticos e a polirresistência aos antimicrobianos foi analisada utilizando-se o teste de qui-quadrado e o teste exato de Fisher.

RESULTADOS

O comportamento das amostras de *P. aeruginosa* provenientes de ambiente intra e extra-hospitalar frente aos antimicrobianos é mostrado na Tabela 1. As taxas de resistência das amostras isoladas de pacientes e pias de UTI, foram nitidamente superiores àquelas observadas para as de origem ex-

TABELA 1 — Percentagem de resistência das amostras de *P. aeruginosa* isoladas de ambientes intra e extra-hospitalar frente a 12 antimicrobianos

Antimicrobianos	Amostras Hospitalares			Amostras Extras-Hospitalares		
	Pacientes	Pias	Total	Alimentos	Água	Total
Gentamicina	34,5 (51/148)*	42,8 (3/7)	34,8	0 (0/14)	0 (0/20)	0
Tobramicina	23,5 (35/149)	42,8 (3/7)	24,4	0 (0/14)	10,5 (2/19)	6,0
Amicacina	18,2 (27/148)	28,6 (2/7)	18,7	0 (0/14)	5,3 (1/19)	3,0
Carbenicilina	29,9 (44/147)	42,8 (3/7)	30,5	7,1 (1/14)	0 (0/20)	2,9
Azlocilina	9,5 (14/147)	42,8 (3/7)	11,0	0 (0/14)	5,0 (1/20)	2,9
Mezlocilina	27,7 (41/148)	28,6 (2/7)	27,7	7,1 (1/14)	15,0 (3/20)	11,9
Cefotaxima	13,6 (20/147)	0 (0/7)	13,0	7,1 (1/14)	0 (0/20)	2,9
Ceftriaxona	19,2 (20/104)	0 (0/7)	18,0	0 (0/6)	5,5 (1/18)	4,2
Ceftazidima	7,4 (11/148)	0 (0/6)	7,1	0 (0/14)	5,0 (1/20)	2,9
Imipenem	0 (0/60)	0 (0/4)	0	0 (0/12)	0 (0/11)	0
Polimixina B	0 (0/149)	0 (0/7)	0	0 (0/14)	0 (0/20)	0
Ciprofloxacina	0 (0/149)	0 (0/7)	0	0 (0/14)	0 (0/19)	0

* Percentagem (nº de amostras resistentes/nº de amostras testadas)

tra-hospitalar. Nas amostras isoladas de pacientes, excetuando-se a mezlocilina, a resistência restringiu-se basicamente às drogas utilizadas no país para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa*. As taxas de resistência para estes antimicrobianos foram de 34,5% para gentamicina, 29,9% para carbenicilina, 23,5% para tobramicina, 19,2% para ceftriaxona, 18,2% para amicacina e 13,6% para cefotaxima. Apesar do reduzido número de amostras, os isolamentos de pias mostraram-se mais resistentes que os de pacientes em relação a carbenicilina, azlocilina e aos aminoglicosídeos.

As amostras de origem extra-hospitalar foram suscetíveis a maioria das drogas e a resistência quando presente foi inferior a 10%, com exceção daquela observada para mezlocilina (15%).

O imipenem e a ceftazidima, recentemente introduzidos no Brasil, foram os beta-lactâmicos mais ativos contra as amostras estudadas, juntamente com a ciprofloxacina e a polimixina B.

A resistência a dois ou mais grupos de antibióticos foi de cerca de 23% (35/149) (Tabela 2).

A susceptibilidade das amostras de *P. aeruginosa* de origem intra e extra-hospitalar aos antissépticos é mostrada na Tabela 3. Considerou-se como suscetível e resistente respectivamente, as amostras que tiveram as CIMS (mg/l) \leq 2.048 e \geq 4.096 (cloreto de cetilpiridínio), \leq 1.024 e \geq 2.048 (cloreto de benzalcônio), \leq 4 e \geq 8 (timerosal), \leq 256 e \geq 512 (digluconato de clorohexidina) e \leq 128 e \geq 256 (PVPI). Não foram encontradas diferenças entre as amostras hospitalares e não hospitalares no tocante à susceptibilidade aos antissépticos, ao contrário do verificado com os antimicrobianos. O número de amostras resistentes a este último grupo (não hospitalares) foi insuficiente para permitir um比较. Quando se comparou a relação entre a resistência aos antissépticos e a antimicrobianos (Tabela 3), verificou-se que esta foi significativa ($p < 0,01$) apenas em relação ao timerosal nas amostras de origem hospitalar.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos mostraram que 30% das amostras isoladas de pacientes foram resistentes à carbenicilina, compatível com os dados obtidos pelo sistema COBA (17). A resistência a esta penicilina em algumas publicações tem sido ainda mais alta (10, 12, 17). Entretanto, é preciso chamar a atenção para a qualidade dos discos de antibióticos utilizados no Brasil bem como para a instabilidade dos beta-lactâmicos quando mantidos em condições de temperatura inadequadas. Em relação aos outros representantes das penicilinas pseudomonocidas testadas, a azlocilina inibiu cerca de 91% das amostras, confirmando sua superioridade sobre a mezlocilina (6). Entre os novos beta-lactâmicos a ceftazidima e o imipenem confirmaram sua boa atividade contra *P. aeruginosa*.

A resistência observada para a gentamicina foi alta (34,5%) quando comparada com a observada em hospitais ingleses (5,5%) e americanos (14,0%) de assistência terciária (9), mas compatível com a descrita por autores nacionais, que encontraram taxas entre 27 e 56% (12, 17). Confirmou-se a resistência cruzada entre este aminoglicosídeo e tobramicina (20,8%). Refletindo o seu emprego em escala crescente, a amicacina foi ativa contra 82% das amostras; apesar da taxa de resistência ser duas vezes inferior à observada para gentamicina, ela foi cerca de três vezes superior à encontrada na casuística do "Centers for Disease Control" (7).

Embora em relação aos antibióticos os conceitos de resistência intrínseca (natural) e adquirida estejam bem estabelecidos, para os antissépticos e desinfetantes o termo resistente tem sido empregado para indicar uma amostra que não é afetada pela concentração de uso destes agentes em produtos comerciais (14) ou quando ela exige concentrações superiores às demais para ser inibida (5,8), como foi adotado nesta investigação.

A associação entre resistência a antissépticos e antibióticos, com possíveis implicações epidemiológicas em função do uso mais frequente do pri-

TABELA 2 —Polirresistência das amostras de *P. aeruginosa* isoladas de ambiente hospitalar (pacientes)

Grupos Antimicrobianos	Percentagens de Amostras Polirresistentes
Aminoglicosídeo + Penicilina	12 (18/149)
Penicilina + Cefalosporina	1,4 (2/147)
Aminoglicosídeo + Cefalosporina	0
Aminoglicosídeo + Penicilina + Cefalosporina	10 (15/149)
Total	23,4 (35/149)

* Percentagem (nº de amostras polirresistentes/nº de amostras testadas)

TABELA 3 —Relação entre a susceptibilidade aos antissépticos e aos antimicrobianos em amostras de *P. aeruginosa* provenientes do ambiente intra e extra-hospitalar.

Anti ssépticos	Resistência aos antimicrobianos (Nº de grupos)	Amostras Hospitalares		Total	Amostras Extras-Hospitalares		Total
		Sensíveis	Resistentes		Sensíveis	Resistentes	
Cloreto de Cetilpiridínio	0	46 (75,4) ¹	15 (24,6)	61 (57,5)	21 (75,0)	7 (25,0)	28 (93,3)
	≥ 2	30 (66,7)	15 (33,3)	45 (42,4)	2 (100,0)	0 (0)	2 (6,7)
Cloreto de Benzalcônio	0	32 (100,0)	0 (0)	32 (62,7)	28 (100,0)	0 (0)	28 (93,3)
	≥ 2	18 (94,7)	1 (5,3)	19 (37,3)	2 (100,0)	0 (0)	2 (6,7)
Timerosal	0	14 (23,0)	47 (77,0)	61 (58,1)	5 (17,9)	23 (82,1)	28 (93,3)
	≥ 2	22 (50,0)	22 (50,0)*	44 (41,9)	0 (0)	2 (100,0)	2 (6,7)
Digluconato de Clorohexidina	0	20 (66,7)	10 (33,3)	30 (56,6)	19 (67,9)	9 (32,1)	28 (93,3)
	≥ 2	18 (78,3)	5 (21,7)	23 (43,4)	2 (100,0)	0 (0)	2 (6,7)
PVPI	0	12 (34,3)	23 (65,7)	35 (60,3)	1 (3,6)	27 (96,4)	28 (93,3)
	≥ 2	9 (39,1)	14 (60,9)	23 (39,7)	1 (50,0)	1 (50,0)	2 (6,7)

1 — nº de amostras (percentagem)

*—p<0,01

meiro grupo de agentes, foi evidenciada em *S. aureus* (5, 15, 16), e em bacilos gram-negativos com o grupo dos detergentes catiônicos (14). Observações semelhantes também foram notadas em relação aos metais pesados como o mercúrio e a prata (4). Stickler & Thomas (14) verificaram que amostras de *P. aeruginosa* resistentes a mais de cinco antibióticos não eram suscetíveis ao digluconato de clorohexidina, cetrímide e cloreto de benzalcônio. Tal relação foi observada por Nakahara & Kozukue, que também relatam que a maioria (>80%) das amostras multirresistentes de *P. aeruginosa* eram resistentes a clorohexidina (CIM 50mg/l). Nestes dois últimos estudos não houve preocupação em selecionar antibióticos pseudomonocidas, sendo testados na maioria agentes sem indicação terapêutica nas infecções por este microrganismo. Stickler & Thomas (14) verificaram que as amostras resistentes (CIM > 800µg/ml) a clorohexidina vieram predominantemente de pacientes hospitalizados, o que não foi observado neste estudo considerando que amostras de origem extra-hospitalar não foram provenientes de casos clínicos. Rutala (13) observou que patógenos hospitalares resistentes ou não aos antibióticos, entre os quais *P. aeruginosa*, não se mostraram diferentes frente aos germicidas. Nesta investigação entretanto, foi observado uma relação significativa ($p < 0,01$) entre a polirresistência em amostras hospitalares e o timerosal. Este antisséptico apesar de não recomendado continua a ser um dos mais utilizados nos hospitais brasileiros.

Os dados obtidos são sugestivos de que as resistências aos antimicrobianos e germicidas não estão relacionadas em *P. aeruginosa*, excetuando-se o observado com o mercurial orgânico. Os mecanismos de resistência para estes dois grupos são diferentes, sendo que a resistência mediada por plasmídeos não pode ser comparada com a intrínseca, que é a que predomina frente aos germicidas.

SUMMARY

Relationship between antimicrobial and antiseptic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains.

The relationship between antimicrobial (antibiotics and chemotherapeutics) and antiseptic agents in one hundred and ninety strains of *P. aeruginosa* was evaluated. They were isolated from sinks (07) and hospitalized patients (149) in intensive care units and from water (20) and vegetables (14) came from outside hospital.

The activity of gentamicin, amikacin, tobramycin, carbenicillin, azlocillin, mezlocillin, cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime, ciprofloxacin, imipenem and polymyxina B was performed by disk diffusion testing. The minimum inhibitory concentration of chlorhexidine gluconate, povidone-iodine, thimerosal, cetyl pyridinium chloride and benzalkonium chloride was determined by agar dilution method.

The hospital isolates yielded the greatest resistance rates when compared with the non-hospital ones. The data obtained for the antimicrobial tested are presented as follow for hospital and non-hospital isolates, respectively: gentamicin - 34,8 and 0%, carbenicillin - 30,5 and 2,9%, amikacin - 18,2 and 3,0%, tobramycin - 24,4 and 6,0%, mezlocillin - 27,7 and 11,9%, ceftriaxone - 18,0 and 4,2% and azlocillin - 11,0 and 2,9%. All strains were susceptible to ciprofloxacin, imipenem and polymyxina B. Cross-resistance between gentamicin and tobramycin was observed in 20,8% of the patient isolates. It was observed a high prevalence (23%) of multiresistant strains in patient isolates.

In contrast to data found with antimicrobial, the antiseptic susceptibility between hospital and non-hospital strains was similar. The relationship between the resistance of these two groups of agents was not observed, except for the organic mercurial.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, antimicrobial, antiseptic, resistance.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barry, A.L. Procedures for testing antibiotics in agar media. Theoretical considerations . P. 1-23. In: Lorian, V. (ed.). *Antibiotics in Laboratory Medicine*, Baltimore, Williams & Wilkins Comnpy, 1980.
2. Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M. & Turlk, M. — Antibiotics susceptibility testing by standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, **45**: 493-496, 1986.
3. Brumfitt, W.; Dixson, S. & Hamilton Miller, J.M.T. — Resistance to antiseptics in methicillin and gentamicin resistance *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, **1**: 1442-1443, 1985.
4. Chopra, I. — Microbiol resistance to non-antibiotic antimicrobial agents: plasmids and bacterial resistance. p. 199-206, In: Russel, A.D.; Hugo, W.B. e Ayliffe, G.A.J. (eds.). *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilisation*. Oxford, Blackwell Scientific Publication, 1982.
5. Gillespie, M.T.; May, J.W. & Skurray, R.A. — Plasmidencoded resistance to acriflavine and quaternary ammonium compounds in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Let.*, **34**: 47-51, 1986.
6. Gould, I.M. & Wise, R. — *Pseudomonas aeruginosa*: Clinic manifestations and management. *Lancet*, **ii**: 1224-1226, 1985.
7. Horan, T.C.; White, J.W.; Jawis, W.R.; Emori, T.C.; Culver, D.H.; Munn, V.P.; Thomsberry, C.; Olson, D.R. & Hugles, J.M. — Nosocomial infection surveillance, 1984. *MMW* **35** (Suppl. 1ss): 19ss-29ss. 1986.
8. Nakahara, H.; Kozukue, H. — Isolation of chlorhexidine resistant *Pseudomonas aeruginosa* from clinical lesion. *J. Clin. Microbiol.*, **15**: 166-168, 1982.
9. O'Brien, T.F. & International Survey of Antibiotics Resistance Group. — Resistance to Antibiotics at medical centers in different parts of the world. *J. Antimicrob. Chemother.*, **18** (suppl. C): 243-253, 1986.
10. Ormonde, L.R. — Infecção de ferida operatória: taxa, microorganismos isolados e sensibilidade aos microrganismos. Tese de Mestrado. Instituto de Microbiologia da UFRJ, 1986.
11. Prince, H.N.; Nonemaker, W.S.; Norgard, R.C. & Prince, D.L. — Drug resistance studies with topical antisept. *J. Pharm. Sci.*, **67**: 1629-1631, 1978.
12. Queiroz, M.L.P. & Suassuna, I.R. — Sensibilidade de *Pseudomonas* a agentes antimicrobianos. *F. Med. (Br.)*, **84**: 429-434, 1978.
13. Rutala, W.A. — Disinfection, sterilization and waste disposal, p. 257-282. In: Welzel, R.P. (ed.). *Prevention and control of Nosocomial Infections*. Baltimore, Willians & Wilkins, 1987.
14. Sticker, D.J. & Thomas, B. — Intrinsic resistance to non antibiotic antibacterial agents, p. 186-198, In: Russel, A.D.; Hugo, W.B. & Ayliffe, G.A.J. (eds.). *Principles and Practice Disinfection, Preservation and Sterilization*. Oxford, Blackwell Scientific Publication, 1982.
15. Tennet, J.M.; Lyon, B.R.; Gillespie, M.T.; May, J.W. & Skunay, R.A. — Cloning and expressions of *Staphylococcus aureus* Plasmid-mediated quaternary ammonium resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **27**: 79-83, 1985.
16. Townsend, D.E.; Greed, L.; Ashdow, N. & Grubb, W.B. — Plasmid-mediated resistance to quaternary ammonium compounds in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Med. J. Anest.*, **iii**: 310, 1983.
17. Zanon, U. & Lorian, V. — Significância clínica da resistência bacteriana, p. 251-273, In: Zanon, U. & Neves, J. (eds.) *Infecções Hospitalares: Prevenção, Diagnóstico e Tratamento*, Rio de Janeiro, Editora Médica e Científica, 1987.

Recebido para publicação em 22/12/89.

AGENTES ETIOLÓGICOS DE MICETOMAS OCORRIDOS EM GOIÂNIA - GOIÁS.

Maria do Rosário Rodrigues Silva
Orionalda de Fátima Lisboa Fernandes
Hildene Meneses e Silva

RESUMO

São relatados cinco casos de micetoma, com lesões localizadas nos pés, mãos e nádegas, em Goiânia-Go., no período de abril de 1987 a dezembro de 1988. Os grãos branco-amarelados encontrados em todos os casos foram cultivados, isolando-se *Pseudoallescheria boydii*, *Acremonium sp* e *Nocardia brasiliensis*. Para a identificação dos dois primeiros agentes, após o cultivo em ágar-Sabouraud fez-se microcultivo em ágar-batata. *Nocardia brasiliensis* foi identificada através das provas de decomposição da xantina e tirosina e hidrólise da caseína.

Palavras chave: agentes etiológicos de micetoma.

INTRODUÇÃO

Micetoma é uma infecção de evolução lenta, caracterizada por tumefação, formação de fistulas que drenam secreção purulenta contendo grãos, podendo se localizar em diversas partes do corpo, mas preferencialmente nos pés (7,8,11).

Não se tem idéia exata da ocorrência de micetomas no Brasil, devido provavelmente aos erros de diagnóstico médico, à falta de recursos técnicos-laboratoriais, dificuldade de acesso aos laboratórios capacitados e aos dados estatísticos subestimados num país de grande extensão geográfica como o nosso (2,9). Em uma revisão feita por Lacaz (2) no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, durante o período de 1944 a 1978, baseados apenas no exame histopatológico, foram observados 154 casos de micetoma, sendo 113 de actinomicetoma (produzido por bactérias) e 41 eumicetomas (produzidos por fungos).

Relata-se neste trabalho 5 casos de micetoma, diagnosticados no período de abril de 1987 a dezembro de 1988 em Goiânia-Go.

MATERIAL E MÉTODOS

Cinco pacientes com características clínicas de micetoma foram encaminhados ao Laboratório de Micologia da UFG para serem submetidos a coleta de material para exame micológico.

Os grãos coletados das lesões foram lavados em solução salina examinados com KOH a 20%, corados pelo Gram e também cultivados em ágar-sangue (semi-anerobiose) à 37°C, afim de se obter o isolamento do agente etiológico.

Para identificação dos fungos isolados, foram feitos microcultivos em ágar-sabouraud-dextrose e ágar-batata, enquanto que para a identificação das bactérias foi necessário realizar os testes de decomposição da tirosina e hidrólise da caseína (3).

RESULTADOS

O grupo estudado consistiu de 4 homens e 1 mulher, de idades variando entre 24 a 56 anos, sendo que 3 casos possuíam lesões nos pés, um na mão D e um nas nádegas. Estes dados, relacionados ao agente etiológico isolado, são apresentados na Tabela 1.

Todos os grãos observados apresentaram-se macroscopicamente de cor branco-amarelados.

O exame com KOH e a coloração pelo Gram mostraram microscopicamente inúmeras hifas lar-

gas em 4 casos e filamentos finos, ramificados, Gram positivos em 1 caso.

Pseudoallescheria boydii e *Acremonium sp* foram possíveis de serem identificados através de cultura em ágar-Sabouraud e micro-cultivo em ágar-batata. As colônias de *Pseudoallescheria boydii* mostraram-se com micélio aéreo branco, tornando-se cinza claro com o passar do tempo (Fig. 1). A microscopia do microcultivo, observou-se hifas finas, hialinas, septadas com conídios ovóides ou piriformes, de parede espessa, lisa, distribuídos ao longo de conidióforos (Fig. 2). Em

TABELA 1 - Sexo, idade, localização das lesões e agentes etiológicos observados em 5 casos de micetomas em Goiânia-Go.

Caso (Nº)	Sexo	Idade (ANOS)	Localização	Agente Etiológico
01	M	24	Nádegas	<i>Nocardia brasiliensis</i>
02	M	32	Pé D	<i>Pseudoallescheria boydii</i>
03	F	33	Pé D	<i>Pseudoallescheria boydii</i>
04	M	41	Mão D	<i>Pseudoallescheria boydii</i>
05	M	56	Pé D	<i>Acremonium sp</i>



Fig. 1 - Colônias de *Pseudoallescheria boydii* em ágar-Sabouraud com 10 dias de crescimento à temperatura ambiente.

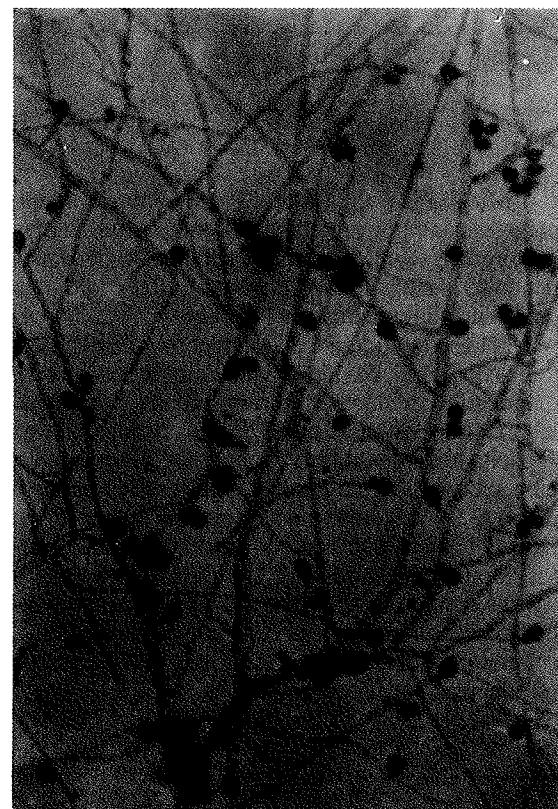


Fig. 2 - Microcultivo de *Pseudoallescheria boydii* mostrando conídios ovóides ligados aos conidióforos

um dos isolamentos observou-se a formação de cleistotécios (Fig. 3).

Acremonium sp cresceu formando colônias com micélio aéreo branco e pigmento rosado no reverso (Fig. 4). O exame microscópico do microcultivo mostrou hifas hialinas com conídios alongados na parte terminal de conidióforos (Fig. 5).

Nocardia brasiliensis cresceu em ágar-Sabouraud produzindo colônias elevadas, pregueadas de cor alaranjada com superfície esbranquiçada (Fig. 6). Observou-se microscopicamente filamentos muito finos e formas bacilares. A amostra isolada foi capaz de compor a caseína e a tirosina, não decompondo a xantina, separando-a das outras espécies de *Nocardia*.

DISCUSSÃO

O histórico dos pacientes demonstrou que as lesões foram adquiridas após traumatismos por materiais encontrados na natureza. Alguns agentes etiológicos de micetoma já foram isolados do solo e de vegetais (1,4,10,12).

Petriellidium boydii ou *Pseudoallescheria boydii* é o agente etiológico de eumicetoma encontrado no Brasil. Purchio e cols (8) citam em seu trabalho 10 casos de micetoma por este agente, ocorridos nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Pernambuco, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, sendo todos de localização podal e relata 1 caso de acontecimento de antebrço. Cabe-nos agora, acrescentar 2 casos de localização podal e 1 no dorso da mão esquerda ocorridos no estado de Goiás.

Não foi possível a identificação da espécie de *Acremonium* isolada (pé direito) mas devido a forma do conídio parece tratar-se de *Acremonium reficei*. Na literatura, há relatos de isolamentos de gênero *Acremonium* como produtor de eumicetoma (5).

Apesar da maior frequência de relatos de micetoma actinomicótico do que eumicótico (6,7), no período estudado, só foi observado um caso de localização nas nádegas do qual se isolou *Nocardia brasiliensis*, que é o agente etiológico mais comum de actinomicetoma, não só em países da América do Sul, como também no México (2,10,11).

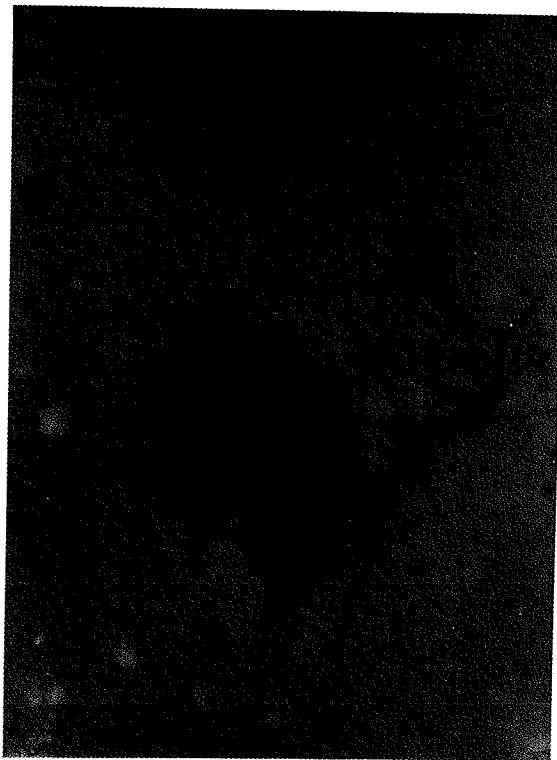


Fig. 3 - Cleistotécio de *Pseudoallescheria boydii* contendo grande quantidade de ascos.

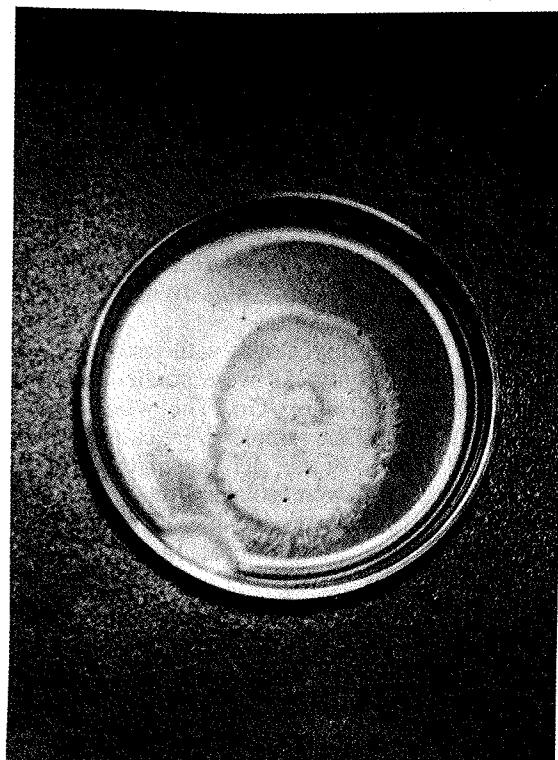


Fig. 4 - Colônia em placa de ágar Sabouraud de *Acremonium* sp com 10 dias de crescimento à temperatura ambiente.

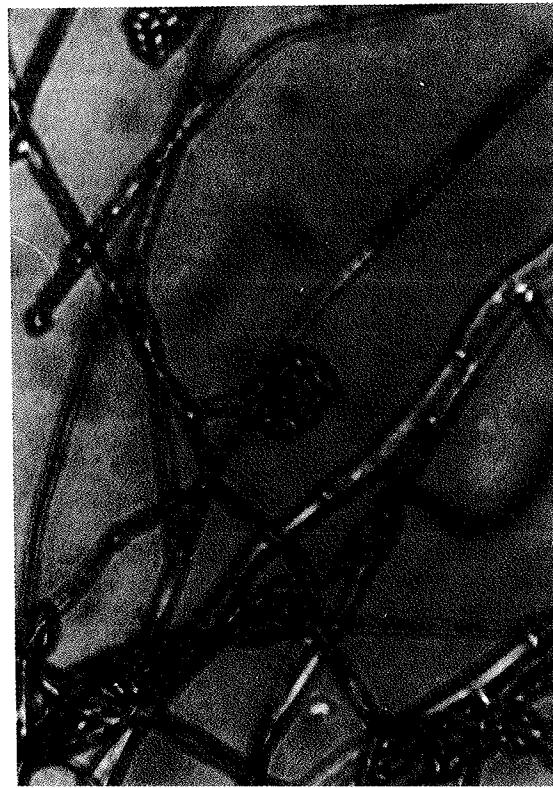


Fig. 5 - Microcultivo de *Acremonium* sp com conídios alongados em cachos na extremidade dos conidióforos.

SUMMARY

Etiologic agents of mycetoma found in the state of Goiás-Brasil

Five cases of mycetoma with lesions on the feet, hands and buttocks were studied between April 1987, in Goiânia-Go. The white-yellow grains found in all the samples were cultivated and *Pseudoallescheria boydii*, *Acremonium* sp and *Nocardia brasiliensis* were isolated from the cultures. The first two agents were identified after culturing in ágar-Sabouraud and microculturing in ágar-potato. *Nocardia brasiliensis* was identified by a test of xanthine and tyrosine decomposition and by casein hydrolysis.

Key words: etiologic agents of mycetoma.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Anita Alves de Olivei-

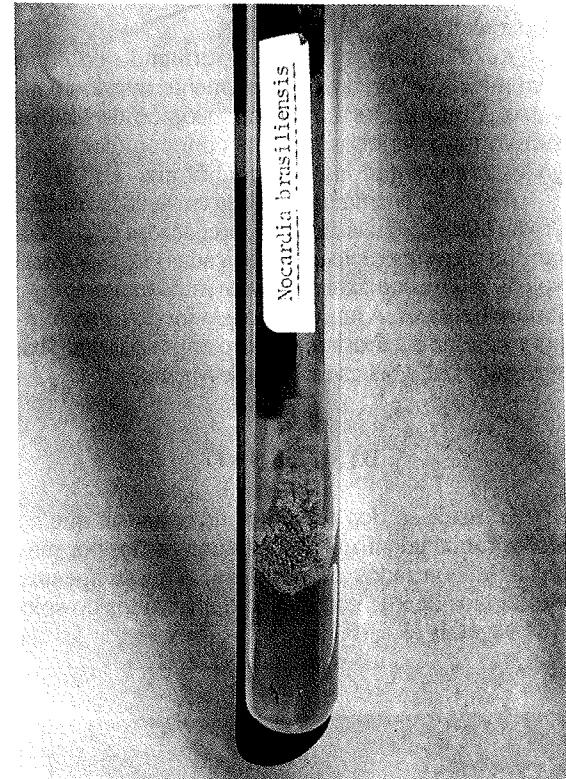


Fig. 6 - Colônia de *Nocardia brasiliensis* em ágar Sabouraud com 10 dias de crescimento à 37°C.

ra e Ana Paula Dayrell Fernandes de Melo pela ajuda técnica no presente trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Biasoli, M. S.; Álvarez, D. P.; Bracalenti, B. C. - Study of *Madurella grisea* strain isolated from a foot mycetoma. *Mycopathologia*, 94: 117-121, 1986.
2. Lacaz, C. S. - Distribuição geográfica dos micetomas no Brasil. *An. Bras. Dermatol.*; 56: 167-172, 1981.
3. Lacaz, C. S. - Micologia Médica. Fungos, actinomicetos e algas de interesse médico, Sarvier 1977.
4. Lacaz, C. S.; Melhem, M. S. C. & Cucé, L. C. - Maduromicose podal por *Petriellidium boydii*. Registro de um caso. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo*, 32: 244-277, 1977.
5. Lacaz, C. S. ; Porto, E.; Cucé, L. C. & Salebian, A. - Maduromicose por *Cephalosporium acremonium*. Registro de um caso. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 21: 56-61, 1979.
6. Londero , A. T.; Ramos , C. & Matte, S. W. - Mictomas actinomicóticos no Rio Grande do Sul. Relato de quatro casos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 8: 73-77, 1986.
7. Mello Filho, A.; Proença, N. G.; Rosa,I. P.; Pereira,

- W. A. - Um caso de micetoma nocardíosico. Reavaliação de doze anos após a cura clínica. *An. Bras. Dermatol.*, 57: 215-218, 1982.
8. Purchio, A.; Gambale, W.; Paula, C. R.; Yamamura, I. & Cavalcante, A. S. B. - Micetoma do antebraço por *Petriellidium boydii*. Registro de um caso. *An. Bras. Dermatol.*, 56: 281-284, 1981.
9. Rocha, O. M.; Lacaz, C. S.; Porto, E.; Heins, E. M.; Schaf, S.; Hirose-pastor, E.; Cossernelli, W. Micetoma articular por *Petriellidium boydii*. Registro de um caso. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 22: 24-29, 1980.
10. Ruiz, E. M.; Torre, R. S.; Rodrigues, R. C. - Los micetomas. *Rev. Inst. Mex. Del. Soc.* (México), 19: 731-737, 1981.
11. Saul, A.; Gambale, W.; Messina, M.; Andrade, R. - Mycetoma due to *Nocardia cavie*, *Int. J. Dermatol.*, 26: 174-177, 1987.
12. Winston, D. J.; Jordan, M. C.; Rhodes, J. - *Alescheria boydii* infections in immunosuppressed host. *Am. J. Med.*, 63: 830-834, 1987.

Recebido para publicação em 12/07/90

SCANNING ELECTRON MICROSCOPY OF *BACTEROIDES FRAGILIS* EXPOSED TO ANTIMICROBIAL AGENTS

Maria Cândida Ferreira
Regina M. C. P. Domingues
Inácio D. Silva Neto
Milton de Uzeda

SUMMARY

Varied subminimal inhibitory concentrations of metronidazole, clindamycin, penicillin G and chloramphenicol were analysed in relation to morphological aspect of *Bacteroides fragilis* by scanning electron microscopy (SEM) after 24 hours of incubation. Penicillin G, metronidazole and chloramphenicol induced filamentation as the major modification. On the other hand, the predominant alteration exerted by clindamycin was the presence of vesicles on cell surface. All these cellular morphologies changed probably reverberate in the host-parasite relationships.

Key words: Scanning electron microscopy, *Bacteroides fragilis*, antimicrobial agents.

INTRODUCTION

The anaerobic infections are characterized by a tissue destruction and also by a complex flora at site of infection. The host, usually, answer at this insult by a tentative remotion of these microorganisms and the result is nearly always the development of abscess (2). *Bacteroides fragilis* is the anaerobic bacterium most commonly isolated from those clinical infections (5,12).

The antimicrobial drugs penetration in such abscess is usually reduced (11) and delayed (7), even if the serum level exceeds the values of minimal inhibitory concentrations (MIC) of these pathogens. Then, the sublethal concentrations achieved may induce alterations in morphology, ultrastructure, biochemical behaviour and multiplication rate of these microorganisms that certainly elicit serious consequences on their virulence as well as their susceptibility to the host immune defences (13).

As the scanning electron microscopy offers the ability to examine cell topographic alterations at relatively high resolution (9,3), in this study this technique has been used to examine the effects induced by chloramphenicol, metronidazole, clindamycin and penicillin G in subinhibitory concentration on strains of *B. fragilis*.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains - Strains of *B. fragilis* used in this study were isolated from lung abscess and endometritis and kept freeze-dried in our culture collection. Two strains from the American Type Culture Collection (Rockville, MD) were also used: ATCC 25285 and ATCC 23745. The strains were identified by the biochemical scheme of Holdeman *et al.* (10).

Federal University of Rio de Janeiro, Institute of Microbiology, P.O. BOX 68040 - Ilha do Fundão, Rio de Janeiro-RJ - BRASIL

Antibiotics - The antibiotics used in the investigation were obtained from the following sources: clindamycin hydrochloride, Upjohn; chloramphenicol, Sigma; penicillin G, Squibb; metronidazole, Rhodia.

Determination of MIC - MICs of all strains used in this investigation were determined by an agar dilution technique (17). Stock solutions of antibiotics were prepared in distilled water, except chloramphenicol, which was dissolved in ethyl alcohol. Two fold dilutions of the antibiotics were prepared in Brain Heart Infusion Agar (Merck) (BHI) with 5% defibrinated sheep blood. The inoculum was approximately 10^4 cfu per spot, delivered by a Steer's replicate. Control plates without antibiotic were inoculated in parallel. Incubation was carried out anaerobically at 37°C for 24h. The MIC was determined as the lowest dilution of antibiotic that inhibited visible growth.

Antimicrobial treatments - In BHI, pre-reduced and anaerobically sterilized (PRAS) (10) containing one half, one quarter and one eighth the MIC of a given antibiotic, was seeded an 18h culture grown at 37°C to give a final concentration of approximately 10^4 cfu/ml. One antibiotic free culture was used as a control with each strain. Aliquots were taken after 24h incubation, centrifuged and the sediment washed three times with phosphate buffer (PB) with 140 mM NaCl (pH 7,0 ± 0,02)(PBS), and right after, resuspended in the same buffer to give bacterial suspension, with final concentration ca 10^9 cfu/ml.

Scanning electron microscopy - The bacterial suspension was fixed for 1h in 2,5% v/v glutaraldehyde in 0,1M phosphate buffer. After fixation, it was washed and left to adhere on coverslips, which had been previously covered with poly-L-lysine 0,12 M in PBS, for 15 min. After adherence of this material the coverslips were washed five times for 10 minutes with sodium cacodilate buffer, 0,05M.

Afterwards, they were dehydrated in ethanol, critical-point dried with CO₂ liquid, coated with 20nm thick layer of gold and then observed in a JEOL JSM-25S-II Scanning Electron Microscope, operated at an acceleration voltage of 15 kV.

RESULTS

MIC determination

The strains and their MIC values are presented in Table I. All strains were susceptible to clindamycin, chloramphenicol and metronidazole, and inhibited by 8-32 µg/ml of penicillin G.

Morphological studies

The appearance of the strain *B. fragilis* (ATCC 23745) in the absence of antibiotics is shown in figure 1a. The cell bacterium is smooth with bacillary form, some of them still bound to each other. The figure 1b presents the strain 048203, isolated from endometrite, when it was cultured in presence of one eighth MIC of penicillin G. After exposure, for 24h, the surface of bacteria appeared roughened, grossly altered with occasional small vesicles. Spheroplast-like structures together with filaments were formed. The super elongation observed produced 3 to 6 times length of the bacterium.

Sublethal concentration of metronidazole, one eighth of MIC, did not induce significant change on cell surface of strain 0978041, but on the other hand evoked filament formation (figure 1c), as effect of inhibition of normal septation.

In figure 1d the predominant alteration of the cells exposed to clindamycin, in high concentration (1/2 MIC), were the vesicles, spread all over the surface. Except for the filamentation, no major differences could be seen in electron micrographs of SEM of the strain ATCC 25285 grown in presence of one quarter of chloramphenicol (figure 1e).

TABLE I — MICs of the *B. fragilis* strains

Strain number	Penicillin G	MIC (µg/ml)		
		Clindamycin	Chloramphenicol	Metronidazole
048203	32,0	0,64	4,0	0,5
0978041	16,0	NT	4,0	NT
ATCC 23745	32,0	0,024	3,2	1,0
ATCC 25285	8,0	0,096	3,2	1,0

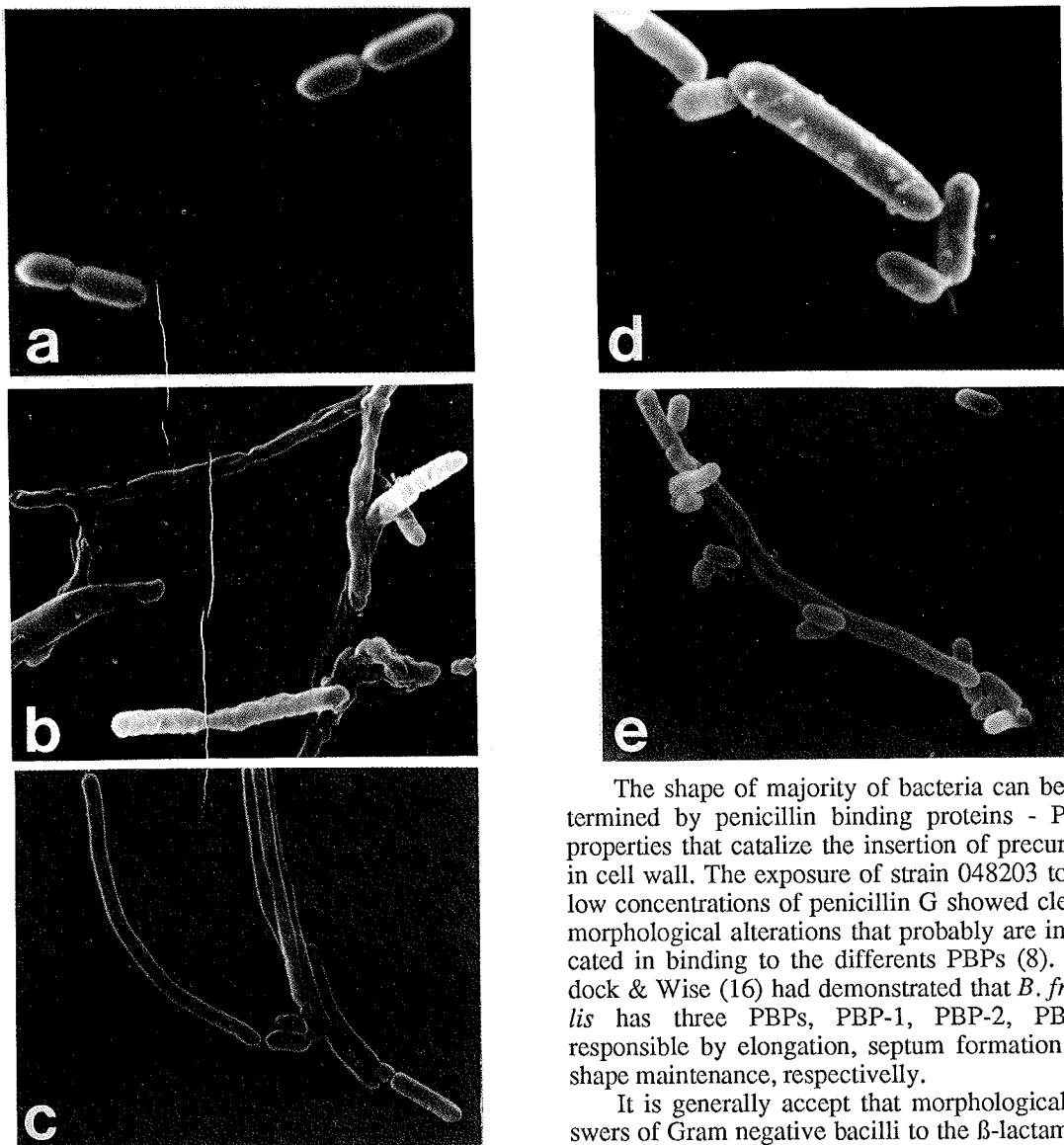


FIGURE 1 - Scanning electronmicrographs of *B. fragilis* exposed to (A) no antibiotic — ATCC 23745 -10.000 X; (B) penicillin G 4 µg/ml I (M 048203 - 10.000 S;) (C) metronidazole 0,125µ/ml -IM 0978041 7.000 X; (D) clindamycin 0,016µg/ml - ATCC 23745 - 20.000 X; (E) chloramphenicol 8,0µg/ml - ATCC 252285 - 7.000 X.

DISCUSSION

The results clearly demonstrated that the antimicrobial agents chloramphenicol, penicillin G, clindamycin and metronidazole causes morphological alterations be it to the surface or to the whole cell.

The shape of majority of bacteria can be determined by penicillin binding proteins - PBPs properties that catalize the insertion of precursors in cell wall. The exposure of strain 048203 to the low concentrations of penicillin G showed clearly morphological alterations that probably are implicated in binding to the different PBPs (8). Piddock & Wise (16) had demonstrated that *B. fragilis* has three PBPs, PBP-1, PBP-2, PBP-3, responsible by elongation, septum formation and shape maintenance, respectively.

It is generally accept that morphological answers of Gram negative bacilli to the β -lactam antibiotics be filamentation at low concentrations and formation of spheroplasts at high concentrations (15). The filaments and spheroplasts of strain number 048203 have not been seen only in the higher concentration of the antimicrobial agent (4), but also in small concentration of penicillin G. The probably reason is that the majority observations, in the literature, was done only after 2 to 4 hours of exposure to the subinhibitory concentration whereas our observation was done after 24 hours. However, we must not discard the possibility of binding to different PBPs yielding such alterations. The SEM provided the opportunity of visualization of these phenomena reflected on sur-

face of entire population.

The metronidazole, one of most efficacious antimicrobial agent in the anaerobic infections treatment produced alterations on bacilli lenght inducing long filaments. We observed varied size of filaments as if the drug action, in such concentration, was inhibitory of normal septation. The analysis of those alterations, by SEM, agree with the results of Atisso *et al.* (1), that in the cito-morphological studies of *B. fragilis*, grown in sub-MICs of ornidazole, analog of metronidazole, related the presence of filaments and abnormal cellular divisions, by the same methodology.

It was postulated by Lorian (13) that clindamycin induces to elongation and in some times, fusiforme morphology. Nevertheless, Gemmell *et al.* (6) and Namavar *et al.* (14), detected, both, no effect on cellular morphology of *B. fragilis* strains, grown in sub-MICs of clindamycin, by optical and transmission electron microscopy, respectively. By SEM we could confirm these results, although different subinhibitory concentration has been used. The vesicles, observed, seems to be being liberated from the cells. However it was not examined the possibility that clindamycin had exerted action on liberation of outer membrane components, for example.

The significance of elongation induced by chloramphenicol at sub-MICs, observed by SEM, could not be evaluated. In spite of no alteration has been detected by optical microscopy by others (14), the results presented here are compatible with the observation that many alterations in Gram negative bacteria are only detected by electron microscopy.

All those alterations of cellular morphology occur, certainly, as an effort to adapt themselves to adverse environment conditions. On the other hand, these distortions supposedly modify the bacterial pathogenic aspect since surface structures are important components on host-parasite relationships.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) and Conselho de Ensino para Graduados da Universidade Federal do Rio de Janeiro (CEPG/UFRJ).

We acknowledge the generous use of the Jeol JSM-25S-11 Scanning Electron Microscope pro-

vided by Dr. Wanderley de Souza and Dr. Raul Machado, Institute of Byophysis Carlos Chagas Filho, UFRJ.

RESUMO

Microscopia eletrônica de varredura de *Bacteroides fragilis* exposto a agentes antimicrobianos

Variadas concentrações submínimas inhibitórias de metronidazol, clindamicina, penicilina G e cloranfenicol foram analisadas em relação ao aspecto morfológico de *Bacteroides fragilis* por microscopia eletrônica de varredura após 24h de incubação. Penicilina G, metronidazol e cloranfenicol induziram à filamentação, como modificação predominante. Por outro lado, a alteração predominante exercida por clindamicina foi a presença de vesículas na superfície celular. Todas essas morfologias celulares alteradas provavelmente repercutem nas relações parasito-hospedeiro.

Palavras-chave: Microscopia eletrônica de varredura, *Bacteroides fragilis*, agentes antimicrobianos.

REFERENCES

- Atisso, M. A.; Dusart, G.; Buochberg, S. & Zuccarelli, M. Study of morphological and ultrastructural changes of the action of ornidazole on *Bacteroides fragilis*. *Pathol. Biol.*, **35** (5 Bis.); 813-816, 1987.
- Cuchural, G. & Tally, F. P. Factors affecting the choice of antimicrobial therapy for anaerobic infection. *J. Antimicrob. Chemother.*, **10**: 11-22, 1982.
- Elliott, T. S. J. & Greenwood, D. The response of *Pseudomonas aeruginosa* to azlocillin, ticarcillin and cefsulodin. *J. Med. Microbiol.*, **16**: 351-362, 1983.
- Ferreira, M. C. S. *Bacteroides fragilis*: atividade de sialidase e interferência de antibióticos na produção enzimática, crescimento e morfologia celular. Tese de Doutorado. Instituto de Microbiologia da UFRJ, Rio de Janeiro, 1989.
- Finegold, S. M.; Attebery, M. R. & Sutter, V. L. Effect of diet on human fecal flora: comparison of Japanese and American diets. *Am. J. Clin. Nutr.*, **27**: 1456-1459, 1974.
- Gemmell, C. G.; Peterson, P. K.; Schmeling, D.; Matthews, J. & Quie, P. G. Antibiotic induced modification of *Bacteroides fragilis* and its susceptibility to phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, **2**: 327-334, 1983.
- Gemmell, C. G. Clindamycin and its action on the susceptibility of pathogenic bacteria to phagocytosis. *Scand. J. Infect. Dis.*, **16**: 17-23, 1984.
- Georgopapadakou, N. H. & Lin, F. Y. Penicillin binding proteins in bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **18**: 148-157, 1980.

9. Greenwood, D. & O'Grady, F. Antibiotic-induced surface changes in microorganisms demonstrated by scanning electron microscopy. *Science*, 163: 1076-1078, 1969.
10. Holdeman, L. V.; Cato, E. P. & Moore, W. E. C. Anaerobe Laboratory Manual. 4th ed., Virginia Polytechnic Institute & State University, Blacksburg, Va, 1977.
11. Joiner, K. A.; Lowe, B. R.; Dzink, J. L. & Bartlett, J. G. Antibiotic levels in infected and sterile subcutaneous abscesses in mice. *J. Infect. Dis.*, 143: 487-494, 1981.
12. Jones, R. N. & Fuchs, P. C. Identification and antimicrobial susceptibility of 250 *Bacteroides fragilis* subspecies tested by broth microdilution methods. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 9: 719-721, 1976.
13. Lorian, V. Effect of low antibiotic concentration on bacteria: effects on ultrastructure, their virulence and susceptibility to immunodefenses. In: Lorian, V. (Ed). *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 2nd ed., Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 1986.
14. Namavar, F.; Kaan, J. A.; Verweij-van Vught, A. M. J. J.; Vel, W. A. C.; Bal, M.; Kester, A. D. M. & MacLaren, D. M. Effect of *Bacteroides fragilis* grown in the presence of clindamycin, metronidazole and fusidic acid on opsonization and killing of *Escherichia coli*. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, 5: 324-329, 1986.
15. Onoe, T.; Umemoto, F.; Sagawa, H. & Luginaka, H. Filament formation of *Fusobacterium nucleatum* cells induced by mecillinam. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 19: 487-489, 1981.
16. Piddock, L. J. V. & Wise, R. The PBPs of *Bacteroides fragilis*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 12: 292, 1983.
17. Tally, F. P. & Gorbach, S. L. *Anaerobic Bacteriology for Clinical Laboratories*. Tufts University Scholl of Medicine, Boston, Mass., 1979.

Received for publication in 03/09/90.

STREPTOCOCCUS SALIVARIUS: DETECCÃO DE CEPAS PRODUTORAS DE SUBSTÂNCIAS SEMELHANTES À BACTERIOCINAS CONTRA BACTÉRIAS BUCAIS.

Vera Fantinato ¹
& Flávio Zelante ²

RESUMO

Foi colhido material das superfícies da língua e da mucosa da bochecha objetivando o isolamento de *Streptococcus salivarius*. Após identificação bioquímica das cepas isoladas, procedeu-se à verificação da produção de substâncias semelhantes à bacteriocinas contra cepas de *Actinomyces viscosus*, *Rothia dentocariosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis*. A técnica empregada foi a do antagonismo posposto, através da qual foi demonstrada a produção de substâncias semelhantes à bacteriocinas por 47 das 48 cepas analisadas. Observou-se acentuado antagonismo contra *R. dentocariosa*, *S. pyogenes* e *A. viscosus*; extremamente baixa sobre *S. sanguis* e *S. mutans* e nenhuma inibição de *S. aureus*.

Palavras chave: *Streptococcus salivarius*, bacteriocinas

INTRODUÇÃO

Sabe-se que a microbiota residente na cavidade bucal tem, entre outras, a função de proteger o hospedeiro, impedindo ou dificultando a implantação de microrganismos estranhos a esse ambiente.

Algumas espécies de *Streptococcus*, além de possuírem características fisiológicas e estruturais que possibilitam a sua integração rápida na microbiota bucal, contam com a produção de bacteriocinas como mais uma arma para manterem-se na condição de colonizadoras predominantes nesse habitat.

Estas substâncias são de natureza protéica, produzidas por síntese letal e cuja adsorção à bactéria-alvo está condicionada à presença de receptores específicos (8).

Talvez pela dificuldade de identificação de tais substâncias, inúmeros autores relatam antagonismo entre bactérias, porém sem qualquer caracterização dos produtos envolvidos, sendo recomendada a expressão "substâncias semelhantes à bactericina" para os produtos bacterianos com atividade antagônica, mas incompletamente caracterizados (17).

Trabalhos recentes tem revelado o crescente interesse em informações sobre bacteriocinas produzidas por estreptococos bucais (2,4,10,19). Embora ainda se desconheça o significado da produção dessas substâncias "in vivo", autores como Dempster & Tagg (4), sugerem sua participação no impedimento da colonização de patógenos potenciais do trato respiratório superior, já que verificaram "in vitro" a inibição de espécies como *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* e *Corynebacterium diph-*

1 - Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Caixa Postal 314, 12245 - São José dos Campos - SP - Brasil

2- Instituto de Ciências BiomédicasDepartamento de MicrobiologiaUniversidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374,
Cidade Universitária, 05508 - São Paulo - SP - Brasil

theriae, por cepas de *S. salivarius* bacteriocinogênicas. Já Rutter et alii (11) e Tagg & Russell (19), sugerem o uso de cepas produtoras de bacteriocinas no controle da cárie dental ou de infecções do trato respiratório superior.

A pesquisa de cepas bacteriocinogênicas pode, ainda, voltar-se para a tipagem de estreptococos, conforme demonstraram os trabalhos de Azevedo et alii (2), Tagg & Bannister (16) e Tagg et alii (18).

Embora a literatura sobre bacteriocinas seja relativamente volumosa, as observações sobre a produção de tais substâncias por *S. salivarius* são bastante escassas, o que nos levou a obter maiores informações neste sentido.

MATERIAL E MÉTODOS

Colheita de material — De 6 indivíduos com idade entre 17 e 25 anos, foi colhido material das superfícies da língua e mucosa da bochecha, com o auxílio de alça de platina estéril. O material assim obtido foi imediatamente semeado em placas de Mitis-Salivarius Agar (Difco), as quais foram incubadas a 37°C durante 24 horas em atmosfera de CO₂, obtida pelo método da vela.

Identificação das cepas — As placas que apresentaram crescimento foram observadas quanto ao aspecto morfológico das colônias, escolhendo-se aquelas com características de *S. Salivarius* (1 a 5 mm de diâmetro, mucoides, azuis, lisas, com grande quantidade de polissacarídeo). Colheu-se uma média de cinco colônias de cada placa. Estas foram transferidas para caldo "Brain Heart Infusion" - BHI (Difco) e incubadas a 37°C durante 24 horas em atmosfera de CO₂, seguindo-se repique em ágar-sangue para estoque.

A identificação bioquímica das cepas de *S. salivarius* foi realizada através de provas constantes do esquema proposto por Hardie & Bowden (6), incluindo-se a prova de hemólise e fermentação da inulina.

Produção de substâncias semelhantes à bacteriocina — A técnica adotada foi a do antagonismo posposto, utilizada por Azevedo et alii (2). As cepas a serem testadas como produtoras foram cultivadas em caldo BHI por 24 horas a 37°C e, em seguida, semeadas por três picadas rasas em placas com ágar BHI e incubadas a 37°C por 24 horas em atmosfera de CO₂. Cada cepa foi semeada em três placas para posterior recebimento das diferentes diluições da película indicadora.

Foram empregadas, como indicadoras, as seguintes cepas: *Actinomyces viscosus* B-236, *Actinomyces viscosus* WVU-627, *Actinomyces viscosus* T-14V, *Actinomyces viscosus* M100R, *Rothia dentocariosa* ATCC 14190, *S. mutans* GS5 sorotipo c, *S. Mutans* LM7 sorotipo e, *S. mutans* 14B6 sorotipo d, *S. sanguis* I, *S. pyogenes* (isolada de faringe de portador assintomático), *S. pyogenes* ATCC 8133 e *S. aureus* Cowan I - NCTC 8530. Estas cepas foram cultivadas em caldo BHI por 24 horas a 37°C, de onde se prepararam diluições de 1/10, 1/50 e 1/100, também em caldo BHI. A seguir foram preparados os inóculos finais, transferindo-se 1 ml de cada diluição para tubos contendo 7,5 ml de caldo BHI acrescido de 0,75% de ágar, mantidos a aproximadamente 50°C. Este inóculo foi homogeneizado com o auxílio de agitador e vertido cuidadosamente sobre a superfície do ágar previamente semeado com as cepas a serem testadas como produtoras de substâncias semelhantes à bacteriocina. Após solidificação desta película indicadora, as placas foram reincubadas a 37°C por 24 horas em atmosfera de CO₂, com exceção de *Rothia dentocariosa*, que foi incubada aerobicamente.

Na leitura considerou-se como resultados:

positivo - quando se observou halo nítido de inibição do crescimento da cepa indicadora, independente de tamanho, em torno dos pontos de inoculação das cepas produtoras;

moderadamente positivo - quando se observou halo de inibição do crescimento da indicadora, porém com algumas colônias no interior do halo;

negativo - quando se observou ausência de halos de inibição.

Considerou-se para análise a placa com maior nitidez de leitura, independentemente do fator de diluição da cepa indicadora.

Para a tipagem das cepas de *S. salivarius*, utilizou-se como base o esquema desenvolvido por Al-jumaili (1) e empregado por Tagg & Bannister (16): dividiu-se as 12 cepas indicadoras em quatro grupos de três: *A. viscosus* T14V, *A. viscosus* M100R, *A. viscosus* B236, *A. viscosus* WVU-627, *S. aureus* Cowan I, *R. dentocariosa*; *S. pyogenes*, *S. pyogenes* ATCC 8133, *S. sanguis*; *S. mutans* GS5, *S. mutans* LM7, *S. mutans* 14B6. Uma reação positiva ou moderadamente positiva para o primeiro membro de qualquer trio (*A. viscosus* T14V, *A. viscosus* WVU-627, *S. pyogenes*, *S. mutans* GS5) recebia o valor numérico quatro; uma reação positiva ou moderadamente positiva para o segundo membro de qualquer trio recebia o valor dois e para o terceiro membro, o valor um; uma reação negativa recebia o valor zero.

Somando-se os valores numéricos de cada trió, obtém-se a "impressão digital" de cada cepa, expressa por um número de quatro dígitos. Assim, uma cepa com o resultado -++/-+/-+/---, os valores numéricos respectivos são 421/001/420/000, cuja soma gera o padrão 7160.

RESULTADOS

Os resultados do comportamento das 48 cepas analisadas quanto à produção de substâncias semelhantes à bacteriocina encontram-se na Tabela 1.

Na Tabela 2 estão expressos o número de vezes que cada padrão foi encontrado em ambos os nichos pesquisados, bem como os respectivos percentuais. Observou-se o predomínio de apenas um deles, 7560, que se manifestou 11 vezes.

Considerando-se a presença de cepas idênticas nos dois nichos estudados, em um mesmo portador, observou-se a ocorrência deste fato em quatro indivíduos.

Considerando-se cada portador individualmente, observou-se que a maioria das cepas diferiam entre si, indicando que um único indivíduo albergava de três a nove tipos diferentes de *S. salivarius*.

Se considerarmos resultado positivo quando uma cepa de *S. salivarius* produzir substâncias semelhante à bacteriocina contra, pelo menos, uma cepa de cada espécie indicadora, poderemos empregar o esquema utilizado por Tagg & Bannister (16) da seguinte maneira: as seis espécies indicadoras (*A. viscosus*, *S. aureus*, *R. dentocariosa*, *S. pyogenes*, *S. sanguis* e *S. mutans*) são divididas em dois grupos de três; uma reação positiva para pelo menos uma das quatro cepas de *A. viscosus* recebe o valor numérico quatro; uma reação positiva para *S. aureus* Cowan I recebe o valor numérico dois; reação positiva para *R. dentocariosa* o valor um; para *S. pyogenes* será dado o valor numérico quatro se, pelo menos, uma das duas cepas apresentar resultado positivo; se *S. sanguis* fornecer reação positiva, seu valor numérico será dois; uma reação positiva para pelo menos uma das três cepas de *S. mutans* recebe o valor numérico um; uma reação negativa para todas as cepas de uma espécie recebe o valor numérico zero.

Assim, exemplificando com uma cepa que demonstrou atividade apenas contra *A. viscosus* T14-V, *R. dentocariosa* e *S. pyogenes*, seu resultado seria -++/+-, cujos valores numéricos respectivos são 401/400, gerando o padrão 54.

TABELA 1 - Comportamento de 48 cepas de *S. salivarius* quanto a produção de substâncias semelhantes a bacteriocinas frente às indicadoras utilizadas.

Produtoras	+		±		-	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>A. viscosus</i>						
T14V	30	62,5	12	25,0	6	12,5
M100R	22	45,8	13	27,1	13	27,1
B236	12	25,0	13	27,1	23	47,9
WVU-627	25	52,1	14	29,1	9	18,7
<i>S. aureus</i>						
Cowan I	0	0,0	0	0,0	48	100,0
<i>R. dentocariosa</i>						
ATCC 14190	43	89,5	1	2,1	4	8,3
<i>S. pyogenes</i>						
ATCC 8133	26	54,1	13	27,1	9	18,7
	22	45,8	11	22,9	15	31,2
<i>S. sanguis</i> I	2	4,1	0	0,0	46	95,8
<i>S. mutans</i>						
GS5 sor. c	1	2,1	0	0,0	47	97,9
LM7 sor. e	0	0,0	0	0,0	48	100,0
14B6 sor. d	0	0,0	3	6,2	45	93,7

+ = produtora

± = moderadamente produtora

- = não produtora

Com esta análise, obtivemos 9 padrões diferentes (Tabela 3), com predomínio marcante do padrão 54.

DISCUSSÃO

Todas as cepas de *S. salivarius* analisadas, com exceção de uma, foram capazes de produzir substâncias semelhantes à bacteriocina contra, ao menos, um dos microrganismos do conjunto utilizado como indicador.

Constatamos maior número de cepas de *S. salivarius* produtoras de substâncias semelhantes à bacteriocina capazes de impedir o crescimento de *R. dentocariosa*, havendo inibição em 89,5% dos casos e moderada em 2,1%. Estes dados não podem ser confrontados com os de outros autores, visto que nenhum dos que realizaram tais estudos o fez contra o microrganismo em questão.

No entanto, Holmberg & Hallander (7), testaram cepas de *S. sanguis*, *Corynebacterium sp*, *Lactobacillus* e *Bacterionema* contra outras das mesmas espécies referidas, bem como contra *S. mutans*, *S. salivarius*, *Rothia* e *Actinomyces*. To-

TABELA 2 - Ocorrência de padrões bacteriocinogênicos de *S. salivarius*, isolados da superfície da língua e da mucosa da bochecha.

Padrão	Língua		Bochecha		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
7160	1	2,08	0	0,00	1	2,08
7560	5	10,41	6	12,50	11	22,92
0160	1	2,08	1	2,08	2	4,16
5560	1	2,08	0	0,00	1	2,08
4140	0	0,00	1	2,08	1	2,08
0000	0	0,00	1	2,08	1	2,08
2140	0	0,00	1	2,08	1	2,08
7576	3	6,25	0	0,00	3	6,25
7500	1	2,08	1	2,08	2	4,16
6570	0	0,00	1	2,08	1	2,08
6160	1	2,08	0	0,00	1	2,08
7540	2	4,16	2	4,16	4	8,32
7474	1	2,08	0	0,00	1	2,08
4500	2	4,16	0	0,00	2	4,16
6540	1	2,08	1	2,08	2	4,16
6560	1	2,08	2	4,16	3	6,25
7460	0	0,00	1	2,08	1	2,08
6561	2	4,16	0	0,00	2	4,16
4561	1	2,08	0	0,00	1	2,08
6520	2	4,16	0	0,00	2	4,16
0040	0	0,00	2	4,16	2	4,16
4560	0	0,00	1	2,08	1	2,08
4520	0	0,00	2	4,16	2	4,16
TOTAL	25	52,02	23	47,86	48	99,90

TABELA 3 - Prevalência dos padrões bacteriocinogênicos apresentados pelas cepas de *S. salivarius* frente às espécies utilizadas como indicadoras.

Padrões bacteriocinogênicos	Nº de cepas	%
401/400 - 54	33	68,7
001/400 - 14	2	4,1
000/000 - 00	1	2,1
401/000 - 50	4	8,3
401/421 - 57	1	2,1
400/400 - 44	1	2,1
401/401 - 55	3	6,2
000/401 - 04	2	4,1
401/420 - 56	1	2,1
TOTAL	48	99,8

dos os microrganismos foram sensíveis unicamente à ação de *S. sanguis* enquanto *Rothia* mostrou-se sensível à ação das 4 cepas testadas. Hamada & Ooshima (5), testando 8 cepas de *S. mutans* contra *Rothia*, verificaram sensibilidade frente a 5 delas. Estes dados, bem como os nossos, indicam uma acentuada sensibilidade de *Rothia dentocariosa* frente a produtos inibidores de microrganismos.

Também com elevada prevalência, *S. pyogenes* apresentou sensibilidade à atividade bacteriocinogênica de *S. salivarius* sendo a média de inibição de 49,9%. Se considerarmos que as cepas de *S. salivarius* que se mostraram moderadamente produtoras também foram capazes de inibir, embora não completamente, as cepas indicadoras de *S. pyogenes*, somando-se o resultado das médias das produtoras e das moderadamente produtoras, temos um total de 74,9% de cepas de *S. salivarius* capazes de interferir "in vitro" no crescimento desses estreptococos do grupo A. Os trabalhos de Sanders (12), Crowe & Sanders (3) e Sanders et alii (13) demonstraram concordância no que diz respeito à inibição de *S. pyogenes* por estreptococos habitantes normais do trato respiratório superior, embora os citados autores não tenham especificado quais as espécies envolvidas. Sanders et alii (14) demonstraram, ainda que a presença desses microrganismos indígenas confere ao seu portador maior resistência contra infecções provocadas por aquela bactéria.

Sabendo-se que *S. pyogenes* não é habitante normal da cavidade bucal e analisando os resultados de Tagg & Russell (19), Dempster & Tagg (4), Sanders & Sanders (15), bem como os nossos, que indicaram um alto percentual de *S. salivarius* produtor de bacteriocinas contra aquele patógeno,

podemos extrapolar que, entre os eventuais fatores que dificultam o estabelecimento de *S. pyogenes* na cavidade bucal, a atividade de bacteriocinogênica de *S. salivarius* pode ser um componente importante. Esta possibilidade, merece portanto maiores investigações, já que as amigdalites e faringites estreptocócicas, além de sua relativa freqüência, podem gerar complicações como sinusite, otite, pneumonia, febre reumática e outros processos.

No caso de *A. viscosus*, 72,9% das cepas de *S. salivarius* testadas revelaram-se inibitórias. Analisando a Tabela 1, verificamos que as mesmas não apresentaram idêntica sensibilidade à atividade bacteriocinogênica de *S. salivarius*. Observamos ainda que, das 48 cepas testadas, 22 (45,8%) manifestaram ação contra todas as quatro indicadoras de *A. viscosus*; 12 (25,0%) agiram contra três delas; sete (14,5%), contra duas cepas; duas (4,1%) manifestaram ação sobre apenas uma cepa de *A. viscosus* e cinco (10,4%) não exerceram qualquer inibição em nenhuma das quatro indicadoras.

Assim nossos resultados concordam com os de Tagg & Russell (19) e Dempster & Tagg (4), que também detectaram considerável sensibilidade de *A. viscosus* frente a substâncias semelhantes à bacteriocina produzidas por *S. Salivarius*. Weerkamp et alii (20), no entanto, observaram apenas 10% das cepas de *S. salivarius* com atividade bacteriocinogênica parcial contra este microrganismo filamentoso.

Em relação a *S. aureus*, nossos dados demonstraram inexistência de antagonismo por parte de *S. salivarius*, visto que, em nenhuma das oportunidades, houve inibição do desenvolvimento da referida bactéria. Tais resultados, em concordância com os de Weerkamp et alii (20), Tagg & Russell (19), Dempster & Tagg (4) e Sanders & Sanders (15), nos levam a considerar as possíveis interações entre esses dois microrganismos "in vivo". Assim sendo, nota-se que um dos mais numerosos microrganismos indígenas da mucosa bucal não oferece resistência à implantação de *S. aureus*, o que nos leva a relacionar nossos resultados com as observações de Knighton (8) e Zelante et alii (21), que demonstraram a elevada freqüência com que *S. aureus* é isolado da cavidade bucal.

Quanto a *S. mutans*, observamos que apenas quatro ceps (8,3%) de *S. salivarius* manifestaram ação inibitória. Estes resultados concordam com os de Weerkamp et alii (20), Tagg & Russell (19) e Dempster & Tagg (4). Apesar de os nichos preferenciais destas duas espécies serem diferentes, as bacteriocinas de *S. salivarius* demonstraram

não ser fator limitante para o desenvolvimento de *S. mutans*, um dos principais componentes da placa dental cariogênica.

De forma semelhante, os nossos resultados em relação a *S. sanguis* I evidenciaram que apenas duas cepas (4,1%) de *S. salivarius* foram capazes de inibi-lo. Estes resultados discordam dos obtidos por Weerkamp et alii (20), Tagg & Russell (19) e Dempster & Tagg (4) Russell & Tagg (10) por outro lado, observaram relativa ação bacteriocinogênica de *S. salivares* contra *S. sanguis*, porém somente com a adição de sacarose ao meio de cultura.

Em vista da discordância de resultados, podemos citar Holmberg & Hallander (7) que, utilizando quatro variações em técnicas de estudo de antagonismo, observaram que, para cada microrganismo testado, as técnicas mais adequadas eram diferentes. Estes dados refletem que a produção e a sensibilidade à bacteriocina dependem tanto da constituição dos meios de cultivo, como também das características individuais dos microrganismos. Quanto a este último aspecto, é bem elucidativo o comportamento da cepa *S. epidermidis* T-18 utilizada por Tagg & Bannister (16) e Tagg & Russell (19), como indicadora da produção de bacteriocinas, por apresentar particular sensibilidade a bacteriocinas estreptocócicas. Nesta mesma linha de raciocínio, os nossos resultados revelaram que, mesmo empregando condições de cultivo padronizadas, as características individuais podem ser destacadas.

A verificação do espectro de ação das bacteriocinas produzidas por *S. salivarius* revelou, entre as 48 cepas estudadas, 22 padrões diferentes, o que deixa claro a complexidade da população microbiana bucal demonstrando a existência de maior diversidade do que identidade entre as cepas. Tagg et alii (18) também detectaram variabilidade de comportamento, tendo constatado 13 tipos diferentes de *S. salivarius* isolados de saliva de estudantes. Considerando os nichos por nós estudados, mucosa lingual e jugal, 6 padrões bacteriocinogênicos (7560, 0160, 7500, 7540, 6540, 6560) foram concomitantemente encontrados nas duas áreas consideradas, apesar das características anatômicas peculiares de cada uma.

Quando consideramos os diferentes comportamentos, levando em conta a atividade bacteriocinogênica apenas contra espécies, reduzimos o número de 23 para 9 padrões, observando que 68,7% das cepas apresentaram o padrão 54. Sob esta análise, demonstramos que, quando do isolamento de uma cepa de *S. salivarius*, a possibilidade de pro-

dução de bacteriocinas contra *S. pyogenes*, *R. dentocariosa* e *A. viscosus* é elevada, sendo extremamente baixa contra *S. sanguis*, *S. mutans* e *S. aureus*, quaisquer que sejam as variações de tipos.

No entanto, tendo em vista o potencial inhibitório de *S. salivarius*, consideramos relevante a interação entre esses microorganismos na prevenção de infecções bucais e respiratórios.

SUMMARY

Bacteriocin like-substances production by *Streptococcus salivarius* against oral bacteria.

Samples of tongue and bucal mucosa surfaces were obtained from six healthy subjects with the purpose of isolating *S. salivarius*. It was verified that 47 out of 48 *S. salivarius* strains produced bacteriocin-like substances against at least one of the indicator species: *Actinomyces viscosus*, *Rothia dentocariosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. The method employed to test for bacteriocin production was that of deferred antagonism. The results showed that there was a high antagonism against *R. dentocariosa*, *S. pyogenes* and *A. viscosus*; extremely low against *S. mutans* and *S. sanguis* and no inhibition for *S. aureus*.

Key Words: *Streptococcus salivarius*, bacteriocin.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Al-Jamaili, I.J. — Bacteriocine typing of *Proteus*. *J. Clin. Pathol.*, 28: 784, 1975.
- 2- Azevedo, R.V.P.; Zelante, F. & Ito, I.Y. — Detecção de cepas de *Streptococcus mutans* produtoras de substâncias semelhantes à bacteriocina (mutacina). *Rev. Fac. Odont. Rib. Preto*, 22: 69-74, 1985.
- 3- Crowe, C.C. & Sanders, W.E. Jr. — Bacterial interference II. Role of the normal throat flora in prevention of colonization by Group A *Streptococcus*. *J. Infect. Dis.*, 128: 527-532, 1973.
- 4- Dempster, R.P. & Tagg, J.R. — The production of bacteriocin-like substances by the oral bacterium *Streptococcus salivarius*. *Arch. Oral Biol.*, 27: 151-157, 1982.
- 5- Hamada, S. & Ooshima, T. — Inhibitory spectrum of a bacteriocin-like substance (mutacin) produced by some strains of *Streptococcus mutans*. *J. Dent. Res.*, 54: 140-145, 1975.
- 6- Hardie, J.M. & Bowden, G.H. — Physiological classification of oral viridans streptococci. *J. Dent. Res.*, 55: (Special issue A); 166-176, 1976.
- 7- Holmberg, K. & Hallander, H.O. — Interference between gram-positive microorganisms in dental plaque. *J. Dent. Res.*, 51: 588-595, 1972.
- 8- Jacob, F.; Lwoff, A.; Siminovitch, A. & Wollman, E. — Définition de quelques termes relatifs à la lysogénie. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, 84: 222-224, 1953.
- 9- Knighton, H.T. — Coagulase positive staphylococci in oral and nasal areas of dental students: a four year study. *J. Dent. Res.*, 44: 467-470, 1965.
- 10- Russell, C. & Tagg, J.P. — Role of bacteriocin during plaque formation by *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus sanguis* on a tooth in an artificial mouth. *J. Appl. Bacteriol.*, 50: 305-313, 1981.
- 11- Rutter, R.R.; Ruefenacht, W.G.; Chamberlain, C.R.; Thomassen, P.R.; Rose, M. & Scrivener, C.A. — The principle of bacterial antagonism applied as an aid in the reduction of dental caries. *J. Dent. Res.*, 40: 1112-1115, 1961.
- 12- Sanders, E. — Bacterial interference. I. Its occurrence among the respiratory tract of flora characterization of inhibition of group A streptococci by viridans streptococci. *J. Infect. Dis.*, 120: 698-707, 1969.
- 13- Sanders, C.C.; Nelson, G.E. & Sanders, W.E. Jr. — Bacterial interference. IV. Epidemiological determinants of the antagonistic activity of the normal throat flora against group A streptococci. *Infect. Immun.*, 16: 599-603, 1977.
- 14- Sanders, C.C.; Sanders, W.E. Jr. & Harrowe, D.J. — Bacterial interference: Effects of oral antibiotics on the normal throat flora and its ability to interfere with group A streptococci. *Infect. Immun.*, 13: 808-812, 1976.
- 15- Sanders, C.C. & Sanders, W.E. Jr. — Enocin: an antibiotic produced by *Streptococcus salivarius* that may contribute to protection against infections due to group A streptococci. *J. Infect. Dis.*, 146: 683-690, 1982.
- 16- Tagg, J.R. & Bannister, L.V. — "Fingerprint" B-haemolysis streptococci by their production of and sensitivity to bacteriocin-like inhibitors. *J. Med. Microbiol.*, 12: 397-411, 1979.
- 17- Tagg, J.R.; Dajani, A.S.; Wannamaker, L.W. — Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 40: 722-756, 1976.
- 18- Tagg, J.R.; Pybus, V. & Philips, L.V. — Application of inhibitor typing in a study of the transmission and retention in the human mouth of the bacterium *Streptococcus salivarius*. *Arch. Oral Biol.*, 28: 911-915, 1983.
- 19- Tagg, J.R. & Russel, C. — Bacteriocin production by *Streptococcus salivarius* strains. *P. Can. J. Microbiol.*, 27: 918-923, 1981.
- 20- Weerkamp, A.; Vogels, G. D. & Skotnicki, M. — Antagonistic substances produced by streptococci from human dental plaque and their significance in plaque ecology. *Caries Res.*, 11: 245-256, 1977.
- 21- Zelante, F.; Aschar, H.; Piochi, B.J.A. & Alves, M.P. — Observação sobre o padrão fágico de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas da boca e do nariz de indivíduos saudáveis. *Rev. Saúde Pública*, 17: 123-129, 1983.

Recebido para publicação em 4/03/90

OBSERVAÇÕES PRELIMINARES SOBRE A SENSIBILIDADE "IN VITRO" DE AMOSTRAS DE *MYCOPLASMA E ACHOLEPLASMA* DE ORIGEM BOVINA

Maíra Halfen Teixeira Liberal¹
Ernest Boughton²

RESUMO

Testes de sensibilidade a antibióticos foram realizados "in vitro" em 10 amostras de *Mycoplasma* e em 8 amostras de *Acholeplasma*, isoladas de material bovino, utilizando-se discos impregnados comprados no comércio. Gentamicina, clindamicina, lincomicina, netilmicina, cloranfenicol, nitrofurantoína, norfloxacina e tetraciclina se mostraram efetivos contra os dois gêneros de *Mycoplasmatales* estudados. Todas as amostras de *Mycoplasma* foram resistentes à rifampicina, enquanto todas as amostras de *Acholeplasma* foram sensíveis. Por outro lado, todas as amostras de *Acholeplasma* foram sensíveis, enquanto apenas 10% das amostras de *Mycoplasma* foram sensíveis à eritromicina. Porém, os resultados obtidos não são definitivos, já que não foram determinados os halos de sensibilidade / resistência, para cada antibiótico. Para tal, determinações do MIC (minimum inhibitory concentration) e MMC (minimum micoplasmacidal concentration) devem ser realizadas, para cada amostra em questão, levando-se em consideração também a difusibilidade de cada antimicrobiano, no meio de cultivo utilizado (meio E).

Palavras chave: *Mycoplasma, Acholeplasma, sensibilidade a antibióticos.*

INTRODUÇÃO

A propriedade que distingue a classe *Mollicutes* das Eubacterias é a ausência de uma parede celular definida, o que lhe confere algumas características próprias. Os representantes dos *Mollicutes* são incapazes de sintetizar peptidoglican e seus precursores, apresentando, por consequência, resistência à penicilina e a seus análogos que agem como inibidores da síntese da parede celular (7).

Existe muito pouca informação na literatura, à respeito de pesquisas realizadas visando o conhecimento da sensibilidade de *Mycoplasmatales* aos antibióticos (2, 3, 4), uma vez que esses organi-

mos são de difícil isolamento e manutenção, e requerem meios de cultivo específico para a realização das provas de sensibilidade.

Esta pesquisa teve por objetivo principal conhecer a sensibilidade "in vitro" de amostras isoladas de bovinos, frente a drogas antibacterianas, para posterior direcionamento da escolha terapêutica mais adequada, quando infecções por *Mycoplasmatales* forem diagnosticadas em rebanhos bovinos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de *Mycoplasmatales* - as amostras

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

2 Central Veterinary Laboratory, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food - MAFF, New Haw, Weybridge, KT15 3NB Surrey, Inglaterra

utilizadas para realização das provas de sensibilidade foram isoladas de material clínico de bovinos. As amostras designadas "BR" foram isoladas no Brasil (5); as de inicial "NCTC" são amostras padrão do National Culture Tissue Collection, Inglaterra; as outras amostras com iniciais "B" e "M" precedidas e seguidas por números pertencem ao Central Veterinary Laboratory Culture Collection, Inglaterra, e foram gentilmente cedidas para essa pesquisa.

Amostras de *Mycoplasma* — *M. bovis* (OB 823; 8B 70; BR 17; BR 69; BR 72; BR 137); *M. bovirhinis* (9M 1019; 7B 10); *M. bovoculi* (M 165/69); *M. dispar* (NCTC 10125).

Amostras de *Acholeplasma* — *A. laidlawii* (8M 2713; 8M 1661; BR 56; BR 84; BR 93; BR 110); *A. axanthum* (3B 256); *A. oculi* (NCTC 10150).

Antibacterianos testados — foram utilizados discos impregnados com antibiótico, obtidos no comércio, nas concentrações a seguir: amicacina (AM = 30 µg); ampicilina (AP = 10 µg); carbenicilina (CR = 100 µg); cefalexina (CN = 30 µg);cefalotina (CF = 30 µg); cefazolina (CZ = 30 µg); cefotaxime (CT = 30 µg); cefoxitina (CX = 30 µg); ceftriaxone (R = 30 µg); clindamicina (CI = 2 µg); cloranfenicol (CO = 30 µg); eritromicina (EI = 15 µg); fosfomicina (FO = 50 µg); gentamicina (GN = 10 µg); kanamicina (KN = 30 µg); lincomicina (LI = 15 µg); ácido nalidíxico (AN = 30 µg); netilmicina (NET = 30 µg); nitrofurantoína (NT = 300 µg); norfloxacina (FX = 10 µg); oxacilina (OX = 5 µg); penicilina (PN = 10 µg); ácido piperídico (PP = 20 µg); rifampicina (RI = 30 µg); sisomicina (S = 10 µg); sulfazotrim (SFT = 25 µg); sulfonamida (SF = 300 µg); tetraciclina (TT = 30 µg); tobramicina (TB = 10 µg); e vancomicina (VC = 30 µg).

Teste de sensibilidade - as amostras de *Mycoplasmatales* foram propagadas em meio E líquido (6) por 24 a 48 horas a 37°C, em estufa bacteriológica. Para realização do teste de sensibilidade propriamente dito, a técnica descrita por Bauer et al. (1) foi adaptada sendo utilizado o meio E sólido, omitindo-se do mesmo a penicilina e o vermelho de fenol. As placas semeadas com as amostras e contendo os antibióticos em teste foram incubadas em estufa automaticamente suplementada por 5% de CO₂, sendo a observação realizada com 24 ou 48 horas, dependendo da espécie

de *Mycoplasmatales* analisada. Os resultados foram interpretados em relação ao diâmetro da zona de inibição de crescimento encontrado. Os testes de sensibilidade foram realizados desconhecendo-se a difusibilidade de cada antibiótico no meio E. A necessidade da utilização de CO₂ para crescimento de algumas espécies de *Mycoplasmatales*, pode ter influenciado a atividade de algumas drogas empregadas (exemplo: tetraciclina, estreptomicina e kanamicina).

Interpretação dos resultados - para se avaliar corretamente a ação de cada droga utilizada no estudo, sobre as diferentes espécies de *Mycoplasmatales*, seria necessário estabelecer o MIC (minimum inhibitory concentration) e o MMC (minimum mycoplasmacidal concentration). Porém como ainda não existe uma tabela padrão de leitura da sensibilidade a antibióticos para *Mycoplasmatales*, e o presente trabalho pretendeu realizar um estudo preliminar sobre a sensibilidade "in vitro" desses microrganismos, frente as drogas disponíveis no mercado, foi adotado um esquema arbitrário de interpretação dos resultados, como se segue:

Sensível = quando a zona de inibição era igual ou superior a 10 mm de diâmetro.

Intermediário = quando a zona de inibição era inferior a 10 mm de diâmetro.

Resistente = quando não havia zona de inibição alguma.

RESULTADOS

Um total de 540 testes de sensibilidade foi realizado com 18 amostras de *Mycoplasmatales*, pertencentes aos gêneros *Mycoplasma* (10 amostras) e *Acholeplasma* (8 amostras), frente à drogas antibacterianas testadas.

Levando-se em consideração a interpretação dos resultados arbitrariamente definida na metodologia da pesquisa pelos autores, os resultados obtidos para cada espécie de *Mycoplasmatales* testada estão apresentados nos Quadros 1 e 2.

Seguindo o esquema utilizado, a leitura dos testes evidenciou que as espécies de *Mycoplasma* e *Acholeplasma* se mostraram 100% sensíveis a clindamicina, cloranfenicol, gentamicina, lincomicina, netilmicina, nitrofurantoína, norfloxacina e tetraciclina. Quanto à rifampicina os resultados obtidos demonstraram 100% de sensibilidade para as espécies de *Acholeplasma* e 100% de resistência para as espécies de *Mycoplasma*; e para eritromicina ocorreu 100% de sensibilidade para

QUADRO 1: Sensibilidade "in vitro" de amostras de *Mycoplasmataceae* a 30 drogas antibacterianas*.

Espécie	Droga Amostra	AM	AP	CR	CN	CF	CZ	CT	CX	R	CI	CO	EI	FO	GN	KN	LI	AN	NET	NT	FX	OX	PN	PP	RI	S	SFT	SF	TT	TB	VC
<i>Mycoplasma bovis</i>	OB 823	I	R	R	R	R	R	S	S	R	I	I	S	R	I	R	I	S	I	R	R	R	R	R	R	S	R	R			
	8B 70	I	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	I	I	S	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R			
	BR 69	I	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	I	I	S	R	I	S	I	R	R	R	R	R	R	S	R	R			
	BR 137	I	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S	I	I	R	I	S	S	R	R	R	R	S	R	R			
	BR 17	I	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S	I	S	R	S	I	R	R	R	R	R	S	R	R			
	BR 72	I	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	I	S	S	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R			
<i>M. bovirhinis</i>	9M 1019	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	I	I	I	I	I	I	I	I	R	R	R	R	R	S	R	R			
	7B 10	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	I	I	I	I	I	I	I	R	R	R	R	R	R	S	R	R		
<i>M. bovoculi</i>	M165/69	S	R	R	R	R	R	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
<i>M. dispar</i>	NCTC 10 125	I	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	I	I	S	R	I	S	I	R	I	I	I	R	I	I	R	S	R	

* Ver abreviaturas no texto

S = sensível

I = intermédio

R = resistente

QUADRO 2: Sensibilidade "in vitro" de amostras de *Acholeplasmataceae* a 30 drogas antibacterianas*.

Espécie	Droga Amostra	AM	AP	CR	CN	CF	CZ	CT	CX	R	CI	CO	EI	FO	GN	KN	LI	AN	NET	NT	FX	OX	PN	PP	RI	S	SFT	SF	TT	TB	VC
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	8M 2713	I	R	R	R	R	R	R	S	S	R	I	I	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R			
	8M 1661	I	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	I	I	S	R	I	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R				
	BR 56	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	I	I	S	R	I	S	S	R	R	S	R	R	S	R	R				
	BR 84	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	I	I	S	R	I	S	S	R	R	S	R	R	S	R	R				
	BR 93	I	R	R	R	R	R	R	S	S	R	I	I	S	R	I	S	S	R	R	S	R	S	R	S	R	R				
	BR 110	I	R	R	R	R	R	R	S	S	R	I	S	R	I	S	I	S	R	R	S	R	R	S	R	S	R				
<i>A. axanthum</i>	3B 256	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S	I	R	R	S	R	S	R	S	R	R			
<i>A. oculi</i>	NCTC 10150	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S	I	R	I	S	R	I	R	S	R	I	R	S	R	R				

* Ver abreviaturas no texto

S = sensível

I = intermédio

R = resistente

Acholeplasma e apenas 10% de sensibilidade para *Mycoplasma*. Para kanamicina e amicacina os resultados apresentados foram variáveis, sendo demonstrado 100% e 87,5% de sensibilidade para *Mycoplasma* e *Acholeplasma* respectivamente, em relação a kanamicina; e 80% e 100% de sensibilidade para *Mycoplasma* e *Acholeplasma* respectivamente, em relação a amicacina.

DISCUSSÃO

A pesquisa desenvolvida forneceu resultados preliminares que deverão ser ampliados, determinando-se os halos de inibição específicos para resistência e sensibilidade, para cada droga antimicrobiana em relação a cada espécie de *Mycoplasmatales*, através da determinação de MIC e MMC. Também deverá ser complementado por um estudo da difusibilidade dos antibióticos no meio E sólido, além do tempo de incubação e da ação do CO₂ sobre as drogas utilizadas.

No estudo foram incluídas também drogas beta-lactâmicas, que por atuarem como inibidoras da síntese da parede celular dos microrganismos, são tidas como não eficazes sobre *Mycoplasmatales*. Essas drogas são incorporadas aos meios de cultivo utilizados para isolamento de *Mycoplasmatales*, e o presente trabalho mostrou que elas aparentemente não causam problemas no crescimento "in vitro" desse grupo de microrganismos.

É necessário para enriquecer esse estudo, a implantação nos laboratórios de pesquisas nacionais, da infra-estrutura própria para os trabalhos de isolamento e identificação de *Mycoplasmatales*, e da determinação do MIC e MMC para realização de testes de sensibilidade a antimicrobianos em todas as amostras isoladas e classificadas. Deste modo poder-se-á num futuro próximo, escolher os antibióticos que melhor se adequarem a terapêutica a ser utilizada, dependendo da sintomatologia clínica do animal enfermo. Drogas como norfloxacin e nitrofurantoína, de ação eletiva no trato urinário, não parecem próprias para tratamento de infecções sistêmicas de bovinos, apesar de terem se mostrado eficientes "in vitro" contra os microrganismos testados. Casos de mastite bovina por *Mycoplasmatales* exigirão um procedimento terapêutico diferente do que aquele utilizado para o tratamento de artrites ou pneumonias, também provocados por esse grupo de microrganismos.

Os resultados preliminares obtidos nessa pesquisa indicaram que as drogas que exerceram efei-

tos sobre os *Mycoplasmatales* estudados, pertenciam aos seguintes grupos: 1) inibidores da síntese proteica, representados pelos aminoglicosídeos e aminociclitoes (gentamicina e netilmicina) e pela tetraciclina (tetraciclina); 2) inibidores da função ribossomica representados pelos macrolídeos e lincomídios (clindamicina e lincomicina) e pelo cloranfenicol (cloranfenicol); e 3) antimicrobianos sintéticos (nitrofurantoína e norfloxacin).

Estudos complementares para determinação do MIC e MMC são imprescindíveis, para que se possa traçar o perfil de sensibilidade das amostras de *Mycoplasmatales* isoladas na rotina dos laboratórios, que investigam infecções causadas por esse grupo de microrganismos, em animais e no Homem.

AGRADECIMENTOS

Ao The British Council e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de auxílio para desenvolvimento da pesquisa junto à University of Surrey e ao Central Veterinary Laboratory, na Inglaterra.

ABSTRACT

Preliminary Observations on "In Vitro" Sensitivity of *Mycoplasma* and *Acholeplasma* Strains of Bovine Origin

Sensitivity tests to antibiotics were carried out "in vitro" with 10 *Mycoplasma* strains and 8 *Acholeplasma* strains, isolated from bovine material, using commercially available impregnated discs. Gentamycin, clindamycin, lincomycin, netilmycin, chloramphenicol, nitrofurantoin, norfloxacin and tetracycline were the most effective against both genera of *Mycoplasmatales*. All strains of *Mycoplasma* were resistant to rifampicin, but all strains of *Acholeplasma* were sensitive. Conversely, all strains of *Acholeplasma* were sensitive to erythromycin, but only 10% of *Mycoplasma* strains were sensitive. These results are not definitive as the sensitivity/resistance zone was not determined for each drug. The MIC (minimum inhibitory concentration) and MMC (minimum mycoplasmacidal concentration) determinations are required for each strain, and will depend on the difusibility of each antibiotic in the culture medium used to perform the test (E medium).

Key words: *Mycoplasma, Acholeplasma, Antibiotic sensitivity.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M.; Sherris, J.C. & Turck, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, **45** : 493-496, 1966.
- 2 - Boughton, E. Antibiotic sensitivities of mycoplasmas. *Vet. Rec.*, **111**: 541-542, 1982.
- 3 - Braun, P.; Klein, J. O. & Kassa, E.H. Susceptibility of genital mycoplasmas to antimicrobial agents. *Appl. Microbiol.*, **19**: 62-70, 1970.
- 4 - Jao, R.L. & Finland, M. Susceptibility of *Mycoplasma pneumoniae* to 21 antibiotics "in vitro". *Am. J. Med. Sci.*, **253**: 639-650, 1967.
- 5 - Liberal, M.H.T. Detecção de rebanhos bovinos portadores de micoplasmoses através do isolamento de *Mycoplasma bovis* de exsudatos nasais de bezerros. *Rev. Microbiol.*, **20**: 292-295, 1989.
- 6 - Roberts, D.H. & Pijoan, C. Identification of *Mycoplasma hyorhinis*. *Brit. Vet. J.*, **127**: 582-586, 1971.
- 7 - Stanier, R.Y.; Ingraham, J.L.; Wheelis, M.L. & Painter, P.R. edd. General Microbiology 5 th ed. Mac Millan Education Ltd, London, pp 520-524, 1987.

Recebido para publicação em 08/12/89.

LEVANTAMENTO DA NODULAÇÃO, PERSISTÊNCIA DE HERBICIDAS E ISOLAMENTO DE *BRADYRHIZOBIUM* SP DE ÁREAS COM ROTAÇÃO CANA-DE-AÇÚCAR/AMENDOIM¹

Maria do Carmo de Salvo Soares Novo ²

Eli Sidney Lopes ^{2,3}

Manoel Carlos Azevedo Ortolan ⁴

RESUMO

Foram feitas observações de nodulação de plantas de amendoim coletadas em várias propriedades de uma região de rotação cana-de-açúcar/amendoim com uso tradicional de herbicidas. Foram efetuados bioensaios para análise de persistência dos herbicidas aplicados na cana-de-açúcar e testes de tolerância de rizóbios isolados de área com trifluralina. Observou-se 100% de plantas naturalmente noduladas, com nodulação regular a boa. A população nativa de *Bradyrhizobium* associada ao amendoim apresentou tolerância a altos níveis (pelo menos 640ppm) de trifluralina em meios de cultura. Os herbicidas empregados na cana-de-açúcar, principalmente ametrina, apresentaram longa persistência e, consequentemente, podem apresentar efeitos fitotóxicos em cultura subsequente suscetível.

Palavras chaves: *Bradyrhizobium*; herbicidas, rotação de culturas, cana-de-açúcar; amendoim.

INTRODUÇÃO

A região de Ribeirão Preto está se tornando a maior produtora de "amendoim das águas" no Estado devido a conveniência do seu cultivo em rotação com a cana, por ocasião da renovação dessa lavoura. Com um ciclo de cerca de 115 dias, o amendoim aproveita o fertilizante residual da cana, sofre menor ataque de pragas e doenças apresentando produtividade média de 1800kg/ha.

Por outro lado a cana se beneficia da fixação biológica do nitrogênio do amendoim. Nesse sistema é comum o uso de herbicidas de longo poder residual para as canas-planta e soca. A maioria dos

agricultores evita aplicar esses produtos após último corte da cana, visto que poderão ser fitotóxicos ao amendoim; entretanto, problemas de fitotoxicidade já foram observados.

Dentre os fatores que podem influenciar o processo da fixação biológica do N₂, os defensivos podem ter efeitos prejudiciais ou benéficos dependendo da natureza dos mesmos, do tipo de solo, da estirpe de rizóbio da planta. Embora pareça que os herbicidas não venham apresentando sérios problemas para a fixação biológica do N₂, é possível que com uso intensivo do produto em lavouras com rotação cana/amendoim, eles possam apresentar problemas. Estudos dessa natureza tem sido en-

1. Projeto financiado pela Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia do Estado de São Paulo. Convênio FUNDE-PAG/IAC.
2. Pesquisadores Científicos, Instituto Agronômico, Seção de Microbiologia do Solo; Caixa Postal 28, CEP 13001 — Campinas, SP.
3. Bolsista do CNPq
4. Departamento Técnico, Canaóeste, Caixa Postal 142, CEP 14160, Sertãozinho, SP

faticamente recomendados (3). Cabe observar que apesar da inoculação de sementes não ser uma prática comum no plantio do amendoim, no geral os agricultores também não aplicam adubos nitrogenados. A contribuição da fixação pela nodulação espontânea supre a demanda de N dos níveis atuais de produtividade. Num levantamento realizado anteriormente nessa leguminosa foi observado que em média, apenas cerca de 10kg N/ha eram utilizados. A nodulação natural tem sido observada em praticamente 100% das plantas amostradas.

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de verificar se em lavouras com rotação cana-de-açúcar/amendoim e onde se aplicava herbicida na cana, aqueles produtos persistiam até o plantio do amendoim; objetivou também analisar a nodulação espontânea do amendoim, isolar *Bradyrhizobium* spp. e verificar sua tolerância a trifluralina.

MATERIAL E MÉTODO

Foram feitas observações de nodulação e/ou da persistência de herbicidas em amostras coletadas nos municípios de Sertãozinho e Dumond, SP, em onze propriedades enumeradas onde haviam sido utilizados herbicidas conforme indicado: 1. Sítio Recreio - ametrina + 2,4-D amina-2,30 + 1,50 kg/ha; 2. Sítio Água Vermelha - ametrina + 2,4-D amina, 2,30 + 1,50 kg/ha; 3. Sítio Santo Antônio ametrina 2,00kg/ha; 4. Fazenda Palmeiras-ametrina + 2,4-D amina - 2,00 + 0,90kg/ha; 5. Fazenda Boa Esperança ametrina 2,10kg/ha; 6. Fazenda Santa Maria - ametrina 3,34kg/ha; 7. Fazenda Nossa Senhora Aparecida - ametrina + 2,4 - D amina 2,34 + 1,20kg/ha; 8 - Fazenda Palmital diuron + 2,4 - D amina 1,75 + 0,90kg/ha; 9 - Fazenda São Luiz - hexazinona + 2,4 - D amina 1,75 + 0,90kg/ha. As propriedades de número 10 e 11, (Sítios Boa Fé e Pati) não foram amostrados por ocasião da reforma do canavial.

Análise de atividade e do efeito da Trifluralina no amendoim.

Esse estudo foi feito em amostras de solo dos locais 1, 2, 9, 10, coletadas antes da aplicação da trifluralina (0,93kg/ha) e imediatamente após a sua incorporação. As amostragens de solo foram compostas de 3 sub-amostras retiradas a profundidade de 0-20cm. Solo adjacente as lavouras, sem aplicação deliberada de herbicida, foi amostrado para controle.

Para análise da atividade do herbicida (persis-

tância), os métodos biológicos de Santelmann modificado (12) e Parker (9) foram aplicados assim que as amostras chegaram ao laboratório (1 dia após a coleta). Para o primeiro método usou-se a soja (*Glycine max* cv. Foscarin) como planta indicadora. O plantio foi feito em copos plásticos com 300g de solo; após a germinação as plantas foram mantidas em casa de vegetação. A colheita foi feita 24 dias após o plantio, cortando-se as plantas a altura do colo e determinando-se a produção de matéria fresca da parte aérea. Para o segundo método, 100g da amostra de solo foram colocadas em placas de Petri com 9mm de diâmetro interno, distribuindo-se sementes pré-germinadas de sorgo (*Sorghum vulgare* L.) em linha na parte superior da placa, e incubando-se a 28°C por 72 horas, quando então foram feitas medições do comprimento das raízes.

Levantamento da nodulação

As coletas de plantas para observação da nodulação foram feitas em duas etapas. A primeira, nos locais nºs. 1, 2, 9 e 10, em 12/12/85 e a segunda nos restantes, exceto os locais 3 e 4. Cada coleta foi feita com quatro repetições, sendo amostradas cinco plantas seguidas, de uma mesma linha, numa área com cerca de 2000 m², representativa da cultura. A nodulação foi avaliada "in situ" pelo critério de notas (baixa: 0 a 1, regular 1,1 a 2; boa 2,1 a 3; ótima: 3 a 4), considerando-se as plantas individualmente tanto para o cálculo de percentagem de plantas noduladas, como para as notas. Para os isolamentos foram escolhidos nódulos túrgidos, de bom aspecto que foram colocados em frascos de dissecação para transporte ao laboratório (8). Para análise do efeito da trifluralina no amendoim foi feito um teste em copos plásticos utilizando-se de amostras de solo coletadas nas propriedades 1, 2, 9 e 10, logo após a aplicação da trifluralina e armazenadas por 50 dias em temperatura ambiente do laboratório. Como controle foram coletados em cada local de amostras de solo adjacentes a da cultura do amendoim, (pomares, estradas, jardim da sede), que não haviam recebido aplicações deliberadas de trifluralina. Os solos amostrados foram utilizados para inocular plântulas de amendoim, para posterior isolamento de *Bradyrhizobium* dos nódulos formados. O cultivo foi feito em vasos com mistura solo: areia (1:9) esterilizada com radiação gama (2,5 Mrads), inoculada com uma suspensão dos solos coletados. Nas raízes dessas plantas, após a retirada dos nódulos fêz-se também uma avaliação de colonização micorrízica segundo método de Phillips & Hayman (10).

Isolamento de *Bradyrhizobium* sp. tolerante a trifluralina

Os isolamentos de *Bradyrhizobium* sp. dos nódulos das plantas cultivadas nos vasos com solos foram feitos em meio de manitol-extrato de levedura (YM) sem herbicida. Os dos nódulos coletados nas propriedades onde se aplicaram herbicidas, foram feitos no mesmo meio, sem e com adição de trifluralina. Nesses casos, a mesma suspensão dos nódulos esmagados foi inoculada em triplicata em meio com 0, 10, 20, 40, 80 e 160ppm de trifluralina. Das amostras com crescimento em 160ppm foram transferidas colônias para meios com 320 e 640 ppm de trifluralina. Das outras amostras dos meios com crescimento (abaixo de 160ppm) foram transferidas colônias para meio com 160, 320 e 640ppm.

Um dos isolados proveniente de meio sem trifluralin (SMS-746) e um com tolerância comprovada a 640ppm do herbicida (SMS-747) foram inoculados em meio YM líquido, com 640ppm, com três repetições. Os frascos foram incubados a 28°C, com agitação manual periódica. Após dez dias foi efetuado contagem das bactérias pelo método de diluição e inoculação de gotas (6) em placas com meio sem herbicidas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Persistência dos herbicidas

Os dados de persistência dos herbicidas aplicados na cultura da cana-de-açúcar, observados em 9 propriedades agrícolas estão apresentados na tabela 1. Pode-se verificar que em 4 das 9 propriedades estudadas (Fazendas Palmital, São Luiz, Boa Esperança e Santa Maria), os herbicidas ainda persistiam ativos cerca de 1 ano e meio após a aplicação e portanto poderiam causar fitotoxicidade em culturas suscetíveis subsequentes a cana-de-açúcar. As doses dos herbicidas aplicados estavam nos níveis de recomendação para a cana-soca e ressoca, (4,11), conforme se observa na tabela 1. Somente na Fazenda Santa Maria, a dose do ametrina aplicada foi superior (em 31,3%) à recomendada. Entretanto, a análise residual de ametrina mostrou que, em geral, os teores estavam baixos (tabela 2). Convém notar que no Sítio Santo Antônio, onde foi constatado a maior concentração de ametrina (0,11ppm), os dados do bioensaio de persistência mostram que não houve efeito fitotóxico na soja, observando-se inclusive uma tendência de estímulo no desenvolvimento da

planta teste (tabela 1). Por outro lado, nas quatro propriedades onde se observou persistência da ametrina pelos dados do bioensaio os níveis residuais desse herbicida estavam baixos. As misturas diuron + 2,4-D amina e hexazinona + diuron, empregadas nas Fazendas São Luiz e Palmital ainda causaram efeitos fitotóxicos na planta-teste. Convém notar que Victória Filho & Camargo (15) observaram que essas misturas aplicadas em pré-emergência em cana, nas doses 0,80 + 0,45 (kg/ha) e 1,60 + 2,60 (kg/ha), respectivamente, apresentavam efeito residual somente até 100 dias após a aplicação diferindo portanto dos dados aqui obtidos, com persistência superior a 1 ano. Nos casos da aplicação de ametrina e de ametrina + 2,4-D amina (propriedades de 1 a 7), os dados de resíduos foram baixos (Tabela 2), mas os da per-

TABELA 1 - Matéria verde de soja (g/vaso) em solo coletado após cana-de-açúcar, com e sem herbicida, aos 24 dias de plantio. Média de 4 repetições.

Nome da propriedade	Solos		Variação do desenvolvimen- to em relação a testemunha ⁽¹⁾
	Sem herbicida	Com herbicida	
Sítio Recreio	3,38	3,45	+ 2,1
Sítio Água Vermelha	3,14	3,67	+ 16,9*
Sítio Santo Antônio	3,26	3,97	+ 21,8
Fazenda Palmital	4,79	3,23	- 32,6*
Fazenda São Luiz	4,64	4,07	- 12,3*
Fazenda Palmeiras	4,15	4,01	- 3,4
Fazenda Boa Esperança	4,32	3,56	- 17,6*
Fazenda Sta. Maria	4,64	3,49	- 24,8*
Fazenda N. S. Aparecida	4,03	3,72	- 7,7

(1) Nas glebas com asterisco as diferenças foram significativas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

sistência foram conflitantes (Tabela 1). As diferenças aparentemente não podem ser explicadas em base aos resultados da análise química de solo (não incluídos). As condições climáticas também eram semelhantes. Elas podem ser atribuídas às diferentes condições de aplicação nas propriedades, incluindo a regulagem de equipamento, ou mesmo a incerteza quanto a precisão das informações fornecidas pelos proprietários. O efeito fitotóxico da ametrina não era esperado, pois Victoria Filho (13) observou que na dose de 2,80 kg/ha, aquele herbicida não mais controlava plantas daninhas em cana aos 70 dias após a aplicação.

TABELA 2 - Teores de ametrina observados em amostras de solos coletadas de áreas de cultura de cana-de-açúcar feita com uso de herbicida e preparadas para plantio de amendoim em rotação.

Nome da propriedade	Variação do Desenvolvimento m		
	Solos	Equivalente de Ametrina Aplicada no solo	Resíduo de Ametrina no solo ⁽¹⁾
	ppm	ppm	
Sítio Recreio	1,15	0,01	
Sítio Água Vermelha	1,15	0,03	
Sítio Santo Antônio	1,0	0,11	
Fazenda Palmeiras	1,0	0,11	
Fazenda Boa Esperança	1,1	0,01	
Fazenda Santa Maria	1,7	0,06	
Fazenda N.S. Aparecida	1,7	0,01	

(1) Análise realizada pela Ciba Geigy, São Paulo, usando cromatografia gasosa.

Diem & Davis (2) relatam que o 2,4-D em mistura com ametrina aumenta a toxicidade da ametrina, devido ao aumento de sua absorção e translocação. Isso explicaria a fitotoxicidade observada nas amostras coletadas nas Fazendas Palmeiras e N. S. Aparecida, em níveis residuais baixos de ametrina. Convém observar entretanto que esse efeito não foi observado para as amostras dos Sítios Recreio e Água Vermelha onde a ametrina também foi aplicado em mistura com 2,4-D.

Como esperado, a atividade da trifluralina empregada nas três lavouras estava alta nas amostras retiradas logo após a sua aplicação; foram observadas inibições do sistema radicular e da parte aérea do sorgo empregado como planta teste. As raízes, mostraram maior sensibilidade, com inibições de 60 a 82% em relação ao controle sem herbicida. A inibição da parte aérea foi da ordem de 34 a 48% (Tabela 3).

Não foi constatada influência da trifluralina no desenvolvimento da parte aérea ou da raiz de amendoim cultivado em amostra de solo de quatro propriedades incubadas com esse herbicida por 50 dias. Nas amostras do Sítio Água Vermelha e da Fazenda São Luiz houve uma tendência daquele herbicida em aumentar o número de nódulos (Tabela 4) Alaa-elden et al. (1) observaram que a trifluralina, especialmente quando aplicada em dose elevada (5x a recomendada), estimulou a nodulação da soja mas reduziu a produção de vagens.

Nas raízes de amendoim, de plantas cultivadas nos solos coletado nos Sítios Recreio e Água Vermelha, a colonização micorrízica foi menor nas amostras sem a trifluralina. Entretanto, Trappe et al. (13) observaram que a trifluralina aplicada em doses variando de 1 a 9kg/ha nas espécies *Glycine max* e *Liquidambar styraciflua* diminuiu a colonização micorrízica. Nemec & Tucker (7) observaram que a colonização das raízes de citros, inocu-

TABELA 3 - Matéria verde da parte aérea (g/vaso) e comprimento do sistema radicular do sorgo (cm), de plantas cultivadas em solo amostrado repetições antes e após a aplicação de trifluralina. Médias de quatro.

LOCAIS	Mat. verde da parte aérea			Comp. do sistema radicular		
	SOLOS			SOLOS		
	Sem trif.	Com trif.	Efeito da trifluralina (1)	Sem trif.	Com trif.	Efeito da trifluralina ⁽¹⁾
Sítio Água Vermelha	1,61	1,07	- 33,5*	6,8	2,7	- 60,3*
Sítio Recreio	1,19	0,61	- 48,7*	7,4	2,0	- 70,3*
Sítio Boa Fé	0,94	0,51	- 45,7*	6,7	1,2	- 82,0*

(1) Números com asteriscos indicam que os efeitos foram significativos.

TABELA 4 - Matéria seca da parte aérea (g) e de raízes (g), número de nódulos e colonização micorrízica (%), observados aos 62 dias em amendoim cultivado em copos plásticos, com solo coletado antes e depois da aplicação de trifluralina a campo. Média de quatro repetições (3 copos por repetição).

Nome da propriedade ⁽¹⁾	Matéria seca			Colonização micorrízica das raízes
	Parte aérea	Raízes	Nódulos	
	g	nº	%	
Sítio Recreio	CT	4,62	3,03	11,4
	ST	4,17	2,45	12,2
Sítio Água Vermelha	CT	4,91	2,81	11,1
	ST	4,61	2,62	21,3
Fazenda São Luiz	CT	5,51	3,81	28,4
	ST	5,42	3,15	52,8
Sítio Boa Fé	CT	4,63	2,74	25,9
	ST	5,01	2,81	28,8

(1) CT = com trifluralina; ST = sem trifluralina.

lado com MVA, cultivado em vasos com solo que recebeu trifluralina nas doses 2,2, 4,5 e 9,0kg/ha não diferiu significativamente do controle sem o herbicida.

Levantamentos da nodulação e coleta de nódulos para isolamentos.

Todas as plantas coletadas estavam noduladas (100% de nodulação) e a nodulação esteve entre regular e boa pelo critério adotado.

Das quatro propriedades que apresentaram sintomas de fitotoxicidade (Tabela 1), a Fazenda São Luiz apresentou nodulação regular (nota de 0 a 2), mas as outras três (Fazenda Boa Esperança, Palmital e Santa Maria) apresentaram nodulação boa (nota de 2 a 3). Esses menores índices não devem entretanto ser associados a efeitos fitotóxicos dos herbicidas, mesmo porque em algumas propriedades onde efeitos fitotóxicos não foram observados, a nodulação esteve também regular (Sítios Boa Fé e Pati).

Nas plantas inoculadas com solo coletado de áreas sem herbicidas, só houve formação de nódulos quando o solo-inóculo foi coletado no Sítios Água Vermelha, Recreio e Boa Fé, e na Fazenda Palmeiras. As áreas de onde essas amostras foram coletadas não são cultivadas (área de sede, estradas, pomares), apresentam poucas legumino-

sas nativas e, portanto, devem apresentar baixa população de rizóbios nativos.

Isolamento e teste de tolerância de *Bradyrhizobium sp.* a trifluralina. — Foram isoladas 63 estirpes de *Bradyrhizobium* sp. das diversas lavouras, sendo que 32 delas eram tolerantes a 640ppm de trifluralina. Os resultados obtidos neste teste preliminar, sugerem que a população de *Bradyrhizobium* associada naturalmente com o amendoim cultivado em áreas com uso intensivo de herbicida apresentam, no geral, alto grau de tolerância àquele herbicida. Não houve crescimento de prováveis rizóbios nas tentativas de isolamento. Nas amostras coletadas na Fazenda Nossa Senhora Aparecida só foi notado crescimento de prováveis rizóbios nas placas com 20 ppm de trifluralina, quando essa colônia foi transferida para placas com concentrações mais elevadas (160 ppm e acima) não houve crescimento. As colônias isoladas à 20 ppm de trifluralina foram entretanto perdidas e não se pode dar continuidade aos testes que seriam desejáveis.

Os resultados das contagens dos números de *Bradyrhizobium* das estirpes SMS-746 e SMS-747, originalmente isoladas de meio sem trifluralina e de meio com 640ppm do herbicida, respectivamente observados após incubação das mesmas por 10 dias em meio líquido, sem e com dois níveis de trifluralina estão apresentados na tabela 5. A diminuição da população de bactérias devida a trifluralina foi semelhante, para as duas estirpes. Esse resultado sugere que parece haver na população nativa de *Rhizobium*, estirpes naturalmente tolerantes a elevada concentrações de trifluralina.

Concluindo podemos afirmar que: a) dentre os herbicidas comumente aplicados na cana-de-açúcar, a triazina ametrina e as misturas diuron + 2,4-D amina e hexazinona + diuron, foram os mais persistentes, podendo causar efeitos fitotóxicos em culturas suscetíveis subsequentes; b) não foi observada influência da trifluralina no peso da matéria seca das raízes e das partes aérea e nem na nodulação espontânea de plantas de amendoim cultivado em solo coletado no campo com e sem trifluralina e armazenado por 50 dias; c) a população nativa de *Bradyrhizobium* que nodula o amendoim na região de Ribeirão Preto apresenta estirpes com elevado grau de tolerância natural a trifluralina. e d) a nodulação espontânea de amendoim cultivado em rotação com cana-de-açúcar em área com uso intensivo de herbicidas nas duas culturas apresentou-se de regular a boa, com nodulação em 100% das plantas.

TABELA 5 - Número médio unidades formadoras de colônias (UFC) de *Bradyrhizobium* da população dos isolados observados em meio líquido com 3 níveis de trifluralina. Média de 3 repetições.

Estirpe ⁽¹⁾	Trifluralina em meio líquido	UFC/Bactérias/ML de meio
	PPM	NX x 10 ⁸
SMS-746	0	7,38
	160	2,79
	640	3,53
SMS-747	0	7,13
	160	1,68
	640	2,71

(1) Ambas isoladas do Sítio Água Vermelha; SMS-746, isolada em meio sem trifluralina; SMS-747, isolada em meio com 640 ppm de trifluralina.

SUMMARY

Spontaneous nodulation, isolation of rhizobia and persistence of herbicides in area of sugar cane/peanut rotations

Spontaneous nodulation of peanut plants cultivated in rotation with sugar cane was studied in several farms in which herbicides are traditionally used. Bioassays were carried out to test sugar cane herbicides persistence, and tolerance of rhizobia isolated from soils where trifluralin had been applied. It was observed that hundred percent of the plants were naturally nodulated with regular to good nodulation. Native *Bradyrhizobium* associated to peanut presented high tolerance to trifluralin (at least to 640ppm) in culture medium. Herbicides which are used in sugar cane, mainly ametryne, showed high persistence and, consequently, can show phytotoxic effects on subsequent susceptible crops.

Key words: *Bradyrhizobium*, herbicides, crop rotation, sugar-cane, peanuts.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alaa-Elden, M.N.; Mammound, S.A.Z.; Makawi, A; Abd-el-Nasser, M.; Merzallan, N.A. — Effect of pre-emergence application of some herbicides on nodulation, nitrogen fixation and growth of soybean (*Glycine max*) *Pesq. agropec. bras.*, 16: 833-839, 1981.
- Diem, J.R. & Davis, D.E. Effect of 2,4-D on ametryne-toxicity *Weed Sci.*, 22: 285-292, 1984.
- Estados Unidos — Departamento de agricultura. Grupo de Estudos sobre a Agricultura Orgânica. Relatório e recomendação sobre agricultura orgânica. Brasília, CNPq/ Coordenação Editorial, 1984. 28p.
- Forster, R. & Alves, A. — Herbicidas: Como controlar as ervas da daninhas. *Granja*, 447: 26-79, 1985.
- Giardini, A.R.; Lopes, E.S. & Lasca, D.H.C. — Levantamento da nodulação natural em cultivos comerciais de amendoim *Arachis hypogaea* L. Reunion Latinoamericana de *Rhizobium*, XI, Lima, Memórias. 1982, p. 239-240.
- Miles, A.A. & Misra, S.S. — The estimation of the bactericidal power of blood. *J. Hyg.*, 38: 732-749, 1938.
- Neme, S. & Tucker, D.P.H. — Effects of herbicides on endomycorrhizal fungi in Florida citrus (*Citrus spp.*) soils. *Weed Sci.*, 31: 427-431, 1983.
- Norris, D.O. — Technique used in work with *Rhizobium*. In: Some concepts and methods in sub-tropical pasture research. Farnham Royal, Com. Agric. Bur. (Bull, 47): 186-198, 1964.
- Parker, C. — The importance of shoot entry in the action of herbicides applied to the soil. *Weeds*, 14: 117-120, 1966.
- Philips, J.M. & Hayman, D.S. Improved procedures for clearing root and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 55: 158-161, 1970.
- Sallati, D.A.M. — Herbicidas: combate eficaz a erva daninha. *Granja*, 447: 26-79, 1985.
- Santelmann, P.W. Herbicide bioassay. In: Truelove, B. ed. Research Methods in Weed Science. Atlanta, Southern Weed Science Society, 1972, p. 91-101.
- Trappe, J.M.; Molina, R. & Castellano, M. — Reactions of mycorrhizal and mycorrhiza formation to pesticides. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 22: 331-359, 1984.
- Victoria Filho, R. — Controle e fitotoxicidade de herbicidas pré-emergentes na cultura da cana-de-acúcar (*Saccharum officinarum* L.). In: Seminário Brasileiro de Herbicidas e Ervas Daninhas, 11., Londrina, PR, 1976. *Resumos*, Londrina, 1976, p.64.
- Victoria Filho, R. & Camargo, P.N. Efeito de herbicidas nos teores de macronutrientes e nas características tecnológicas da cana-de-acúcar (*Saccharum* sp.). II — Misturas de herbicidas em pré-emergência. In: Congresso Brasileiro de Herbicidas e Ervas Daninhas, 14 & Congresso de la Asociacion Latino Americana de Malezas, 6. Campinas, 1982. *Resumos*, Campinas, 1982, p. 84-85.

Recebido para publicação em 28/08/90.

SISTEMA DE AMOSTRAGEM PARA ANÁLISE DE AFLATOXINAS EM GRÃOS

Homero Fonseca¹

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo oferecer uma metodologia de amostragem de grãos para análise de aflatoxinas e outras micotoxinas. O método proposto, que tem como base o do antigo Tropical Products Institute (TPI) de Londres, sugere um sistema de amostragem pelo qual se calcula, através de fórmulas, o número mínimo de sacos ou pontos (quando o produto estiver a granel) do lote, dos quais devem ser retiradas subamostras. Nas fórmulas foram introduzidos expoentes fracionários (raiz quadrada) para diminuir gradualmente o número de sacos/pontos a serem amostrados, à medida que o lote aumenta de tamanho. Sugere, também, critérios para aceitação ou rejeição dos lotes conforme os resultados das análises das aflatoxinas das amostras e levando em consideração o limite máximo tolerável de aflatoxinas nos alimentos destinados ao consumo humano, estabelecido pelo Ministério da Saúde.

Palavras chave: Aflatoxinas, amostragem, grãos.

INTRODUÇÃO

A amostragem é, indubitavelmente, o fator mais importante para a variação verificada nas análises de aflatoxinas em produtos agrícolas em grão. Este fato é devido à distribuição extremamente desuniforme das aflatoxinas nos produtos agrícolas não processados.

A dificuldade de se amostrar grãos para análise de aflatoxinas, deve-se a que, normalmente, uma pequena proporção dos grãos está contaminada num lote (4) e à considerável variação na quantidade da toxina entre grãos infectados. Esta variação já foi demonstrada em amendoim (2), em semente de algodão (3) e em milho (5).

O problema da amostragem de amendoim descascado para análise de aflatoxina tem sido intensamente investigado e discutido também por Whitaker et alii (6, 7, 8, 9, 10 e 11). Num destes trabalhos Whitaker et alii (8) demonstraram que a

distribuição de aflatoxinas dentro de um lote de amendoim descascado pode ser quantitativamente representado pela função binomial negativa. Simulando matematicamente o procedimento de amostragem, ficou demonstrado que o conteúdo de aflatoxina de uma amostra é afetado (a) pelo tamanho da amostra, (b) pela concentração média de aflatoxina no lote e (c) pela porcentagem de grãos contaminados no lote. Estas relações foram expressas na forma de tabelas de probabilidade (10).

Problemas de ordem prática surgem quando o lote é muito grande, por exemplo, em navios, vagões de ferrovias ou pilhas muito grandes: as amostras são geralmente retiradas das camadas superficiais e isto pode gerar resultados não representativos.

Jewers (1), do antigo Tropical Products Institute-TPI- (hoje, Natural Resources Institute-NRI) da Inglaterra, baseado no plano de amostragem norte-americano, desenvolveu um plano alternativo para um lote de 20 toneladas (400 sacos de 50

1. Depto. de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo. Av. Pádua Dias, 11 - 13400 - Piracicaba - SP.

kg) de amendoim descascado, o qual visou diminuir a quantidade e o peso de amostras do lote para diminuir o risco do produtor ter um lote bom rejeitado, sem aumentar significativamente o risco do consumidor. Seu plano previa a retirada de pelo menos 100 subamostras de 105 g do lote, perfazendo um total de 10,5 kg, que era dividido em 3 amostras de igual peso, analisando-as individualmente. O plano norte-americano prevê a retirada de 3 amostras de 22,0 kg cada. Sua aplicação na prática demonstrou que, comparado ao plano norte-americano, provocou um ligeiro aumento no risco do consumidor e um pequeno decréscimo no risco do produtor. A tabela 1 mostra a comparação entre os riscos do consumidor (RC) e os riscos do produtor (RP) do plano TPI contra o plano USA.

O plano TPI previa um número fixo de subamostras e amostras a serem retiradas de um lote, independentemente do seu tamanho. Recomendava apenas que, quando um lote fosse maior que 50 ton., dever-se-ia dividir o lote em sub-lotes para amostragem.

A situação brasileira é bem diversa e os cerealistas e/ou indústrias de alimentos, recebem e manipulam lotes dos mais diferentes tamanhos e, por isso, a retirada de um número fixo de amostras não preenche as nossas necessidades, nem é conveniente, pois uma cerealista frequentemente prepara lotes de 20-30 sacos (1-1,5 ton) de amendoim para pequenas indústrias.

O sistema de amostragem recomendado e praticado pelo Ministério da Agricultura² e ainda em vigor, estabelece uma amostragem linear de 10% dos sacos, retirando "um mínimo de 30 g de cada saco". No caso do amendoim estar a granel, estabelece que se o lote for superior a 500 ton., "far-se-á retirada de 40 kg ao acaso. Se for supe-

rior a 500 ton., far-se-á a retirada de 40 kg de cada série de 500 ton ou fração". As amostras são homogeneizadas e divididas em 3 ou mais vias, mas apenas uma é efetivamente analisada, ficando as demais como contra-prova.

Este sistema, conquanto possa ser adequado para a classificação de produtos agrícolas, não o é para a análise de aflatoxinas, e outras micotoxinas, pelos motivos já expostos.

Por solicitação expressa do Ministério da Agricultura, que pretendia melhorar o sistema de amostragem, procuramos desenvolver um sistema, baseado no do TPI e em nossa experiência de muitos anos nesse campo que, levando em consideração as dificuldades e peculiaridades do nosso país, pudesse determinar o conteúdo médio de aflatoxinas de um lote, com um razoável grau de confiança e que resultasse em aceitáveis riscos ao produtor e do consumidor. Este plano também deveria ser aceitável em relação aos custos decorrentes das perdas tanto de produto, devida à retirada das amostras, como dos procedimentos analíticos.

O ideal seria termos os RP e RC iguais a zero, mas isto é praticamente impossível. O RC poderia ser reduzido utilizando-se uma amostragem mais intensa mas isto aumentaria não só o RP mas, também, os custos e o tempo necessário para que uma decisão fosse tomada com relação ao lote.

MÉTODO

O método que desenvolvemos utiliza fórmulas para amostragem tanto de amendoim em casca quanto descascado, aplicável a lotes de qualquer tamanho, e sugere critérios para aceitação/rejeição de lotes.

Tabela 1 - Comparação dos riscos do consumidor e do produtor dos planos de amostragem TPI e USA.

	Nível		Máximo		Permitido	
	25 ppb de aflatoxina		30 ppb de aflatoxina			
	RC	RP	RC	RP		
Plano TPI (3x3,5 Kg)	1,4%	0,7%	0,6%	0,8%		
Plano USA (322,0 Kg)	0,6%	0,9%	0,2%	1,3%		

Fonte : JEWERS (1)

O sistema de amostragem, baseado no lote padrão de 20 ton do TPI, não é linear, pela introdução de um expoente fracionário (raiz quadrada) cuja finalidade é aumentar o número de subamostras (sacos amostrados) em lotes menores que 20 ton e diminuir progressivamente o seu número, em lotes maiores que 20 ton.

Esta metodologia, que poderá ser aplicada também para outros grãos como milho, feijão, arroz, soja, etc., já foi discutida, aprovada e recomendada pela Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação (ABIA), como uma amostragem mínima a ser posta em prática pelas indústrias associadas, e já está sendo utilizada por indústrias de alimentos e cerealistas, embora somente agora esteja sendo publicada.

As fórmulas propostas, para o cálculo do número de sacos a serem amostrados, diferem ligeiramente do amendoim em casca para o descascado e, também, se estiver ensacado ou a granel.

2.1. Amendoim ensacado

O número de sacos a serem amostrados deve ser calculado pelas seguintes fórmulas:

A. Amendoim em casca:

$$N = 4\sqrt{n} \rightarrow N > n \text{ se } 0 < n < 16$$

B. Amendoim descascado:

$$N = 3\sqrt{n} \rightarrow N > n \text{ se } 0 < n < 9$$

onde:

N = número mínimo de sacos a serem amostrados

n = número de sacos que compõem o lote

Quando N for igual ou maior que n, todos os sacos devem ser amostrados. No caso do amendoim em casca, se n for menor ou igual a 16, todos os sacos devem ser amostrados. Para o amendoim descascado, a amostragem de todos os sacos ocorrerá se n for menor ou igual a 9.

De cada saco a ser amostrado, devem ser retirados cerca de 200 g de amendoim (subamostras). Juntar estas subamostras até formar uma amostra individual de, no mínimo, 4,0 kg, referentes a cada 20 sacos amostrados. Cada amostra de 4,0 kg deverá ser analisada, individualmente, para aflatoxina.

A quantidade mínima de amendoim que deve ser retirada de um lote é de 4,0 kg.

Exemplos:

a) Lote de 10 sacos:

$$N = 4\sqrt{10} = 12,6 \text{ sacos a serem amostrados (em casca)}$$

$$N = 3\sqrt{10} = 9,6 \text{ sacos a serem amostrados (descascado)}$$

Neste caso todos os sacos devem ser amostrados: $10 \times 0,2 \text{ kg/saco} = 2,0 \text{ kg}$. Como não foi atingido o mínimo de 4,0 kg, maior quantidade de amendoim (neste caso 0,4 kg) deve ser retirada de cada saco, em lugares diferentes, para perfazer os 4,0 kg necessários para análise.

b) Lote de 100 sacos:

$$N = 4\sqrt{100} = 40 \text{ sacos devem ser amostrados (em casca)}$$

$40 \text{ sacos} \times 0,2 \text{ kg/saco} = 8,0 \text{ kg} + 4,0 \text{ kg/amostra} = 2 \text{ amostras a serem analisadas.}$

Todas as vezes que a fórmula indicar a retirada de mais de uma amostra de um lote, este deve ser dividido idealmente em tantos sublotes quantas forem as amostras a serem retiradas. De cada sub-lote ideal deve-se retirar as 20 subamostras, que reunidas comporão uma amostra. É o caso específico deste exemplo e de todos os lotes que tiverem mais de 56 sacos. As amostras não devem ser misturadas entre si e sim mantidas separadas para posterior análise. É de todo necessário que cada amostra já identificada com a parte do lote de onde ela foi retirada para, caso a análise revele que ela está contaminada, possa-se eliminar ou rejeitar somente aquela parte.

$$N = 3\sqrt{100} = 30 \text{ sacos devem ser amostrados (descascado)}$$

$30 \text{ sacos} \times 0,2 \text{ kg/saco} = 6,0 \text{ kg} + 4,0 \text{ kg/amostra} = 1,5 \rightarrow 2 \text{ amostras a serem analisadas.}$

OBS.- Todas as vezes que o número de amos-

tras a serem analisadas for fracionário, deve-se arredondar para cima, quando a fração for igual ou maior que 0,5.

c) Lote de 3080 sacos (77.000 kg):

$$N = 4\sqrt{3080} \quad = 222 \text{ sacos devem ser amostrados (em casca)}$$

$222 \text{ sacos} \times 0,2 \text{ kg/saco} = 44,4 \text{ kg} + 4,0 \text{ kg/amostra} = 11,1 \approx 11 \text{ amostras a serem analisadas.}$

$$N = 3\sqrt{3080} \quad = 166 \text{ sacos devem ser amostrados (descascado)}$$

$166 \text{ sacos} \times 0,2 \text{ kg/saco} = 33,2 \text{ kg} + 4,0 \text{ kg/amostra} = 8,3 \approx 8 \text{ amostras a serem analisadas.}$

2.2 Amendoim a granel:

Para cada lote utilizar as fórmulas:

A. Amendoim em casca:

$$N' = 8\sqrt{n'}$$

B. Amendoim descascado:

$$N' = 6\sqrt{n'}$$

onde:

N' = número de onde devem ser retirados 0,4 kg de amendoim (subamostras)

n' = número de toneladas do lote

Cada amostra de 0,4 kg formam uma amostra individual de 4,0 kg que será analisada individualmente.

Exemplos:

a) Lote de 50 toneladas em casca:

$$N' = 8\sqrt{50} \quad = 56,7 = 57 \text{ pontos a serem amostrados}$$

$57 \times 0,4 \text{ kg} = 22,8 \text{ kg} + 4,0 \text{ kg/amostra} = 5,7 \rightarrow 6 \text{ amostras a serem analisadas.}$

b) Lote de 50 toneladas, descascado:

$$N' = 6\sqrt{50} \quad = 42,43 = 42 \text{ pontos a serem amostrados}$$

$42 \times 0,4 \text{ kg} = 16,8 \text{ kg} + 4,0 \text{ kg/amostra} = 4,2 \rightarrow 4 \text{ amostras a serem analisadas.}$

3. Embalagem da amostra

Tomar as amostras individuais de aproximadamente 4,0 kg (20 subamostras de 0,2 kg, no caso do amendoim ensacado ou 10 subamostras de 0,4 kg de amendoim a granel) e embalá-las separadamente indentificando-as de acordo com o local do lote em que foi retirada.

4. Análise

Analizar de acordo com a técnica usual do laboratório.

5. Critérios para aceitação/rejeição do lote

Critérios de aceitação/rejeição de lotes, no Brasil, ainda não foram estabelecidos pelos Ministérios da Agricultura e/ou da Saúde. A única referência que existe é o limite máximo de tolerância de aflatoxinas em alimentos destinados ao consumo humano que é de 30 ppb (somadas as aflatoxinas B1 e G1, estabelecido pelo Ministério da Saúde em 1974).

Os critérios que sugerimos, ainda baseados nos critérios do método TPI são:

- a) se menos da metade das amostras acusarem mais de 30 ppb, aceitar o lote;
- b) se mais da metade das amostras acusarem mais de 30 ppb, fazer uma nova amostragem ou rejeitar o lote;
- c) se todas as amostras acusarem mais de 30 ppb, rejeitar o lote;
- d) no caso de nova amostragem: se mais da metade das amostras acusarem mais de 30 ppb, rejeitar o lote.

SUMMARY

Sampling plan for analysis of aflatoxins in grains.

The aim of this paper was to present a sampling plan for analysis of aflatoxins in grains. This plan, based on that of the former Tropical Products Institute (TPI) of London, establishes, by means of

four formulas, the minimum number of bags or points (when in bulk) from which sub-samples must be drawn. Fractional exponents (square roots) were introduced in the formulas to gradually decrease the number of bags/points to be sampled as the lot size increases. The plan also proposes criteria for accepting/rejecting the lots based on the results of the analysis of aflatoxins of the samples, taking into consideration the maximum permitted limit of aflatoxins in foods for human consumption, set up by the Brazilian Health Ministry.

AGRADECIMENTOS

O autor agradece as sugestões do Prof. Humberto de Campos, na apresentação das fórmulas e dos Profs. Murilo Graner e Paulo Roberto Cantarelli, na revisão do texto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jewers, K. — Mycotoxins in food — the application of survey and quality control. *Royal Society of Health J.*, **102**: 114-118, 1982.
2. Cucullu, A.F.; Lee, L.S.; Mayne, R.Y. & Goldblatt, L.A. — Determination of aflatoxins in individual peanuts and peanut sections. *J. Am Oil Chem. Soc.*, **43**: 89-92, 1966.
3. Koltun, S.P.; Gardner, H. K., Jr.; Dollear, F.G. & Rayner, E.T. — Physical properties and aflatoxin content of individual catseye fluorescent cottonseeds. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **51**: 178-180, 1974.
4. Robertson, J.A.; Lee, L.S. Cucullu, A.F. & Goldblatt, L.A. — Assay of aflatoxin in peanuts and peanut products using acetone-hexane-water for extraction. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **42**: 467-471, 1965.
5. Shotwell, O.L.; Goulden, M.L. & Hesseltine, C.W. — Aflatoxin distribution in contaminated corn. *Cereal Chem.*, **51**: 492-499, 1974.
6. Whitaker, T. & Wiser, E. — Theoretical investigations into the accuracy of sampling shelled peanuts for aflatoxin. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **46**: 377-379, 1969.
7. Whitaker, T.; Dickens, J.W. & Wiser, E. — Design and analysis of sampling plans to estimate aflatoxin concentrations in shelled peanuts. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **47**: 501-504, 1970.
8. Whitaker, T.; Dickens, J.W. & Monroe R. — Comparison of the observed distribution of aflatoxin in shelled peanuts to the negative binomial distribution. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **49**: 590-593, 1972.
9. Whitaker, T.; Dickens, J.W. & Monroe, R. — Variability of aflatoxin test results. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **51**: 214-218, 1974a.
10. Whitaker, T.; Dickens, J.W. & Wiser, E. Monroe R. — Development of the method to evaluate sampling plans used to estimate aflatoxin concentration in lots of shelled peanuts. IUPAC Technical Reports, Nº 10, 1974b.
11. Whitaker, T. — Sampling granular foodstuffs for aflatoxin. *Pure and Appl. Chem.*, **49**: 1709-1717, 1977.

Received for publication in 01/11/90.

A DIAZONIUM BLUE B TEST FOR YEASTS GROWN THREE DAYS ON YEAST CARBON BASE-UREA AGAR.

Allen N. Hagler and
Leda C. Mendonça-Hagler

SUMMARY

Yeast cultures representing 57 ascomycetous and 32 basidiomycetous species were grown for 3 days at 25 to 28°C on Yeast Carbon Base supplemented with 2% filter sterilized urea, 20mg% of acid fuchsin, and 2% agar. After growth cultures were incubated 16hr at 55°C and when cooled, DBB reagent dropped on the cultures. Violet to red color was observed within 1 min for all basidiomycetes and their anamorphs, but none of the ascomycetes tested or their anamorphs.

Key words: yeast, Basidiomycete, taxonomy, DBB test.

INTRODUCTION

Most of the tests used in conventional taxonomy of the yeasts are based on carbohydrate metabolism and represent only a small part of the genome. With application of the methods of molecular biology, especially DNA base composition and sequence comparison, the limitations of the conventional tests in current use has become increasingly apparent (3). A few tests have been found to have special importance for classification. Examples are the diazonium blue B (DBB) and urease tests that can be used to differentiate between basidiomycetous and ascomycetous yeasts (1, 2).

The alkaline-ethanol-DBB method allows standardized and easily interpreted results with three day Yeast Nitrogen Base-Glucose cultures. However the test is somewhat laborious involving centrifugation and heating to 100°C, making it inconvenient especially for laboratories that characterize yeasts on solid medium by the replicaplate method. Yeasts grown on solid media such as skim milk agar, YM agar, and Sabouraud agar supli-

mented with yeast extract require about 3 weeks incubation before application of DBB reagent and even then some results are dubious. Our objective was to develop a DBB test yielding conclusive results with 3 day growth on solid medium and with a minimum of manipulation of the cultures.

METHODS

Type and authentic cultures were obtained from culture collections at Georgia State University, Atlanta, Georgia; Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois; University of California, Davis, California; and Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil (Tables 1 & 2). Cultures were maintained on 2% Glucose, 0,5% yeast extract, 0,5% malt extract, 0,2% dihydrogen sodium phosphate, and 2% agar (GYMP agar) grown for 3 days at 25 to 28°C for mesophiles or 16°C for psychrophiles and stored at 8°C under sterile mineral oil. Cultures for the DBB test were grown for 3 days at 25-28°C (16°C for psychrophiles) on Yeast Carbon Base

medium supplemented with 0.02% acid fuchsine, 2% agar, and 2% filter sterilized urea added after autoclaving of the other ingredients (YCB-urea-agar). This medium has a pH of about 5.5 and is pink in color but turns colorless when the pH increases from release of ammonia resulting from action of urease. After growth cultures were incubated at $55 \pm 5^\circ\text{C}$ over night (16 hr). Cultures were cooled to room temperature and DBB reagent was added in drops to growth on plates or 0.5ml to 2.5ml cultures in 13mm tubes. DBB reagent was prepared by adding 10mg of DBB (o-dianisidine, tetraoxtized; Sigma, technical grade) to each 10 ml of cold 0.1 N pH 7.0 tris buffer and maintained on ice. Development of a red to violet color of the yeast growth within 1 min after addition of DBB reagent was considered a positive reaction

and unchanged to yellow, orange or brown color was considered negative. If the surface of the yeast growth was too hydrophobic to allow good contact with the DBB reagent an inoculating needle was used to stir the reagent into the growth.

RESULTS AND DISCUSSION

All of the basidiomycetes and basidiomycetous anamorphs tested, representing 32 species in 12 genera, were positive for this DBB test (Table 1), but all ascomycetes, and ascomycetous anamorphs representing 59 species in 23 genera, and the yeast like alga *Chlorella*, believed to be the origin of the opportunistic pathogen *Prototheca*, were negative for this DBB test (table 2). Positive control cultures

TABLE 1 - Yeast strains with positive DBB test results for 3 day YCB-urea agar cultures.

genus	species	Strain n°	Source
<i>Candida</i>	<i>amylorenta</i>	6272	CBS
<i>Candida</i>	<i>phylya</i>	6272	CBS
<i>Cryptococcus</i>	<i>albidus</i>	68-150	UCD
<i>Cryptococcus</i>	<i>diffluens</i>	32-71, 68-178	GSU, UCD
<i>Cryptococcus</i>	<i>flavus</i>	68-184	UCD
<i>Cryptococcus</i>	<i>laurentii</i>	87-2, 68-201	GSU, UCD
<i>Cryptococcus</i>	<i>luteolus</i>	68-261	UCD
<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>	272A; 76B	GSU
<i>C.</i>	<i>neoformans</i>	836C; 295AD	GSU
<i>Cryptococcus</i>	<i>terreus</i>	57-11	UCD
<i>Filobasidiella</i>	<i>neoformans</i>	F-3502A	GSU
<i>Filobasidium</i>	<i>capsuligenum</i>	CDC 325	GSU
<i>Fissuricella</i>	<i>filamenta</i>	71-40	UCD
<i>Leucosporidium</i>	<i>gelidum</i>	AH 177	GSU
<i>Leucosporidium</i>	<i>nivalis</i>	AH 176	GSU
<i>Rhodosporidium</i>	<i>sphaerocarpum</i>	5941	CBS
<i>Rhodotorula</i>	<i>glutinis</i>	68255	UCD
<i>Rhodotorula</i>	<i>marina</i>	48-23P	UCD
<i>Rhodotorula</i>	<i>rubra</i>	1	UCD
<i>Sporidibolus</i>	<i>johsonii</i>	5470	CBS
<i>Sporobolomyces</i>	<i>albo-rubescens</i>	482	CBS
<i>Sporobolomyces</i>	<i>antarcticus</i>	Y8295	NRRL
<i>Sporobolomyces</i>	<i>pararoseus</i>	484	CBS
<i>Sporobolomyces</i>	<i>salmonicolor</i>	5937; 68-371	CBS, UCD
<i>Sporobolomyces</i>	<i>singularis</i>	5109	CBS
<i>Sterigmatomyces</i>	<i>aphidis</i>	Y7954	NRRL
<i>Sterigmatomyces</i>	<i>elviae</i>	Y7504	NRRL
<i>Sterigmatomyces</i>	<i>halophilus</i>	Y4619	NRRL
<i>Sterigmatomyces</i>	<i>indicus</i>	Y6837	NRRL
<i>Sterigmatomyces</i>	<i>nectaririi</i>	Y8296	NRRL
<i>Sterigmatomyces</i>	<i>penicillatus</i>	Y8294	NRRL
<i>Sterigmatomyces</i>	<i>sp.</i>	Y7956	NRRL
<i>Tremella</i>	<i>foliaceae</i>	6969	CBS
<i>Trichosporon</i>	<i>cutaneum</i>	77	UFRJ

Abbreviations: CBS=CentraalBureau voor Schimmelcultures, Delft Holland; GSU=Georgia State University, Atlanta Georgia; NRRL=Northern Regional Research Laboratory, United States Department of Agriculture, Peoria IL, USA; UCD=University of California, Davis, Calif., USA; UFRJ=Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

TABLE 2 - Yeast strains with positive DBB test results for 3 day YCB-urea agar cultures.

Genus	Species	Strain Nº	Source
<i>Aureobasidium</i>	<i>pullulans</i>	PL;	GSU
<i>A.</i>	<i>pullulans</i>	F214; P763	UFRJ
<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	CDC 595	GSU
<i>Candida</i>	<i>glabrata</i>	39	UFRJ
<i>Candida</i>	<i>guilliermondii</i>	C-138	UCD
<i>Candida</i>	<i>krusei</i>	66; 57-19	UFRJ, UCD
<i>Candida</i>	<i>lipolytica</i>	257	UFRJ
<i>C.</i>	<i>lipolytica</i>	1A; 37-1; SOLR	GSU
<i>Candida</i>	<i>maltosa</i>	R42	GSU
<i>Candida</i>	<i>parapsilosis</i>	22019	GSU
<i>Candida</i>	<i>steatolytica</i>	512	UFRJ
<i>Candida</i>	<i>tropicalis</i>	CDC 231	GSU
<i>Candida</i>	<i>utilis</i>	74-64	UCD
<i>Candida</i>	<i>zylanoides</i>	619	CBS
<i>Chlorella</i>	<i>sp.</i>	79-0781	GSU
<i>Cryptococcus</i>	<i>melibiosum</i>	52-87	UCD
<i>Debaryomyces</i>	<i>hansenii</i>	75-17	UCD
<i>Debaryomyces</i>	<i>yarrowii</i>	72-58	UCD
<i>Diplodascus</i>	<i>aggregatus</i>	67-255	UCD
<i>Diplodascus</i>	<i>uninucleatus</i>	C-57	UCD
<i>Geotrichum</i>	<i>sp.</i>	260	UFRJ
<i>Hanseniaspora</i>	<i>occidentalis</i>	2592	CBS
<i>Hanseniaspora</i>	<i>osmophila</i>	24231	GSU
<i>Hanseniaspora</i>	<i>uvarum</i>	f 216	UFRJ
<i>Hansenula</i>	<i>anomala</i>	510	UFRJ
<i>Hansenula</i>	<i>saturnus</i>	UM305	GSU
<i>Issatchenka</i>	<i>terricola</i>	66-22	UCD
<i>Kloeckera</i>	<i>apiculata</i>	55-45	UCD
<i>Kloeckera</i>	<i>africana</i>	7606	GSU
<i>Kluyveromyces</i>	<i>marxianus</i>	71-58; CA 333	UCD, GSU
<i>Lipomyces</i>	<i>starkeyi</i>	78-23	UCD
<i>Metschnikowia</i>	<i>bicuspidata</i>	67-10; 67-100	UCD
<i>M.</i>	<i>bicuspidata</i>	68-46; 68-47	UCD
<i>M.</i>	<i>bicuspidata</i>	78-44; 763	UCD, UFRJ
<i>Metschnikowia</i>	<i>krisii</i>	61-31	UCD
<i>Metschnikowia</i>	<i>lunata</i>	77-62	UCD
<i>Metschnikowia</i>	<i>pulcherrima</i>	C-214	UCD
<i>Metschnikowia</i>	<i>reukaufii</i>	62-311	UCD
<i>Metschnikowia</i>	<i>zobellii</i>	61-33	UCD
<i>Nadsonia</i>	<i>elongata</i>	61-43	UCD
<i>Nadsonia</i>	<i>fulvescens</i>	UM 815	GSU
<i>Nematospora</i>	<i>coryli</i>	66-36	UCD
<i>Pichia</i>	<i>cactophila</i>	76-243A	UCD
<i>Pichia</i>	<i>kluyveri</i>	61-503	UCD
<i>Pichia</i>	<i>membranaefaciens</i>	DP 5586	GSU
<i>Pichia</i>	<i>ohmeri</i>	75-53	UCD
<i>Pichia</i>	<i>spartinae</i>	P14	GSU
<i>Prototheca</i>	<i>zopfii</i>	66-6	UCD
<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	200	UFRJ
<i>Saccharomyces</i>	<i>diastaticus</i>	57-5	UCD
<i>Saccharomyces</i>	<i>ludwigii</i>	72-178	UCD
<i>Saccharomyces</i>	<i>fibuligera</i>	73-34; 45-149-72	UCD, GSU
<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>octosporus</i>	UM 300	GSU
<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>pombe</i>	C-277	UCD
<i>Sporopachydermia</i>	<i>cereanus</i>	72-313	UCD
<i>Sporopachydermia</i>	<i>quercuum</i>	83-1	UCD
<i>Taphrinia</i>	<i>deformans</i>	C-11	UCD
<i>Taphrinia</i>	<i>potentillar</i>	T-442	GSU
<i>Trichosporon</i>	<i>eriense</i>	5974	CBS
<i>Trichosporon</i>	<i>fennicum</i>	5928	CBS
<i>Trichosporon</i>	<i>terrestre</i>	6697	CBS

of *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula rubra* and negative controls of known ascomycetes were used when running this test. Care was taken to record only red to violet color as positive and to avoid use of deteriorated DBB that yielded brown colored reagent and atypical results with controls. We have used this method to characterize more than 2000 cultures from tropical substrates including plants, fruits, animals, milk, and both marine and fresh waters without any atypical results. Since all of the basidiomycetous yeasts are urease positive, the alkaline condition needed for rapid DBB results was created by release of ammonia in the culture medium during incubation for growth. Heating overnight at 55°C on the alkaline medium was sufficient for good results. Urease production could be detected by color change of the medium. When using the replica plate method with multiple inoculation on plates, urease results were not reliable because of interference by the strong reaction of positive cultures. When used in 13mm diameter tubes complete discoloration of the medium within 3 days was typical of the basidiomycetes and appeared to be the equivalent of a positive result on Christensen's urea agar. This was recorded as a 3+ result, and weaker positive reactions noted for many ascomycetous cultures were recorded as 2+ and 1+. Further study may permit use of urease data from this medium in standard characterization of yeast cultures, but this test appears to be more sensitive than the standard test on Christensen's urea medium. The rapid DBB test on YCB-urea agar was found to give reliable results for a large number of diverse cultures and was convenient for routine use.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank D. G. Ahearn, C.P. Kurtzman, and

H. J. Phaff for cultures, and CNPq and FINEP for financial support.

RESUMO

Teste do azul de diazonium B para leveduras cultivadas por três dias em meio contendo uréia.

Culturas de leveduras representando 57 espécies incluídas entre os ascomicetos e 32 espécies entre os basidiomicetos cresceram durante 3 dias a 25-28°C no meio "Yeast Carbon Base" adicionado de uréia a 2%, esterilizada através de filtração. Após crescimento as culturas foram incubadas por 16 hr a 55°C resfriadas e tratadas com reagente de DBB (azul de diazonium B). Coloração violeta a vermelha foi observada dentro de 1 minuto para todas as culturas de basidiomicetos e seus anamorfos. Nas culturas de ascomicetos e seus correlatos não houve desenvolvimento de coloração.

Palavras chave: leveduras, Basidiomycete, taxonomia, DBB teste.

REFERENCES

1. Hagler, A. N. & Ahearn, D. G. - Rapid Diazonium Blue B test to detect basidiomycetous yeasts. *Int. J. Syst. Bact.* 31: 204-208, 1981.
2. Hopsu-Havu, V. K.; Laiho, S. & Lundell E. - A colour test for yeasts based on staining of the colonies with aromatic diazonium salts. *Mykosen*, 10: 23-26, 1967.
3. Price, C. W.: Fuson, G. B., & Phaff, H. J. Genome comparison in yeast systematics: delimitation of species within the genera *Schwanniomyces*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, and *Pichia*. *Microbial. Rev.* 42: 161-193. 1978.

Received for publication in 15/10/90

LOW COST ILLUMINATION SYSTEM FOR *LISTERIA* spp RESEARCH

Sônia Maria Moura¹

Maria Teresa Destro¹

Bernadette D.G.M. Franco¹

& Rogério Marcos Brancaccio²

SHORT COMMUNICATION

ABSTRACT

We describe a low cost illumination system to be used on the examination of the blue-grayish color of *Listeria* spp colonies on solid media.

Key words: *Listeria* examination

One of the most important parameters on the *Listeria* identification is the colonies' typical blue-grayish color when examined under 45° transillumination. Usually this is achieved by a strong converging light beam (AO653-Reichert

653) inciding on a concave or plane mirror at 45°, reflecting in a plate and being observed through a stereoscope (Fig. 1a). A low power inverted microscope (25x) can also be used to obtain the same color (Fig. 1b). (McClain, D. &

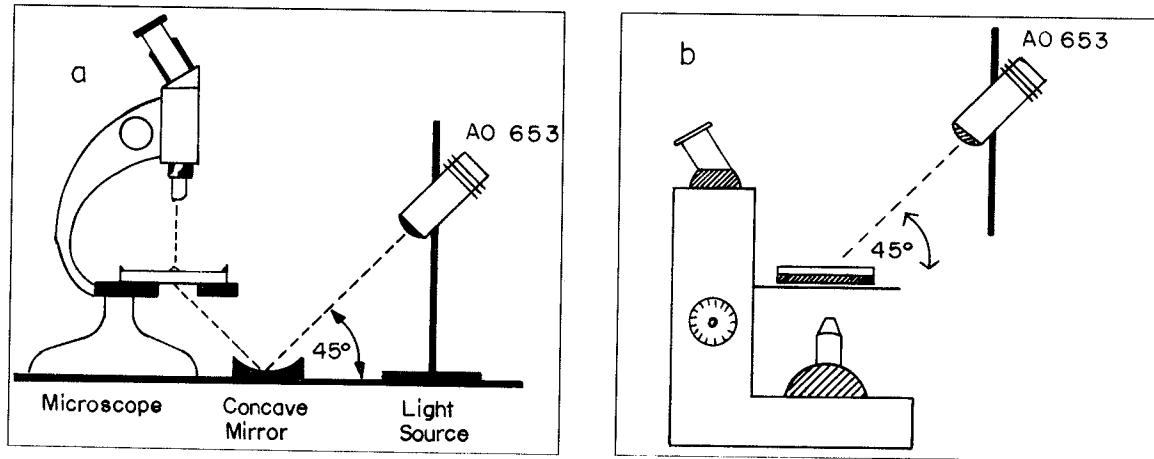


FIGURE 1 - (a) CDC concave mirror arrangement and (b) inverted microscope arrangement to observe *Listeria* colonies with 45° transillumination

1. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP Caixa Postal - 30.786 01051 - São Paulo - SP - Brasil
2. Setor de Óptica - FUNBEC - Caixa Postal 2089 - Cidade Universitária - São Paulo, SP - Brasil

Lee, W. H. Development of USDA-FSIS method for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat and poultry. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71 (3): 660-664, 1988.

Since in Brazil there are difficulties to obtain reliable equipments, in this paper we report the development of a low cost and effective alternative apparatus.

The illuminator design can be seen in the Fig. 2. The used light source was a halogen lamp H-3, 12v, 55w POLAMP (R) (a) with similar day light color temperature. To be closer to day light a chromatic coordinates $x = 0,3$ and $y = 0,3$ dielectric dichroic ATLAS (R) reflector was used (b). The set was put together in a covered wood box. The wood cover is important to protect the observer eyes (c).

A AC 110-220v, 60HZ, DC 13,8v, 10A NODAJI (R) stabilizer was connected to the device.

In the Figure 3 one can see the lamp and reflector focal distances.

Various *Listeria* spp strains isolated from food as well as a FDA strain (*L. monocytogenes* Scott A) were used on testing the apparatus, giving the microorganism characteristic color.

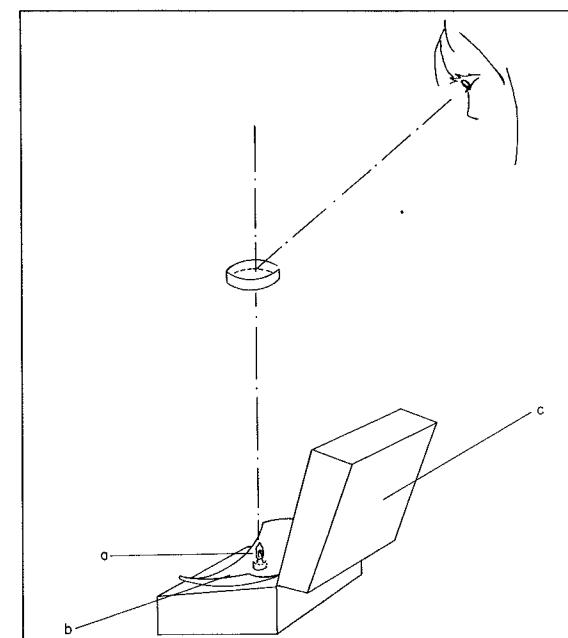


FIGURE 2 - Design of the illuminator. The symbols are described in the text.

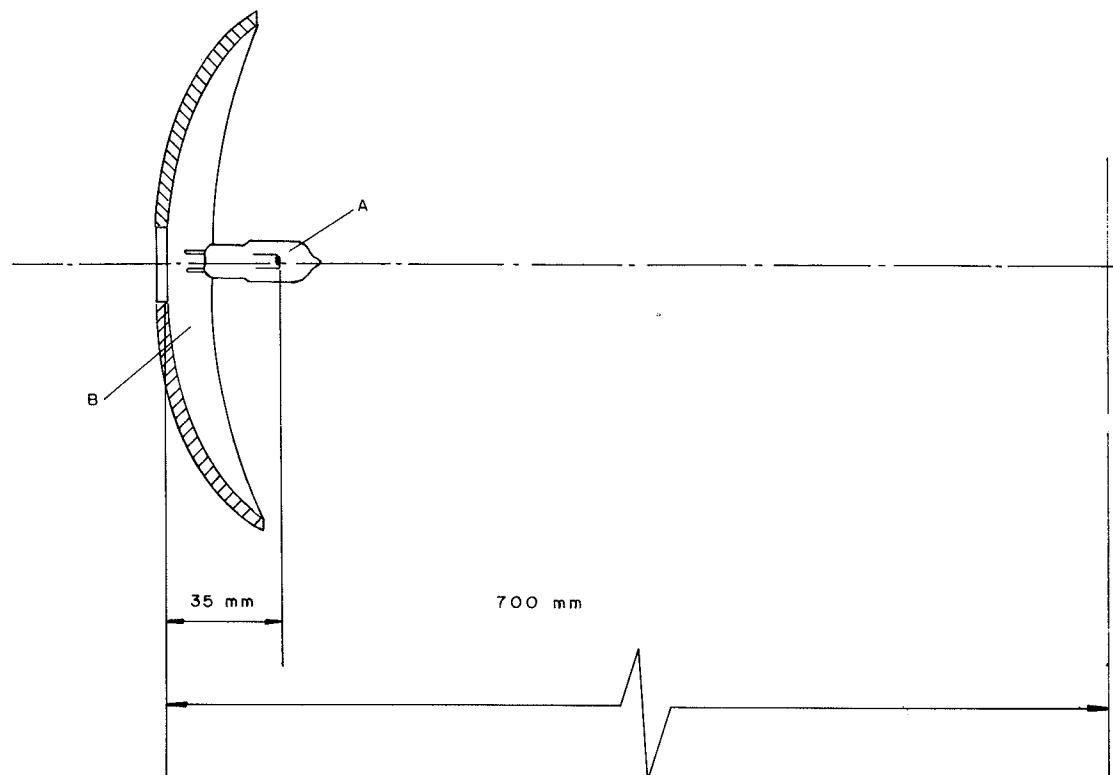


FIGURE 3 - Lamp and reflector focal distances. A - lamp; B - reflector.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors gratefully acknowledge Ms. Silvana M. dos Santos for preparing the figures. Research supported by grants from CNPq.

RESUMO

Proposição de um novo iluminador para pesquisa de *Listeria*

Descreve-se um iluminador barato e de fácil construção a ser usado na pesquisa da cor azul-acinzentada das colônias de *Listeria* spp.

Received for publication in 10/12/89

INFORMAÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS

ECOLOGIA - CRIAÇÃO DE MOLUSCOS E PEIXES EM ÁGUAS SERVIDAS

Uma cidadezinha do sul da França transforma suas águas servidas em ecossistema ideal para moluscos e peixes.

A conquilicultura é, ao lado do turismo, a principal atividade econômica da comuna de Mèze (situada perto de Montpellier, departamento de Hérault, sul da França), desenvolvida principalmente no lago de Thau. Como os moluscos, e especialmente as ostras, são organismos filtradores muito sensíveis aos germes patogênicos, a atividade da bacia exige condições sanitárias estritas e regulamentadas. Para garantir a qualidade das águas do seu parque de ostras, nos planos ecológico (desfosfatação, desnitrificação) e sanitário (eliminação de bactérias e germes patogênicos), a prefeitura de Mèze está utilizando a técnica das lagoas de estabilização, com a assessoria do laboratório de hidrobiologia marinha e continental da Faculdade de Farmácia de Montpellier.

As lagoas ou bacias de estabilização constituem a melhor técnica para tratamento de águas servidas urbanas; a única que lança no rio, lago ou mar, efluentes com características químicas e bacteriológicas semelhantes às da água limpa, própria para banho.

Como funciona

Um pré-tratamento leve elimina detritos maiores, matérias minerais e gorduras. Em seguida, as águas servidas circulam num conjunto de três bacias, com superfície total de 8 hectares. A primeira bacia (4 ha) recebe as águas servidas da comuna de Mèze. Os fluxos de entrada variam entre 2.000 e 3.000 m³/dia. São águas saturadas de poluentes diversos, principalmente de origem fecal. Ao entrar em contato com as bactérias, as matérias orgânicas em suspensão vão produzir sais minerais. Esta água da primeira bacia, com alta porcentagem de sais minerais, é lançada na segunda bacia (2 ha), onde um longo período de retenção otimiza o fenômeno de fotossíntese (aumento do pH e precipitação). Os filoplânctons nutrem-se então de sais minerais (ferro, cobre, magnésio) para liberar oxigênio. A biomassa proveniente da segunda bacia alimenta o zooplâncton contido na terceira bacia (2 ha), encerrando assim

o ciclo natural do ecossistema. Após cerca de 80 dias de retenção, as águas são lançadas no lago de Thau, onde já se começou também a criar peixes ornamentais e tropicais, como tilápias e outros

M. BONTOUX, Directeur de Recherche, Laboratoire d'hydro-biologie marine et continentale, Faculté de Pharmacie de Montpellier - 15, av. Charles Flahaut - 34 060 - Montpellier Cedex - tel: (00.33) 67 69 01 09;
M. BONDON, Directeur du Centre de Traitement de Mèze,
tel: (00.33) 67 43 87 67

MEDICINA - HEMOFILIA DE LEYDEN: UMA DOENÇA GENÉTICA QUE DESAPARECE NATURALMENTE.

Um exemplo original de como a própria natureza pode reparar uma falha genética.

A hemofilia de Leyden é uma forma de hemofilia B que apresenta uma característica muito especial: é transitória. Os garotos atingidos por ela passam toda a infância sem produzir um fator de coagulação conhecido como fator IX. Depois, por volta dos 13-14 anos, a fase da puberdade, sua taxa de fator IX aumenta progressivamente até se estabilizar em uma quantidade próxima da normal. A hemofilia desaparece.

O pesquisador francês Jean-Philippe Salier, da Faculdade de Medicina e Farmácia de Rouen, vinculada ao INSERM (Instituto Francês de Saúde e Pesquisa Médica), descobriu o mecanismo molecular que leva o gene do fator IX - isto é, o fator IX Leyden a recuperar uma atividade quase normal. A descoberta aconteceu durante um estágio de Salier na Universidade de Michigan, em colaboração com Shinsaku Hirosawa e Kotuku Kurachi.

O processo não ocorre ao nível produzido (expresso) pelo próprio gene, e sim ao nível da sequência reguladora que controla a atividade do gene. Pouco tempo antes os pesquisadores haviam conseguido clonar e descrever as seqüências promotoras e reguladoras, que respectivamente desencadeiam e modulam a transcrição do gene do fator IX.

Dispondo dos instrumentos moleculares e tendo acesso a uma família atingida pela hemofilia B de Leyden, eles estudaram as seqüências que aca-

bavam de identificar, procurando descobrir se a doença não seria causada por uma mutação. Os pesquisadores evidenciaram nessa família uma região mutada de 40 pares de bases. Por mutagênese dirigida, conseguiram demonstrar que tal região pertence a uma zona de regulação situada abaixo do promotor do gene, e que ela reduz a força desse promotor - e portanto a produção do fator IX. Elucidada uma das características da doença, era preciso saber por que o gene passa a funcionar de forma praticamente normal durante a puberdade. Os hormônios esteróides pareciam ser a resposta mais lógica. A equipe realizou testes de laboratório com os corticoesteróides, porém sem resultado. Então fizeram experiências com a testosterona (hormônio masculino) e observaram que o gene mutado voltava à atividade. O circuito está completo: a hemofilia B de Leyden desaparece sob a influência da testosterona. Ainda é preciso determinar o mecanismo da influência do hormônio sobre a regulação de um gene coagulação.

Jean Philippe SALIER, INSERM U.
78 - 543, Chemin de la Breteque BP 73 -
76233 Bois Guillaume Cedex -
tel.: 00.33.16 / 35 60 02 60

DIAGNOSIS BASED UPON THE DETECTION OF THE DNA OF THE HUMAN PAPILLOMAVIRUS

The cells of the uterine cervix are the site of infections and transformations, for example, when the papillomaviruses are present. In order to characterize these infections and monitor their proliferation, CIS BIO INTERNATIONAL is developing a new diagnostic test based upon the recognition of fragments of the DNA of the virus that may be contained in the cells taken by the gynaecologist during a smear test.

A number of reagent are currently being validated in clinical laboratories that should allow detection of certain types of papillomavirus (HPV) which are believed to be associated more particularly with the malignant transformation of cells.

CIS BIO INTERNATIONAL is developing an original methodology based upon a number of French and European cooperative projects.

The DNA probes constitute one of the most promising approaches to *in vitro* diagnosis in the years to come. This method recently came to prominence in the case of the detection of cystic fibrosis (see FTS nº 34-35, Summer 1990)

ADHESION FACTORS FOR CELLULAR CULTURES

Conventional cell cultures are grown on a plastics substrate. During growth, the attachment factors are usually provided by animal serum of various compositions. The cells have to adapt to their new environment, a situation which, for the differentiated cells, results in a rapid loss of their specific functions.

It was recently demonstrated that *in vitro* the attachment, morphology and functioning of the differentiated cells all depend on their substrate, and notably on the main constituents of the basal layers. These cells in fact possess specific membrane receptors for each of the matrix proteins.

In this connection, BIOPREDIC has developed a wide range of basal layer constituents, specially prepared to give a degree of purity of 95% or more. Most of the adhesion factors proposed hitherto are less pure, giving biological responses of low specificity. The constituent proteins of the basal layers include: laminine, entactine, collagen IV and heparane sulfate proteoglycane (HSPG). The proteins are all isolated from a mouse sarcoma: the Engelreth-Holm-Swarm (EHS) tumour.

The BIOPREDIC adhesion factors are purified using a procedure developed by researchers at the INSERM (Rennes) unit 49. The purity of each macromolecule is determined by electrophoresis on polyacrylamide gel (SDS-PAGE). The absence of cross-contamination between the different adhesion factors is monitored by Western-Blot. Biological activity is assessed by adhesion and the morphology of rat hepatocytes.

Fonte: French Technology Survey, nº 36, outubro - novembro, 1990.

CONGRESSOS E REUNIÕES CIENTÍFICAS

17ª Reunião Anual de Genética de Microrganismos, 4 - 8 de março de 1991, Brasília, DF.

Congresso Brasileiro de Microbiologia —, 22 a 26 de setembro de 1991, São Paulo.

IV Simpósio Brasileiro de Microbiologia de Alimentos, 2 a 5 de abril de 1991, Goiânia, Goiás.

Fenabio Biolatina - II Feira e Congresso Nacional de Biotecnologia e I Feira e Congresso Latinoamericano de Biotecnologia, 6 a 10 de julho de 1991, São Paulo, SP.

BOOK REVIEW

Fc Receptors and the Action of Antibodies.
Editado por Henry Metzger. American Society
for Microbiology, Washington, D.C., 1990,
368p.

A interação entre抗ígenos e anticorpos, através dos sítios combinatórios destes últimos, é insuficiente na estimulação de mecanismos efetores. Para exercer várias funções biológicas os anticorpos devem interagir através de sua região Fc com outras proteínas designadas genericamente "receptores de Fc" (FcR). Este livro aborda em profundidade como os anticorpos podem, através de sua combinação com os FcR, regular sua própria biossíntese, transporte através de membranas celulares e seu metabolismo e como podem iniciar a ativação do sistema complemento, estimular fagocitose, desencadear a liberação de mediadores celulares e promover, por mecanismos mediados por células, a morte de outras células e microorganismos.

O editor, em colaboração com 19 autores provenientes de consagrados institutos de pesquisa e universidades da América do Norte e Europa escreveu esta obra que é dividida em 7 partes.

A primeira parte focaliza a estrutura e função dos anticorpos numa perspectiva que facilita a compreensão das partes que a seguem e compreende três capítulos: no primeiro, é dada uma visão geral sobre como a estrutura dos anticorpos acha-se relacionada às suas principais funções; nos dois capítulos subsequentes encontra-se uma revisão atualizada sobre as análises realizadas por meio de difração de raios X, por estudos de anticorpos em soluções e por microscopia eletrônica que elucidaram os conhecimentos atuais sobre a estrutura dos anticorpos.

A segunda parte, constituída por três capítulos, enfoca o transporte e o metabolismo dos anticorpos quando estes não se acham complexados a抗ígenos e o papel dos FcR nestas funções. O primeiro capítulo trata da transmissão de anticorpos monoméricos, tanto através do epitélio intestinal de roedores, como através da placenta humana. O capítulo seguinte é dedicado ao receptor de imunoglobulinas poliméricas e seu papel no transporte das imunoglobulinas A e M (IgA e IgM) para as secreções externas, através do epitélio glandular. O último e mais extenso capítulo desta parte aborda vários aspectos do metabolismo

das imunoglobulinas, incluindo desde métodos para sua mensuração e características metabólicas de cada classe de imunoglobulina até as implicações que devem ser consideradas quando da aplicação das imunoglobulinas no diagnóstico e tratamento de várias doenças.

O papel dos complexos imunes na ativação das vias clássica e alternativa do sistema complemento é explorado na terceira parte da obra. Os autores, após breve revisão sobre as vias de ativação, discorrem sobre os componentes do sistema complemento, com ênfase na proteína C1q (capaz de se ligar às regiões Fc de imunoglobulinas); discorrem ainda sobre as atividades biológicas que emergem da "cascata" do complemento.

A família de receptores de Fc de IgG (Fc R) existentes em membranas plasmáticas de leucócitos e que ao interagirem com complexos imunes desencadeiam vários tipos de respostas biológicas é o tema da quarta parte do livro. Acham-se descritos os recentes avanços no conhecimento tanto da estrutura dos Fc R, a nível de biologia molecular, como das relações entre estrutura e função destes receptores. Destacam-se ainda tópicos atualizados sobre a evolução dos genes que codificam os Fc R, os sítios da molécula de IgG que interagem com estes receptores e o papel dos Fc R nos mecanismos de endocitose.

A quinta parte é dividida em dois capítulos contendo uma atualização sobre as secreções mediadas pela interação de IgE e FcR de IgE. A estrutura e função do receptor de alta afinidade pela IgE, existente nas membranas de mastócitos e de basófilos é explorado no primeiro capítulo. As reações entre IgE e os receptores de baixa afinidade para esta imunoglobulina existentes nas membranas de fagócitos mononucleares, eosinófilos e plaquetas, assim como suas funções estimuladoras da liberação de mediadores biológicos, são tratadas no segundo capítulo.

A sexta parte da obra é dedicada aos mecanismos, anticorpos e FcR envolvidos na citotoxicidade celular mediada por anticorpos (ADCC).

A última parte, constituída por dois capítulos, explora o papel dos anticorpos e de complexos imunes na regulação da produção de anticorpos. Os FcR existentes em membranas de linfócitos (T e B), assim como os fatores solúveis, liberados por linfócitos ativados, ("immunoglobulin binding factors") que, ao interagirem com imunoglobulinas na

superfície de linfócitos B, atuam na regulação da produção de anticorpos acham-se descritos

Todos os capítulos incluem farta bibliografia e um resumo ou item de conclusões, muitas vezes acompanhado de comentários sobre as tendências-futuras de pesquisa na área abordada. Esta publicação representa o "estado da arte" no assunto e sua leitura será, sem dúvida, estimuladora para os

que se dedicam à Imunologia.

Dra. Lucia Mary Singer Vermes
Dept. de Imunologia
Instituto de Ciências Biomédicas
Universidade de São Paulo
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415
05508 - São Paulo - SP.

Lilacs

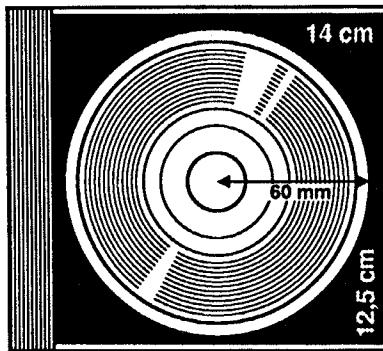
CD-ROM



*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.

GUIDELINES TO AUTHORS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

