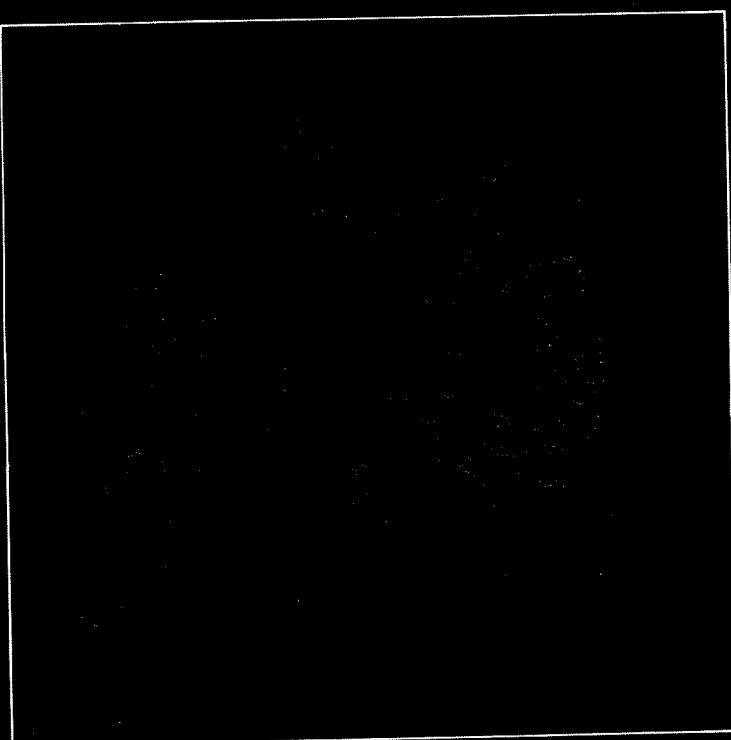


Revista de Microbiologia



SBM

**Sociedade
Brasileira de
Microbiologia**

São Paulo — Brasil

Volume 22 Número 2 Abr. - Jun. 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 agrupar 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: Datilografado 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 garantir 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.ejb.net

Lilacs

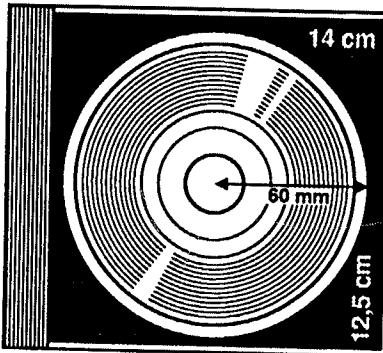
CD-ROM

Esta revista
está indexada na
Base de Dados
LILACS

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

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

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

**XVI - CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA
IX - SINAFERM
22 a 26 de Setembro de 1991
Parque Balneário Hotel - Santos - SP**

Informações: Sociedade Brasileira de Microbiologia
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
05508 — São Paulo — SP
Fone — (011) 813-9647

PROGRAMAÇÃO

Conferências

- Evolução e problemas da produção de insulina por fermentação.
- Epidemiologia molecular de leveduras.
- Recentes avanços no conhecimento da fisiologia da simbiose das leguminosas.
- Determinantes de virulência bacteriana.
- Utilização de sondas genéticas na identificação de patógenos veiculados por alimentos.
- Recentes avanços na elucidação de associações de bactérias diazotróficas com gramíneas e plantas tubérculos.
- A microbiologia e o controle das infecções hospitalares no Brasil.
- Genética de microrganismos e biotecnologia.
- Técnicas imunoquímicas para o diagnóstico das micoses.
- Problemas ligados à avaliação da transferência de oxigênio em processos fermentativos.
- Importância do estudo dos fatores de virulência de enteropatógenos de interesse médico-veterinário, com vistas ao controle de gastroenterites dos animais jovens.
- Aspectos atuais sobre taxonomia e identificação de cocos gram positivos.
- Associação micorrízica.
- Regulação metabólica microbiana.
- Genética da virulência bacteriana.
- Avaliação crítica das técnicas de ELISA para o diagnóstico de viroses de interesse médico-veterinário.
- Procedimentos atuais na prevenção e controle de micotoxinas.
- Importância da análise das águas de esgoto na vigilância epidemiológica de Salmonelas resistentes a antibióticos.
- Ocorrência de *Legionella* spp em amostras ambientais.
- The bacteria of Lower Respiratory Tract Infections, Incidence and Identification.
- The bacteria of Upper Respiratory Tract Infections, Incidence and Identification.
- Molecular systematics of yeasts.
- Patógenos emergentes em infecção hospitalar.
- Mecanismos da virulência de bactérias enteropatogênicas: adesão bacteriana.
- Utilização de sondas genéticas na identificação de patógenos veiculados por alimentos — perspectivas.
- Importância das técnicas de Biologia Molecular na detecção de patógenos em amostras ambientais.
- Micotoxinas produzidas pelo gênero *Fusarium*.
- Substâncias indutoras de radicais livres e seu efeito antimicrobiano.

MESAS REDONDAS — PAINÉIS

- Meningite meningocócica.
- Controle de processos fermentativos.
- Microbiologia ambiental: aspectos atuais e perspectivas.
- Leveduras patogênicas: fatores de virulência, de aderência e marcadores epidemiológicos.
- Disponibilidade e controle de qualidade dos reativos para o diagnóstico de doenças infecciosas de interesse médico-veterinário.
- Ensino de tecnologia de fermentações e engenharia bioquímica em graduação e pós-graduação.
- Técnicas de biotecnologia para o desenvolvimento de vacinas.
- Crescimento microbiano.
- Ensino da microbiologia: formação básica ou aplicada à profissão?
- Pesquisa em microbiologia na década de 90.
- Coleções de culturas e seus serviços à biotecnologia.
- Formação de profissionais em microbiologia do solo.
- Avaliação dos métodos analíticos para caracterização e dosagem de micotoxinas.
- Microrganismos deteriorantes de alimentos — Controle e aspectos econômicos
- Genética microbiana na investigação das infecções hospitalares.
- Aspectos da sensibilidade bacteriana a antimicrobianos.
- Novas técnicas para identificação e classificação dos microrganismos. Consistência e estabilidade em nomenclatura.
- O papel da microbiologia na política de desenvolvimento científico e tecnológico do país.
- Abordagem multidisciplinar para o desenvolvimento da microbiologia.
- *Vibrio cholerae* — um emergente desafio.

REUNIÃO DOS GRUPOS PARA ESTABELECIMENTO DA ATUAÇÃO CIENTÍFICA DA SBM

Microbiologia Médica Humana e Veterinária; Ambiental; Industrial; Micologia; Agrícola; Genética de Microrganismos; Infecções Hospitalares; Alimentos; Taxonomia e Coleções de Culturas; Solo; Micotoxinas.

ASSEMBLÉIA GERAL DA SBM

Propostas dos grupos de trabalho.
Eleição da nova diretoria.

APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS CIENTÍFICOS

Serão apresentados sob a forma de "posters". Os resumos devem ser enviados até 30/07/91, datilografados em folha branca de 21,5 cm x 28 cm, deixando 4 cm de cada lado da margem. O espaço reservado para o resumo será, em consequência, de 13,5 x 20 cm. Utilizar máquina IBM ou similar, esfera tipo "prestige de elite", espaço de 1,5 e para nomes científicos esfera tipo "light italic". Título do trabalho em letras maiúsculas, sobrenome dos autores e iniciais do nome; em linha separada, a instituição de origem. O resumo deve conter: pequena introdução justificando os objetivos do trabalho; metodologia e resultados. Enviar o resumo em 2 vias, sem dobrar, para:

Sociedade Brasileira de Microbiologia
(XVI Congresso Brasileiro de Microbiologia)
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
Cidade Universitária — USP
05508 SÃO PAULO SP

CURSOS PRÉ E PÓS-CONGRESSO

MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR APLICADOS À PESQUISA DE MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS EM ÁGUAS

Dra. Elisabeth Marques (CETESB)
Data: 20/09/91 (14 às 18h.) — Curso Teórico-Demonstrativo
Local: CETESB — São Paulo

ENGENHARIA GENÉTICA EM MICRORGANISMOS

Dra. Ana Clara G. Schenberg (USP)
Data:
Local: Depto. de Microbiologia — ICBUSP — São Paulo

CICLO DE ESTUDOS SOBRE AGENTES ETIOLÓGICOS DE INFECÇÕES DE INTERESSE MÉDICO-VETERINÁRIO (EM CONJUNTO COM A SOCIEDADE PAULISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA)

Dr. Silvio Arruda Vasconcelos (USP)
Data: 30/09 a 11/10/91 (19:30 às 22:30)
Local: Faculdade de Med. Vet. e Zootec. — USP

APLICAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA: IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS

Dra. Sally A. Meyer (USA)
Data: 19 e 20/09/91 (8 às 12:00)
Local: Depto. de Microbiologia — ICBUSP — São Paulo

TÉCNICAS USUAIS PARA IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS TOXICOGÊNICOS

Dr. Benedito Correa (USP)
Data: 19 e 20/09/91
Local: Depto de Microbiologia — ICBUSP — São Paulo

TÉCNICAS USUAIS PARA IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS PATOGÊNICOS

Dr. Benedito Correa; Dra. Claudete R. Paula; Dra. Valéria R. S. Framil; Dr. Walderez Gambale (USP)
Data: 16 a 17/09/91 — (Integral)
Local: Depto. de Microbiologia — ICBUSP — São Paulo

MÉTODOS FLUORESCENTES PARA DETECÇÃO E VIABILIDADE DE FUNGOS EM MATERIAIS CLÍNICOS

Dr. Benedito Corrêa; Dra. Claudete R. Paula; Dra. Valéria M. S. Framil; Dr. Walderez Gambale (USP)
Data: 18/09/91 (Integral)
Local: Depto de Microbiologia — ICBUSP — São Paulo

AVALIAÇÃO ECONÔMICA DE PROCESSOS FERMENTATIVOS

Dr. João Manuel Cabral de S. Dias (EMBRAPA)
Data: 19 e 20/09/91 — (8 às 12:00)
Local: Instituto de Tecnologia Mauá — São Caetano do Sul — São Paulo — SP

AIDS NA PRÁTICA ODONTOLÓGICA

Dr. Cesar A. Migliorati (USA)
Data: 18 a 20/09/91
Local: Depto de Microbiologia — ICBUSP — São Paulo

APLICAÇÕES INDUSTRIALIS DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS

Dr. Otto Jesu Crocomo (ESALQ — USP)
Dr. Enio Tiago de Oliveira (ESALQ — USP)
Data: 19 e 20/09/91 (8 às 12:00)
Local: Instituto de Tecnologia Mauá — São Caetano do Sul — SP

ANÁLISE DO DESEMPENHO DE FERMENTADORES

Dra. Maria Candida R. Facciotti (Poli-USP)
Data: 19 e 20/09/91 (14 às 18:00)
Local: Instituto de Tecnologia Mauá — São Caetano do Sul — SP

MÉTODOS QUÍMICOS E FÍSICOS DE ESTERILIZAÇÃO INDUSTRIAL

Dr. Augusto M. Ferraz (Johnson & Johnson)
Data: 19 e 20/09/91 (14 às 18:00)
Local: Instituto de Tecnologia Mauá — São Caetano do Sul — SP

IDENTIFICAÇÃO LABORATORIAL DE ESTREPTOCOCOS E ENTEROCOCOS

Dra. Lúcia Martins Teixeira (UFRJ) — Richard Facklam (USA)

Data: 9/09/91 a 12/09/91

Número de vagas: 10

Local: Deptº de Microbiologia Médica — Instituto de Microbiologia

Universidade Federal do Rio de Janeiro

MÉTODOS DE ESTUDO DA VIRULÊNCIA DE ENTEROPATÓGENOS BACTERIANOS

Dra. Tânia T. Gomes; Dra. Rosa M. Silva; Dra. Beatriz C. Guch (EPM)

Data: 30/09/91 a 1/10/91

Nº de vagas: 20

Local: Depto. de Microbiologia

Escola Paulista de Medicina

TESTES DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

Dra. Angela C. D. de Castro; Dr. Sérgio E. L. Fracalanza; Dra. Lúcia Martins Teixeira (UFRJ)

Data: 11/09/91 a 13/09/91

Nº de vagas: 10

Local: Depto. de Microbiologia Médica — Instituto de Microbiologia

Universidade Federal do Rio de Janeiro

FISIOLOGIA E BIOQUÍMICA DAS BACTÉRIAS FIXADORAS DE HIDROGÊNIO

Dra. Eliana G. Lemos; Dr. Manoel V. F. Lemos

Data: 16 a 19/09/91

Local: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária — UNESP

Campus de Jaboticabal

SOLUBILIZAÇÃO E MINERALIZAÇÃO MICROBIANA DOS COMPOSTOS INSOLÚVEIS DO FÓSFORO

Dr. Ely Nahas

Data: 16 a 19/09/91

Local: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária — UNESP

Campus de Jaboticabal

ENCONTRO E CURSO EM BIODEGRADAÇÃO E BIODETERIORAÇÃO

Dr. João Ruy Jardim Freire

Data: 29/07 a 9/08/91

Local: Depto. de Microbiologia de Solos — Faculdade de Agronomia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul — Porto Alegre

ENCONTRO E CURSO EM BIOTECNOLOGIA E MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS

Dr. João Ruy Jardim Freire

Data: 14/10 a 25/10/91

Local: Depto. de Microbiologia de Solos — Faculdade de Agronomia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul — Porto Alegre

Informações (0512) 36-2011 / 5011 / 4944 R. 58

NOVOS MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE COLIFORMES EM ÁGUAS DE CONSUMO

Dra. Vivian Helena Pellizari; Dra. Débora Midori Myaki (USP)

Data: 19/09/91 — (8 às 12 h.) — Curso Teórico-Demonstrativo

Local: Depto de Microbiologia — Instituto de Ciências Biomédicas da USP

UTILIZAÇÃO DO SISTEMA MICROTOX NO CONTROLE DE CONTAMINANTES TÓXICOS AMBIENTAIS

Dra. Maria Inês Z. Sato; Dra. Eloisa de V. Furlan (CETESB)

Data: 20/09/91 (8 às 12h.) — Curso Teórico-Demonstrativo

Local: CETESB — São Paulo

S.B.M. - SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA
BALANÇO PATRIMONIAL ENCERRADO EM 31 DE DEZEMBRO DE 1990

A T I V O

DISPONÍVEL

CIRCULANTE

Banco Econômico S/A	589.000,10
Banco do Brasil S/A - Jaguare	72.600,00
Banco do Brasil S/A - Jabaquara	118,07
	<u>661.718,17</u>

APLICAÇÃO FINANCEIRA

Aplic. Financ. Créd. Imob. Econômico	3.966.644,14
Aplic. Financ. Open Econômico	<u>820.000,00</u>
	<u>5.448.362,31</u>

Total Circulante

IMOBILIZADO

Máqs. aparlhs. e eqpts.	838.589,87
Móveis e utensílios	68.928,19
Direitos de uso da linha telef.	97.193,06
(-)Depreciação acumulada	<u>396.707,90</u>

Total do Imobilizado

TOTAL DO ATIVO

608.012,22

6.056.374,53

P A S S I V O

CIRCULANTE

IAPAS a recolher	22.320,00
FGTS a recolher	<u>4.200,00</u>
	<u>26.520,00</u>

Total do Circulante

PATRIMÔNIO LÍQUIDO

Superavit anterior	262.661,14
Correc. s/ saldo anterior superavit	3.892.342,25
(-)Déficit dos exrcs. anteriores	99.670,01
(-)Correc. s/ saldo ant. déficit	842.335,25
Superavit do exercício	<u>2.816.856,40</u>

Total do Patrimônio líquido

6.029.854,53

TOTAL DO PASSIVO

6.056.374,53

S.B.M. - SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA
BALANÇO PATRIMONIAL ENCERRADO EM 31 DE DEZEMBRO DE 1990

RECEITAS

Receita de anuidades e verbas	1.068.128,34
Receita c/ verbas revista/90	1.909.877,50
ENAMA	<u>691.628,37</u>
	3.669.634,21

RECEITAS FINANCEIRAS

Total das Receitas	7.586.171,29
--------------------	--------------

DESPESAS ADMINISTRATIVAS

Assistência contábil	138.415,77
Condução e transporte	2.566,00
Serviços de datilografia	26.980,53
Manutenção e conservação	94.350,23
Impressos e mats. de escritório	44.100,00
Lanches e refeições	3.112,98
Impostos e taxas	34.850,14
Total do Grupo	<u>(344.375,65)</u>

DESPESAS C/ REVISTA

Despesas c/ telefone	75.109,03
Impressos e mats. de escritório	875,00
Correio	203.063,28
Impressão de revista	878.553,39
Salários	307.472,50
13º salário	26.903,09
Previdência social	102.721,39
F.G.T.S.	34.358,79
Assist. contábil	121.962,00
Despesas c/ combustíveis	520,00
Xerox	<u>102.951,72</u>
Total do Grupo	(1.854.490,19)

DESPESAS FINANCEIRAS

Despesas bancárias	18.166,34
Juros, multas, corr. monet.	<u>686,56</u>
Total do Grupo	(18.802,90)

DESPESAS C/ ENAMA

	<u>(126.500,00)</u>
--	---------------------

IUMS

	<u>(95.783,93)</u>
--	--------------------

Lucro Operacional

	5.146.218,62
--	--------------

(-)CORREÇÃO MONETÁRIA DO BALANÇO

	<u>(2.329.362,22)</u>
--	-----------------------

Superavit do Exercício

	<u>2.816.856,40</u>
--	---------------------

RUY ANGÉLO CATANZARO
CRC. 104.268 - TEC. - S.P.

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA
VOLUME 22 ABRIL-JUNHO 1991 NÚMERO 2
REV. MICROBIOL. (S. PAULO), 22(2)

CONTEÚDO-CONTENTS

PÁG

Magalhães, M.; Magalhães, V.; Antas, M. G.; Tateno, S. Caracterização bacteriológica e sorológica de linhagens de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> isoladas de humanos e de ostras no Recife, Brasil Bacteriological and serological characterization of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> strains isolated from humans and oysters in Recife, Brazil	83
Siqueira, A. M. de; Silva, D. O. da Immunoidentification of <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> by demonstration of its specific antigen Imunoidentificação do <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> através da demonstração de exoantígeno específico	89
Avila-Campos, M. J.; Carvalho, M. A. R. de; Damasceno, C. A. V.; Chartone-Souza, E.; Cisalpino, E. O. Populational stability in species of the <i>Bacteroides fragilis</i> group, under mercuric chloride action Estabilidade populacional em espécies do grupo <i>Bacteroides fragilis</i> , sob a ação do bicloreto de mercúrio	93
Balen, L.; Silva, E. N. da; Cappellaro, C. E. M. P. D. M.; Gaviole, M. C.; Catroxo, M. H. B. Estudo da ultraestrutura das Cepas R e Conn-F de <i>Mycoplasma gallisepticum</i> Ultrastructure studies of R and F strains of <i>Mycoplasma gallisepticum</i>	97
De Gaspari, E. N.; Ghilliardi, A. C. R. <i>Neisseria Meningitidis</i> group B serotype 2a, 2c, 1: cross-reactivity of mouse antibody IgG, IgM and IgA response in immunoblot technique <i>Neisseria meningitidis</i> B sorotipos 2a, 2c, 1: Reatividade cruzada de anticorpos IgG, IgM e IgA de camundongos por "Immunoblot"	101
Gouveia, A. M. G.; Nozawa, C. M.; Araújo, H. Cell culture propagation of rotavirus from feces of diarrheic piglets Propagação de rotavírus em cultura células a partir de fezes de leitões com diarréia	108
Scarelli, E.; Genovez, M. É.; Rojas, S.; Bersano, J. G.; Schotten, M. H. S. S. Avaliação da presença de <i>Campylobacter</i> spp em suínos: sua relação com a ocorrência de distúrbios entéricos Evaluation of the presence of <i>Campylobacter</i> spp in swine: its relation with occurrence of enteric disorders	112
Carneiro, L. M. G.; Vianna, L. S. B.; Souza, E. C. Influência do pH, meio de cultura e inóculo no nível de resistência ao bicloreto de mercúrio em <i>Escherichia coli</i> Influence of pH, culture medium and inoculum size on mercuric chloride resistance in <i>Escherichia coli</i>	116

Leite, C. Q. F.; Lacava, P. M.; Yokoya, F.	
Emprego da membrana filtrante para enumeração rápida de <i>E scherichia coli</i> na clara e no ovo líquido	122
Membrane filtration technique for rapid enumeration of <i>Escherichia coli</i> in egg white and whole liquid egg	
Calderon, D. F.; Furlanetto, S. M. P.	
Isolamento de <i>Salmonella</i> em diferentes meios seletivos de enriquecimento, tempos e temperaturas de incubação	127
Dynamics of <i>Salmonella</i> isolation with tetrionate-novobiocin selenite cistine enrichment broth and modified Rappaport's medium	
Serrano, A. de M.; Junqueira, V. C. A.	
Crescimento de <i>Clostridium botulinum</i> em meios de cultura de <i>Clostridium perfringens</i> , em diferentes atmosferas anaeróbias e temperaturas de incubação	131
Growth and toxin production of <i>Clostridium botulinum</i> in media and conditions recommended for isolation of <i>Clostridium perfringens</i>	
Amaral, L. A. do; Nader Fº, A.; Iaria, S. T.	
Variação das características físico-químicas e microbiológicas das salmouras durante sua utilização na salga de queijos tipo minas "Frescal"	136
Variation of the physical, chemical and microbiological characteristics of brines during their utilization for salting Minas cheese	
Fiorentin, L.; Barioni Jr., W.	
Ação antifúngica do propionato de cálcio contra amostras de <i>Aspergillus</i> (grupo <i>flavus</i>) isolados de ingredientes e rações avícolas em Santa Catarina	141
Antifungal activity of calcium propionate against <i>Aspergillus</i> strains (<i>flavus</i> group) isolated from poultry feeds and ingredients in Santa Catarina State	
Melo, I. S.	
Antagonismo de espécies de <i>Trichoderma</i> contra <i>Sclerotinia minor</i> and <i>S. sclerotiorum</i> <i>in vitro</i>	147
Antagonism of <i>Trichoderma</i> species against <i>Sclerotinia minor</i> and <i>S. sclerotiorum</i>	
Ioneda, T.; Gameiro, R. U.	
Trehalose dimycolate as the major toxic lipid from <i>Rhodococcus bronchialis</i> grown on glycerol	151
Dimicilato de Trealose: principal constituinte lipídico tóxico de <i>Rhodococcus bronchialis</i>	
Almeida, R. M. A. de; Gambale, W.; Corrêa, B.; Paula, C. R.; Asevedo, I. G. de	
Mycoflora and aflatoxigenic species of <i>Aspergillus</i> spp isolated from rice	161
Monteiro, J. B. R.; Silva, D. O.; Moraes, C. A.	
Produção de biomassa proteica de <i>Trichoderma reesei</i> e <i>Rhizopus oligosporus</i> em bagaço de cana-de-açúcar	164
<i>Trichoderma reesei</i> and <i>Rhizopus oligosporus</i> growth in sugar cane bagasse for protein production	
Orelli, V. de F.D. M.; Amorim, H. V. de; Orelli Jr., A. A.; Oliveira, A. J.	
Efeito da remoção de células sobre o rendimento da fermentação alcoólica por levedura	170
Effect of the cells removal on the yield of alcoholic fermentation by yeast	
Schoenlein-Crusius, I. H.; Tauk, S. M.	
Fungal succession on <i>Ocotea pulchella</i> (Nees) Mez. leaves in decomposition on "cerrado" soil treated with vinasse	179
Successão fúngica em folhas de <i>Ocotea pulchella</i> (Nees) Mez. colocadas sobre o solo sob cerrado, tratado com vinhaça	

Tosetti, M. I. S.; Blanco, S. E.; Segovia, R. F.	
Transformation of pregnenolone in progesterone by <i>Rhodococcus rhodocrous</i> . Influence of different conditions for biomass obtainment in bioconversion	
Transformação de pregnenolona em progesterona por <i>Rhodococcus rhodocrous</i> . Influência das diferentes condições de obtenção de biomassa na bioconversão	184
Pelayo, J. S.; Saridakis, H. O.; Falcão, D. P.	
Isolamento de <i>Salmonella dublin</i> em leite cru, na região de Londrina-PR, Brasil	
Isolation of <i>Salmonella dublin</i> from raw milk in the region of Londrina - Parana, Brazil	189
Mol, C. G.; Avila-Campos, M. J.; Carvalho, M. A. R. de; Damasceno, C. A. V.; Cisalpino, E. O.	
<i>In vitro</i> susceptibility to four antimicrobial agents of strains of the <i>Bacteroides fragilis</i> group isolated in Brazil	191
Júnior, F. de A. L.; Siqueira Jr., J. P. de; Silva, J. C. da	
Survival of <i>Metarhizium anisopliae</i> to far UV light, 8-methoxysolaren plus near UV light and nitrous acid	
Sobrevivência de <i>Metarhizium anisopliae</i> à luz UV curta, 8-metoxipsoraleina associada à luz UV longa e ácido nitroso	194
Informações Técnico-Científicas (SBM)	196



CARACTERIZAÇÃO BACTERIOLÓGICA E SOROLÓGICA DE LINHAGENS DE *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* ISOLADAS DE HUMANOS E DE OSTRAS NO RECIFE, BRASIL

Marcelo Magalhães¹

Vera Magalhães²

Maria G. Antas¹

Seiki Tateno¹

RESUMO

O presente estudo compara as características bioquímicas, sorológicas, produção de hemolisina e resistência às drogas antimicrobianas de 20 linhagens de *Vibrio parahaemolyticus* isoladas de casos clínicos e de 24 obtidas de ostras. As características bioquímicas foram compatíveis com as esperadas, exceto no que concerne à produção de urease, observada em sete linhagens de origem humana. Quatro dessas culturas não produziram hemólise no ágar de Wagatsuma. Nenhum dos isolados de ostras produziu urease ou hemolisina. A tipagem sorológica, empregando-se 68 antisoros K, mostrou que cinco (25%) dos isolados clínicos e 10 (41,7%) dos isolados de ostras não puderam ser tipados. O sorovar predominante entre as cepas de origem humana foi 03:K58, encontrado em seis amostras, seguido dos sorovars 04:K53 e 04:K4 presentes em três e duas linhagens, respectivamente. Nenhum desses sorovars foi encontrado entre as cepas provenientes de ostras. Todas as culturas, exceto uma, isolada de ostra, foram resistentes à ampicilina. No que concerne às outras drogas: cefalotina, estreptomicina, neomicina, gentamicina, tetraciclina, cloranfenicol, cotrimoxazol, nitrofurantoína e lomefloxacină observou-se uniforme susceptibilidade.

Palavras-chave: *Vibrio parahaemolyticus*, diarréia a víbrio, víbrios ambientais, fenômeno Kanagawa

INTRODUÇÃO

O *Vibrio parahaemolyticus*, bactéria halofílica encontrada em águas costeiras e estuarinas (7), é capaz de causar gastroenterite humana, geralmente após o consumo de marisco ou peixe (2). O microrganismo tem distribuição cosmopolita (3) e, no Brasil, variados estudos evidenciaram sua presença em águas e animais marinhos (4, 11, 12, 13, 15, 23). Além disso, dois casos incidentais de infecção intestinal humana foram também relatados (11, 14).

No Recife, recente investigação prospectiva (25) mostrou que o *V. parahaemolyticus* é importante causa da diarréia do paciente adulto, concorrendo para a etiologia de 7,1% dos casos, e que 85% das ostras coletadas no estuário do Capibaribe, rio que margeia a cidade e que recebe seus esgotos, encontram-se contaminadas pelo microrganismo.

Desde que a ocorrência das infecções relacionadas com *V. parahaemolyticus* são intimamente associadas à presença da bactéria no ambiente (20), decidiu-se comparar as características bio-

1. Laboratório Keizo Asami, UFPE. Cidade Universitária, 50739, Recife, Brasil.
2. Departamento de Medicina Tropical, UFPE.

químicas, sorológicas e produção da hemolisina direta termoestável (HDT) entre as cepas de *V. parahaemolyticus* isoladas dos casos clínicos e aquelas recuperadas das ostras.

MATERIAL E MÉTODOS

Bactérias - Incluíram-se no estudo 20 culturas de *V. parahaemolyticus*, isoladas em laboratório privado de microbiologia, entre março 1989 e maio de 1990, de casos humanos de gastroenterite, e outras 24 isoladas de ostras. As culturas foram mantidas em sangue desfibrinado de coelho, a -70°C, até o momento do estudo.

Testes bioquímicos - As características bioquímicas das linhagens de *V. parahaemolyticus* foram determinadas usando-se testes padronizados (9). Tais testes incluíram: crescimento em caldo nutritivo na presença de 8% de cloreto de sódio e na ausência do sal; descarboxilação da lisina e ornitina; arginina desidrolase; produção de citocromoxidase e beta-galactosidase; reação de Voges-Proskauer; produção de urease, indol e fermentação de glicose, sacarose, lactose, arabinose, inositol, manitol, salicina e esculina. Os testes bioquímicos foram realizados em meios suplementados com 1% de cloreto de sódio e avaliados após 48h de incubação, exceto o teste da oxidase, que foi avaliado imediatamente, e o da betagalactosidase, após 12h.

Caracterização sorológica - No estudo sorológico seguiram-se recomendações técnicas previamente publicadas (8,10). Em resumo: as linhagens de *V. parahaemolyticus* foram cultivadas em ágar soja tripticase durante 18h, suspensas em salina e fervidas durante 1h. Em seguida, centrifugadas e o sedimento bacteriano usado nos testes de aglutinação, em lâmina, contra os antissoros O (de 01 a 011) para a determinação do sorogrupo. Culturas bacterianas não fervidas foram aglutinadas frente aos antissoros K (de K1 a K71) para a identificação do sorovar. Na análise antigênica empregaram-se antissoros polivalentes e monovalentes comerciais (Denka Seiken, Co. Japão).

Detecção e titulação da HDT - A capacidade de produzir HDT foi pesquisada em ágar de Wagatsuma (9,24), segundo Kelly & Stroh (21). Em linhas gerais, o teste consistiu em depositar na superfície do ágar, contendo eritrócitos humanos ou de cavalo, 1µl da cultura bacteriana, em caldo nu-

tritivo. As placas foram incubadas a 35°C, durante 24h, e as reações positivas traduzidas pelo aparecimento de estreito halo de hemólise beta, ao redor do inóculo, apenas nas placas contendo eritrócitos humanos. Hemólise em ambos os meios foi evidência de reação inespecífica. Além desse método, a HDT foi ainda titulada empregando-se um teste de aglutinação envolvendo partículas de látex revestidas com anticorpo específico antiHDT (Denka Seiken Co.). Na realização do teste obedeceram-se às instruções do fabricante.

Antibiograma - Os isolados de *V. parahaemolyticus* foram submetidos ao teste de susceptibilidade a 10 drogas antimicrobianas pelo método de Bauer & col. (5). As drogas e respectivas concentrações em µg/disco foram as seguintes: ampicilina (10), céfalotina (30), estreptomicina (10), ncomicina (30), gentamicina (10), tetraciclina (30), cloranfenicol (30), cotrimoxazol (25), nitrofurantoína (300) e lomefloxacina, uma nova fluoroquinolona (10). Os antibiógramas foram realizados em meio de Mueller-Hinton (Difco) não suplementado com cloreto de sódio.

RESULTADOS

Todas as cepas de *V. parahaemolyticus* isoladas, independentemente da proveniência, mostraram uniformidade de comportamento frente aos testes bioquímicos utilizados, exceto no que concerne à produção de urease. Esse caráter, todavia, restrinhou-se às linhagens de origem humana (Tabela 1).

As sete cepas urease positivas distribuíram-se em cinco diferentes sorovars; o mais frequente dos quais, o sorovar 04:K53, abrigou três delas. As cepas urease positivas, salvo uma, em contraste com as linhagens urease negativas, demonstraram fraca ou nenhuma atividade hemolítica (Tabela 3).

As 44 linhagens de *V. parahaemolyticus* sorotipadas foram repartidas entre 22 sorovars. Entretanto, não se pôde determinar o tipo de antígeno K em cinco (25%) cepas de origem clínica e em 10 (41,7%) das cepas de ostras. Apenas os sorovars 03:KNT; 05:KNT e 010:KNT (NT = não tipável) foram simultaneamente encontrados nas linhagens provenientes dos casos clínicos e das ostras. Todos os outros sorovars foram excluídos no que concerne à origem, isto é, ou foram encontrados em humanos ou em ostras (Tabela 2).

Houve absoluta concordância entre os métodos utilizados na detecção da HDT. Isto é, todas as

TABELA 1 - Características bioquímicas das linhagens de *V. parahaemolyticus* isoladas de humanos e de outras.

Teste	% de linhagens positivas		
	Previstos*	Humanas (n = 20)	Ostras (n = 24)
Oxidase	100	100	100
Arabinose	80	90	79,2
Esculina	1	0	0
Glicose	100	100	100
Inositol	0	0	0
Lactose	1	0	0
Manitol	100	100	100
Sacarose	1	0	0
Salicina	1	0	0
Arginina	0	0	0
Lisina	100	100	100
Ornitina	95	100	100
Indol	98	100	100
Beta-galactosidase	5	0	0
Urease	15	35	0
Voges-Proskauer	0	0	0
Cresc. em caldo contendo ClNa:			
0%	0	0	0
8%	80	95	95,8

* Porcentagem de reações positivas para *V. parahaemolyticus* usando-se os métodos de Farmer & col. [9]

TABELA 2 - Sorovars de *V. parahaemolyticus* isolados de humanos e de ostras.

Sorovar O:K	Humanos n=20	Ostras n=24	Total
01: K25	0	1	1
01: K32	0	2	2
01: K56	1	0	1
01: K64	0	1	1
01: KNT*	0	5	5
02: K22	0	2	2
03: K 5	1	0	1
03: K58	6	0	6
03: KNT	1	3	4
04: K 4	2	0	2
04: K10	1	0	1
04: K12	1	0	1
04: K53	3	0	3
04: KNT	1	0	1
05: K17	0	2	2
05: K30	0	1	1
05: KNT	1	1	2
08: K39	0	1	1
010: K42	0	2	2
010: KNT	2	1	3
011: K19	0	1	1
011: K22	0	1	1

* NT = não tipável

TABELA 3 - Associação entre sorovar, produção de urease e de HDT em cepas humanas de *V. parahaemolyticus*.

Sorovar	No. cepas	Urease	Hemólise	Látex
01: K56	1	+	+/-	1:8
03: K5	1	-	+	1:32
03: K58	6	-	+	1:16 - 1:128
03: KNT	1	+	-	0
04: K 4	2	-	+	1:32
04: K10	1	-	+	1:64
04: K12	1	-	+	1:32
04: K53	3	+	-	0
04: KNT	1	+	+	1:4
05: KNT	1	-	+	1:32
010: KNT	1	+	+/-	1:2
010: KNT	1	-	-	0

HDT = hemolisita direta termoestável.

NF = não tipável.

+= positivo.

- = negativo.

+/- = positivo fraco.

Culturas que produziram hemólise no ágar de Wagatsuma foram capazes de aglutinar as partículas de látex sensibilizadas com antiHDT, porém não se observou correlação entre faixa de hemólise e título aglutinante. Nenhuma das linhagens, isoladas de ostras, produziu hemólise no ágar de Wagatsuma ou aglutinou as partículas de látex, sensibilizadas pelo anticorpo antiHDT. Por outro lado, as linhagens de origem humana, exceto três urease positivas e uma outra urease negativa, foram reativas no ágar de Wagatsuma ou mostraram títulos aglutinantes, ao teste do látex, variando de 1:2 e 1:128 (Tabela 3).

Em relação à susceptibilidade às drogas antimicrobianas, todas as linhagens examinadas, exceto uma, proveniente de ostra, foram resistentes à ampicilina. Quanto às outras drogas testadas, observou-se uniforme susceptibilidade.

DISCUSSÃO

Do ponto de vista dos caracteres bioquímicos, nossos resultados mostraram que as cepas de *V. parahaemolyticus*, isoladas tanto dos casos clínicos como das ostras, exibiram, frente à maioria dos testes, comportamento semelhante ao previsto (9), exceto no que se refere à produção de urease, observada em sete cepas de origem humana pertencentes a cinco diferentes sorovars.

Linhagens urease positivas de *V. parahaemolyticus* vêm sendo reconhecidas, em variadas regiões, nos últimos anos. Assim, elas representam

ram 50% das cepas clínicas isoladas na Colúmbia Britânica, Canadá (21), e o biosorovar 04:K12 urease positivo foi o sorovar mais frequentemente encontrado na Costa Oeste dos Estados Unidos e México (1). O sorovar 04:K12 foi também detectado no Recife; a linhagem brasileira, todavia, foi urease negativa. As cepas americanas e mexicanas, diferentemente das nossas e das isoladas no Canadá (21), são Kanagawa positivas (1).

Os autores canadenses (21) sugeriram que a aquisição das cepas Kanagawa positivas ocorreu nos pacientes que viajaram aos trópicos. Entretanto, a região climática parece carecer de importância no que concerne àquele caráter, visto que algumas de nossas linhagens e outras isoladas no surto ocorrido nas ilhas Maldivas foram Kanagawa negativas (17). O que pareceu ocorrer nas nossas cepas e talvez naquelas isoladas no Noroeste do Pacífico (21) foi uma certa incompatibilidade entre produção da HDT e urease. Desde que os genes, responsáveis pela síntese da urease e da HDT, são cromossômicos (19, 21), é possível que em certas situações pudesse haver eventual bloqueio da expressão dos genes responsáveis pela síntese da HDT.

Em contraste com o que ocorre na Costa Oeste dos Estados Unidos e México (1), as cepas urease positivas de *V. parahaemolyticus*, isoladas no Recife, distribuíram-se em diferentes sorovars e três não puderam ser sorotipadas, apesar de termos empregado 68 anti-soros K. Isso indica que não houve aqui a disseminação de um único clone.

A inexistência de correlação entre os sorovars isolados dos pacientes e das ostras, agora observada, é fato comum na epidemiologia do *V. parahaemolyticus*, mesmo quando se procura estabelecer uma ligação entre determinado surto e o alimento responsabilizado como origem da doença (10). Na presente série, apenas linhagens pertencentes aos sorogrupos 03, 05 e 010 ocorreram simultaneamente em casos clínicos e em ostras. Todas elas, todavia, não tiveram seus抗ígenos K determinados, o que indica que elas podem não pertencer a idênticos sorovars. Ademais, a cepa de origem humana, do sorogrupo 03, e uma outra pertencente ao sorogrupo 010 foram ureolíticas, enquanto as isoladas das ostras foram urease negativas. Pertenceram, portanto, a diferentes biogrupos. Isso, associado ao fato de que todas as cepas isoladas das ostras não produziram HDT, sugere que a fonte de infecção dos moluscos não foi humana, mas ambiental, e que as ostras coletadas no estuário do Capibaribe não veicularam o *V. parahaemolyticus* para os nossos casos de gastroenterite.

O elevado número de linhagens (34%) cujos sorovars não puderam ser determinados, com os 68 antissoros K disponíveis, mostra a complexidade e diversidade antigênicas das cepas de *V. parahaemolyticus* ocorrentes nos trópicos e sugere a utilidade de novos estudos.

Diferentemente do que foi observado na Coréia (6) e Estados Unidos (21, 26, 27) e em concordância com as publicações japonesas (22, 24), nenhuma de nossas cepas isoladas de ostras produziu HDT.

Por outro lado, o encontro de quatro cepas Kanagawa negativas, e de duas outras exibindo baixa produção de HDT, confirma observações anteriores (16, 21) de que a HDT, responsável pelo fenômeno Kanagawa, não é indicador absoluto da patogenicidade do *V. parahaemolyticus*. Na verdade, o mecanismo de produção de doença pelo *V. parahaemolyticus* permanece ainda uma incógnita. Recentemente, demonstrou-se em cepa Kanagawa negativa, oriunda da epidemia ocorrida na República Maldivas, a produção de uma outra hemolisina, relacionada antigenicamente com a HDT, porém diferente do ponto de vista genético (17).

Concluindo: embora prevalente como causa de diarréia de adultos, no Recife, e eventualmente disseminado no rio Capibaribe com os esgotos, o *V. parahaemolyticus* não parece infectar as ostras ubíquas no estuário daquele rio. Na verdade, a dissimilaridade de sorovars ocorrentes nas linhagens isoladas dos casos clínicos e das ostras aponta para uma provável diversidade de origem.

SUMMARY

Bacteriological and serological characterization of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from humans and oysters in Recife, Brazil

We previously reported that *Vibrio parahaemolyticus* is an important cause of adult gastroenteritis in Recife. The present study compares the biochemical characteristics, serologic properties (O and K antigens), Kanagawa hemolysin production (using Wagatsuma agar and a latex test), and resistance to antimicrobial drugs of 20 clinical and 24 oyster cultures of that organism. Biochemical behavior of the clinical and oyster isolates was as expected and exhibited similar reactions, except with regards to urease. Seven (35%) of the human strains showed urease activity. There was some relationship between urease production and absence of hemolysis on Wagatsuma agar, that is, four

(57%) of urease positive strains were Kanagawa negative, whereas only one (7.7%) of the urease negative isolates did not show hemolysis. None of the oyster isolates produced urease or hemolysin. Typability into K antigen types showed that five (25%) human isolates and 10 (41.7%) strains recovered from oysters were untypable, despite 68 K antisera have been used. Observation of serovar distribution revealed that 03:K58 was most predominant with six strains among 15 typable human isolates, followed by 04:K53 (three strains) and 04:K4 (two strains). These three serovars were not recovered from oysters. In contrast with what has been observed elsewhere, the urease positive strains from Recife belonged to five different serovars. This suggests that here there was not the spreading of a single urease positive clone. The 44 strains of *V. parahaemolyticus*, recovered from human and oysters, were distributed among 22 different serovars. None of them were simultaneously identified in human and oyster isolates. This points out that the oyster collected in Capibaribe estuary were contaminated with environmental *V. parahaemolyticus* strains. All but one isolate, recovered from oyster, were resistant to ampicillin. Concerning the other drugs (cephalothin; streptomycin; neomycin; gentamicin; tetracycline; chloramphenicol; cotrimoxazole; nitrofurantoin; and lomefloxacin) there was uniform susceptibility.

Key Words: *Vibrio parahaemolyticus*, vibrio linked diarrhea, environmental vibrios, Kanagawa phenomenon.

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, proj. 416241/89, e pela Japan International Cooperation Agency, JICA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, S.L.; Powers, C.; Kaysner, C.A.; Takeda, Y., Ishibashi, M.; Joseph, S.W. & Janda, M. - Emergence of a restricted bioserovar of *Vibrio parahaemolyticus* as the predominant cause of Vibrio-associated gastroenteritis on the West Coast of the United States and Mexico. *J. Clin. Microbiol.* 27: 2891-2893, 1989.
- Barker, Jr.; W.H. - *Vibrio parahaemolyticus* outbreaks in the United States. *Lancet*, 1: 551-554, 1974.
- Barker, W.H.; Weaver, R.E.; Morris, G.K. & Martin, W.T. - Epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus* infections in humans. in: Schlessinger, D., ed. - *Microbiology* 1974. Washington, D.C. American Society for Microbiology, p. 257- 262, 1975.
- 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 standadized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45:493-496, 1966.
- Chun, B., Chung, J.K.; Seol, S.Y. & Tak, R. - *Vibrio parahaemolyticus* in the Republic of Korea. *Am. J. Trop. Med. and Hyg.*, 23: 1125-1130, 1974.
- Colwell, R.R. - Occurrence and biology of *Vibrio parahaemolyticus*. - In: Schlessinger, D., ed. - *Microbiology* - 1974, Washington, D.C., American Society for Microbiology, p. 230-240, 1975.
- Edwards, P.R. & Ewing, W.H., eds. - Identification of enterobacteriaceae. 3 ed. Minneapolis, Burgess Publishing, 1972.
- Farmer, J.J., III; Hickman - Brenner, F.W. & Kelly, M.T. - *Vibrio* - In: Lennette, E.H.; Balows, A.; Hausler, W.J., Jr., & Shadomy, H.J., ed. - *Manual of Clinical Microbiology*, 4 ed. Washington, D.C., American Society for Microbiology, p. 282-301, 1985.
- Fishbein, M. & Wentz, B. - Enumeration, laboratory identification, and serotypic analyses of *Vibrio parahaemolyticus*. In: Schlessinger, D., ed. - *Microbiology* - 1974. Washington, D.C., American Society for Microbiology, p. 246-256, 1985.
- Francia, S.M.C.; Gibbs, D.L.; Samuels, P. & Johnson, D. - *Vibrio parahaemolyticus* in Brazilian coastal waters. *JAMA*, 244: 587-588, 1980.
- Gelli, D.S.; Tachibana, T. & Silva, T.M.P. - Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras e outros produtos marinhos no Litoral de São Paulo, Brasil. Revisão e consideração sobre o risco potencial para a Saúde Pública. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 35/36: 9-15, 1975/76.
- Gelli, D.S., Tachibana, T. & Sakuma, H. - Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli* e de bactérias mesófilas em ostras. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 39: 61-66, 1979.
- Hofer, E. - Primeiro isolamento e identificação de *Vibrio parahaemolyticus* no Brasil de infecção gastrointestinal humana. *Rev. Microbiol.*, 14: 174-175, 1983.
- Hofer, E. & Silva, C.H.D. - Caracterização sorológica de amostras de *Vibrio parahaemolyticus* isoladas de peixes capturados no Litoral Brasileiro. *Rev. Microbiol.*, 17: 327-331, 1986.
- Honda, S.; Goto, I.; Minematsu, N.; Ikeda, N.; Asano, M.; Ishibashi, M.; Kinoshita, Y., Nishibuchi, M., Honda, T. & T. & Miwatani, T. - Gastroenteritis due to Kanagawa negative *Vibrio parahaemolyticus*. *Lancet*, 1: 331-332, 1987.
- Honda, T.; Ni, Y. & Miwatani, T. - Purification and characterization of hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon - negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. *Infect. Immun.*, 56: 961-965, 1988.
- Hug, M.I., Huber, D. & Kibria, J. - Isolation of urease producing *Vibrio parahaemolyticus* strains from cases of gastroenteritis. *Indian J. Med. Res.*, 70:549-553, 1979.
- Kaper, J.B.; Campen, R.K.; Seidler, R.J.; Baldini, M.M. & Falcow, S. - Cloning of the thermostable Direct or Kanagawa phenomenon-associated hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect. Immun.*, 45: 290-292, 1984.
- Kelly, M.T. & Stroh, E.M.D. - Temporal relationship of *Vibrio parahaemolyticus* in patients and the environ-

21. Kelly, M.T. & Stroh, E.M.D. - Urease-positive, Kanagawa-negative *Vibrio parahaemolyticus* from patients and the environment in the Pacific Northwest. *J. Clin. Microbiol.*, **27**: 2820-2822, 1989.
22. Miyamoto, Y.; Kato, T.; Obara, Y.; Akiyama, S.; Takikawa, K. & Yamai, S. - In vitro hemolytic characteristics of *Vibrio parahaemolyticus*: its close correlation with human pathogenicity. *J. Bacteriol.*, **100**: 1147-1149, 1969.
23. Rodrigues, D.P. & Hofer, E. - *Vibrio* species from the water-oyster ecosystem of Sepetiba bay in Rio de Janeiro, Brasil. *Rev. Microbiol.*, **17**: 332-338, 1986.
24. Sakazaki, R.; Tamura, K.; Kato, T.; Obara, Y.; Yamai, S. & Hobo, K. - Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. III. Enteropathogenicity. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, **21**: 325-331, 1968.
25. Magalhães, V.; Lima, A.R.; Tateno, S. & Magalhães, M. - Gastroenterites humanas a *Vibrio parahaemolyticus*, no Recife, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **33**: 64-68, 1991.
26. Twedt, R.M.; Novelli, R.E.; Spaulding, P.L. & Hall, H. - Comparative hemolytic activity of *Vibrio parahaemolyticus* and related vibrios. *Infect. Immun.*, **1**: 394-399, 1970.
27. Vanderzant, C. & Nickelson, R. - Procedure for isolation and enumeration of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl. Microbiol.*, **23**: 26-33, 1972.

Recebido para publicação em 11/07/90

IMMUNOIDENTIFICATION OF PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS BY DEMONSTRATION OF ITS SPECIFIC ANTIGEN

Antonio Martins de Siqueira *
Délvia Olimpio da Silva *

SUMMARY

Cultures of *Paracoccidioides brasiliensis* were serologically identified by the double immunodiffusion method by the demonstration of E₂ specific exoantigen. Five different media of cultures were used in order to select the best to produce the fungus specific exoantigen. Eighteen strains of *P. brasiliensis* were used. The exoantigen was extracted with physiological solution 20 days after the cultivation in solid medium at room temperature. The antigenic extracts were concentrated and analyzed by the double immunodiffusion method using rabbit antiserum specific for the E₂ antigen. The positivity of the isolates in relation to the antigen demonstration was the following: 100% for those cultivated in neopeptone agar, 61,1% in Sabouraud agar, 55,5% in BHI agar, 50,0% in tripticasein soy agar and 38,8% in potato agar.

Key Words: *Paracoccidioides brasiliensis*, immunoidentification, E₂ specific antigen, exoantigen.

INTRODUCTION

The mycological diagnosis of paracoccidioidomycosis is made by the *Paracoccidioides brasiliensis* demonstration in patients suspected of the disease. After microscopic examinations of tissues fragments or any other clinical material, not treated or after coloration, including the direct immunofluorescence method one can visualize the etiological agent (4,5).

Paracoccidioides brasiliensis identification is usually made by the association of its micromorphology in parasitary form or in a 37°C culture with macroscopic and microscopic aspects of the cultures placed at room temperature and the termo-dependent dimorphism. The correct characterization of the fungus may offer some difficulties for a

not very experient laboratory technician. Macroscopic aspect of the cultures as well as its growing speed may vary according to the isolate and the composition of the culture medium. The mycelial form has septated hypha that can produce intercalary clamidospores, arthrospores and arthroaleuriospores. In some situations *P. brasiliensis* presents no aerial mycelium or spores (1,5,8,11).

The possibility of fungi identification by the serological identification of their antigens, was investigated for the first time by Manych and Sourek in 1966 (6). The methodology presented some limitations, as an example, cross-reactions. Standard and Kaufman (12, 13) made use of the double immunodiffusion in order to characterize some pathogenic fungi with basis on the demonstrations of their specific exoantigens. The same authors (14) study-

* Departamento de Biologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Alfenas,
37130 Alfenas, MG, Brasil.
Research supported by FINEP and CNPq.

ing this method for *P. brasiliensis* identification were able to demonstrate the occurrence of specific exoantigens in the total of 78 isolates of the fungi.

In this paper we are presenting the serological identification of *P. brasiliensis* specific E₂ antigen after the fungus cultivation at room temperature in different culture media.

MATERIAL AND METHODS

Cultures of *P. brasiliensis* - Eighteen isolates of *P. brasiliensis* were used in this study. They came from the fungus collection of the Tropical Medicine Institute of the Faculty of Medicine of São Paulo University. The isolates were kept in Sabouraud agar through periodical cultivations.

Conditions to the exoantigen production and extraction - Every *P. brasiliensis* isolates were cultivated in Sabouraud agar, potato agar, tripticasein soy agar, brain heart infusion agar (B.H. I agar) and neopeptone agar. The latter is constituted by 2,4% of

neopeptone, 2% of glucose, 0,15% of asparagine, 0,01% of thiamin and 1,4% of agar. Small debris of the fungus samples were inoculated in all media of culture presented in inclined tubes (15mm x 150mm), and kept at room temperature during 20 days. After this period of time, the cultures were covered with 5 ml of physiological solution containing merthiolate in the concentration of 1:5000. After 48 hours the supernatant solution was collected, frozen and lyophilized. The lyophilization process went on until the moment it was reached a concentration from 20 times smaller than original volume (0,25 ml).

Antiserum production - Rabbit immune serum against the E₂ antigen was produced according to Green et al. (3). Briefly, 90 precipiti arcs obtained by immunoelectrophoresis using rabbit immune serum, related to the complex E₂ anti-E₂ antigen were cut, washed, and intradermically inoculated in 30 different sites on the dorsal region of adult male rabbits. The animals bloodletting were made when the antibodies titers were equal or superior to 1:32, using the double immunodiffusion method.

TABLE 1 - Distribution of the results obtained with the filtrates of mycelial cultures of 18 *P. brasiliensis* isolates as about the E₂ antigen presence demonstrated by the double immunodiffusion.

<i>P. brasiliensis</i> Isolates*	Cultures media				
	NA ^a	SA ^b	BHIA ^c	STA ^d	PA ^e
001	Positive	Positive	Positive	Positive	Negative
002	Positive	Positive	Positive	Negative	Positive
004	Positive	Negative	Positive	Negative	Negative
006	Positive	Negative	Positive	Positive	Negative
012	Positive	Negative	Negative	Negative	Negative
018	Positive	Negative	Negative	Negative	Positive
021	Positive	Positive	Negative	Negative	Negative
024	Positive	Positive	Negative	Negative	Negative
025	Positive	Negative	Positive	Negative	Negative
060	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive
101	Positive	Negative	Positive	Negative	Negative
113	Positive	Positive	Negative	Positive	Negative
130	Positive	Positive	Positive	Positive	Negative
150	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive
339	Positive	Positive	Negative	Positive	Positive
352	Positive	Negative	Negative	Positive	Positive
665	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive
666	Positive	Positive	Negative	Negative	Negative
Relation between Positivity/Isolates Studied		18/18	11/18	10/18	9/18
					7/18

* From fungus collection of the Tropical Medicine Institute of the Faculty of Medicine of São Paulo University.

a - Neopeptone agar

b - Sabouraud agar

c - Brain Heart Infusion Agar

d - Soy Trypticasein Agar

e - Potato Agar

Serological method - The micromethod of double immunodiffusion in agar gel was used. 3 ml agar, dissolved in 1% physiological solution, was distributed in glass slides (26mm x 76mm). One central and six peripheral, wells with 2mm of diameter were cut in the gel. All the wells were separated, one to other, by 5mm. The E₂-specific immune serum was dispensed through capillary tube in the central well and the peripheral ones were filled with the different antigenic extracts of *P. brasiliensis* cultures. The slides were incubated in wet chamber for 24 hours then immersed in a physiological solution overnight. Afterwards, they were dried, stained for 10 minutes in amido black 10B solution 0,4g in 100 ml 10% acetid acid), and destained in 5% acetic acid solution for 10 minutes.

RESULTS

The E₂ exoantigen was present in all 18 isolates of *P. brasiliensis* (Table 1). This result was demonstrated by the characterization of the immunocomplex formed in the double immunodiffusion. There were variations in the positivity related to the origin of the antigenic extracts. All the cultures made in neopeptone agar were positive in the identification of the specific antigen (100%), in Saubermann agar the positivity was observed in 11 samples (61,1%), in BHI agar in 10 samples (55,5%), in tripticasein soy agar in 9 samples (50%), and in potato agar only 7 samples (38,8%) were positive.

From the 18 isolates of *P. brasiliensis* included in this study, the positivity of all extracts obtained from five different media or culture, can be observed only in three samples (numbers 60,150 and 665).

DISCUSSION

The correct identification of *P. brasiliensis* depends on the demonstration of its temperature-dependent dimorphism as well as the microscopic and macroscopic aspect of the cultures in the mycelial and yeast-like forms. The process of reversion in the growing phase conditioned to temperature may be longer in some cases. There are strains of *P. brasiliensis* that not assume the characteristic morphology of growing mycelial, even under favourable temperature (7).

The demonstration of specific antigens by the double immunodiffusion method has been considered very efficient in the identification of patho-

genic fungi. The method is practical and can be easily executed even by people who do not have great experience in mycology and immunology.

The identification of *P. brasiliensis* by the characterization of specific antigen made by Standard and Kaufmann (14) was based on the presence of three antigenic fractions before described by Restrepo (10). Standard and Kaufmann in some cases found difficulties to individualize the three antigens (fractions 1,2 and 3) when analysed by double immunodiffusion. The immunoelectrophoretic characterization of *P. brasiliensis* antigens showed the presence of a specific fraction denominated E₂, which presents a remarkable immunogenic activity (15,16). The mentioned specific antigen seems to be the same as the one which takes part in the band 1 formation, identified by Restrepo (10) and the one described by Conti-Diaz et al (2).

Investigations made in poliacrilamide gel followed by autoradiography (9), reveal that the E₂ antigen can react with serum of patients with histoplasmosis and lobomycosis (glycoprotein 43 Kd). The concept of antigenic specificity is associated with the sensibility of the method employed, since the reactions of precipitation in gel of agar, this sensibility is not enough to demonstrate cross-reactions.

According to the results presented in this paper one can conclude that the cultivation of *P. brasiliensis*, at room temperature in neopeptone agar, followed by analysis of their exoantigen using the double immunodiffusion method make possible the correct identification of the fungus in period of 21 days. The method efficiency is associated with the utilization of the monospecific reference antiserum for the antigen.

RESUMO

Imunoidentificação do *Paracoccidioides brasiliensis* através da demonstração de exoantígeno específico.

Culturas de *Paracoccidioides brasiliensis* foram sorologicamente identificadas através do método da imunodifusão dupla, baseando-se na demonstração do exoantígeno específico E₂. Cinco diferentes meios de culturas foram utilizados com o propósito de selecionar o melhor para a produção do antígeno específico do fungo. Empregou-se 18 amostras do *P. brasiliensis*, sendo o exoantígeno extraído com solução salina após 20 dias de cultivo

em meio sólido à temperatura ambiente. Os extra-
tos antigenicos foram concentrados e analisados
pela imunodifusão dupla frente a soro de coelho,
específico para o antígeno E₂. A positividade das
amostras em relação a demons-tração do antígeno
foi de 100% para aquelas cultivadas em ágar neo-
peptona, 61,1% em ágar Sabouraud, 55,5% em ágar
infusão de cérebro e coração, 50,0% em ágar soja
tripticaseína e 38,8% para o cultivo em ágar batata.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*,
imunoidentificação, antígeno E₂ específico, exo-
antígeno

REFERENCES

1. Bustamonte-Simon, B; McEwen, J.G.; Tabares, A.M.; Arango, M. & Restrepo-Moreno, A. - Characteristics of the conidia produced by the mycelial form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Med. Vet. Mycol.*, 23: 407-414, 1985.
2. Conti-Diaz, I.A.; Mackinnon, J.E.; Calegari, L. & Casserone, S. Estudio comparativo de la immunolectroforesis (IEF) y de la immunolectroosmoforesis - inmunodifusión (IEOF-ID) aplicadas al diagnostico de la paracoccidioidomicosis. *Mycopathologia*, 63: 161-165, 1978.
3. Green, J.H.; Harrel, W.R.; Gray, S.B.; Johnson, J.E.; Bollin, R.C.; Gross, H. & Malcolm, G.B. - H and M antigens of *Histoplasma capsulatum*: preparations of antisera and location of these antigens in yeast phase cells. *Infect. Immun.*, 14: 826-831, 1976.
4. Lacaz, C.S. - *Paracoccidioides brasiliensis*. Morfologia. Ciclo evolutivo. Manutenção em vida saprofítica. Biologia. Virulência. Posição sistemática. In: Paracoccidioidomicose. Del Negro, G.; Lacaz, C.S. & Fiorillo, A.M. Sarvier. EDUSP, 1982.
5. Lacaz, C.S.; Porto, E. & Martins, J.E.C. - Paracoccidioidomicose. In: Micologia Médica. 7^a ed. Sarvier, 1984.
6. Manych, J. & Sourek, J. - Diagnostic possibilities of utilizing precipitation in agar for identification of *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis* and *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.*, 10: 74-84, 1966.
7. Moore, M. - A New species of the Paracoccidioides. Almeida (1930) *P. cerebriformis*, Moore (1935). *Rev. Biol. Hig.*, 6: 148-154, 1935.
8. Pollack, L. Aleuriospores of *P. brasiliensis*. *Mycopathologia*, 45: 217-219, 1971.
9. Puccia, R.; Schenkman, S.; Gorim, P.A.J. & Travassos, L.R. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis* identification of a specific antigens. *Infect. Immun.* 53: 199-206, 1986.
10. Restrepo, M.A. - La prueba de inmunodifusión en el diagnóstico de la paracoccidioidomicosis. *Sabouraudia*, 4: 223-230, 1966.
11. Restrepo, M.A. - A reappraisal of the microscopic appearance of the mycelial phase of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia*, 8: 141-144, 1970.
12. Standard, P.G. & Kaufmann, L. - Specific immunological tests for the rapid identification of members of the genus *Histoplasma*. *J. Clin. Microbiol.*, 3: 191-199, 1976.
13. Standard, P.G. & Kaufmann, L. Immunological procedure for the rapid and specific identification of *Coccidioides immitis* cultures. *J. Clin. Microbiol.*, 5: 149-153, 1977.
14. Standard, P.G. & Kaufmann, L. - A rapid and specific method for the immunological identification of mycelial form cultures of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Current Microbiol.*, 4: 297-300, 1980.
15. Yarzábal, L.A. - Anticuerpos precipitantes específicos de la blastomicosis sudamericana revelados por inmunolectroforesis. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 13: 320-327, 1971.
16. Yarzábal, L.A.; Bout, D.; Naquira F.; Fruit J. & Andrieu, S. Identification and purification of the specific antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* responsible for immunolectrophoresis band E. *Sabouraudia*, 15: 79-85, 1977.

Received for publication in 03/05/90

POPULATIONAL STABILITY IN SPECIES OF THE *BACTEROIDES FRAGILIS* GROUP, UNDER MERCURIC CHLORIDE ACTION

Mario Julio Avila-Campos¹
Maria Auxiliadora Roque de Carvalho¹
Carlos Américo Veiga Damasceno¹
Edmar Chartone-Souza²
Eduardo Osório Cisalpino¹

SUMMARY

The resistance of the *Bacteroides fragilis* group bacteria to heavy metals, particularly to mercury, is rarely reported. As a preliminary investigation on aspects of mercury resistance among these anaerobic bacteria, the present study has evaluated the stability of mercuric chloride resistance in human and marmoset *Callithrix penicillata* strains. It was shown that the resistance of all five tested strains were very stable either after ten successive subcultures or when each one of the 32 individual clones was submitted to the action of mercuric chloride. All the strains maintained in incubation for ten days, after the last subculture, showed MICs values twofold lower. This MICs decreasing observed could be related to the gradual loss of cellular viability, or to an increasing in cell vulnerability. CFU on that subculture determined by colony count show a decrease in the original cell number from 10^8 to 10^6 , approximately.

Key Words: *Bacteroides fragilis* group, Mercuric chloride, Resistance stability.

INTRODUCTION

The equilibrium of complex ecosystems, like the primate gastrointestinal tract, is intimately dependent on a diversified resident microbiota. In those ecosystems, species of the *Bacteroides fragilis* group represent an enormous population of the lumen microbiota from the large intestine (13), where they reach 30% of the fecal isolates in the human colon (14). These microorganisms show a great metabolic versatility, for they can use a variety of carbohydrates and proteins, produce mutagenic substances, inactive others, and produce bacteriocins.

It's well known that the majority of anaerobic infections is characterized by a complex flora that

is present in the infections sites from which species of the *B. fragilis* group are the anaerobic bacteria more frequently isolated (2,13).

B. fragilis group bacteria has been studied for their pathogenic potential and, principally, for their unusual multiple resistance to several antimicrobial drugs (1), and heavy metals (22), that can be transferred, intra and inter-species to other intestinal bacteria including Gram-negative facultatively anaerobic ones, e.g. *Escherichia coli* (19).

In facultative anaerobic organisms, heavy metal resistance mediated by plasmid have been extensively studied. In these organisms mercury resistance is usually present on plasmid carrying multiple antibiotic resistance genes (9). These genetic markers have been observed among the nor-

1. Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, Depto. de Microbiologia e
2. Laboratório de Genética, Depto. de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais,
CP. 2486, CEP. 30.161, Belo Horizonte, MG, Brazil.

mal amphibiotic microbiota as well as in clinical isolates.

Mercurial compounds resistance is a common plasmid-dependent property of both environmental and nosocomial bacteria (3,4,6). Broad-spectrum plasmids confer both organic and inorganic mercury resistance, while narrow-spectrum plasmids encode for Hg^{2+} resistance (5).

Several studies have demonstrated that transferable plasmids involved in antibiotics resistance could be carried by *Bacteroides* spp., but resistance of these microorganisms to heavy metals, particularly to mercury, is rarely reported in the literature (11, 12). In spite of that Riley & Mee (11) admitted that resistance to heavy metals in *Bacteroides* spp. would be intrinsic. Thus, as a preliminary investigation on aspects of mercury resistance among these Gram-negative anaerobic bacteria, the purpose of the present study was to evaluate the stability of mercuric chloride resistance in five human and non-human primate strains of the *Bacteroides fragilis* group.

MATERIAL AND METHODS

Microorganisms - Five strains of the *B. fragilis* group: two *B. fragilis* and one *B. distasonis* recovered, respectively, from human and marmoset (*Callithrix penicillata*) intestine and two reference ones, *B. fragilis* ATCC 23745 and *B. vulgatus* ATCC 8482, were used for the experiments. The isolates were identified according to Holdeman et al. (8) and Sutter et al. (18).

Susceptibility testing - The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined by an agar dilution method, described by Sutter et al (17) with a modification of the growth medium, by using a brain-heart infusion agar supplemented with hemin (0.5 μ g/ml) and yeast extract (0.5%).

Stock solution of mercuric chloride (10 mg/ml) (INLAB, São Paulo, Brazil) were prepared in distilled water and sterilized in Millipore 0.25 μ m, before performing the tests. Metal dilutions ranged from 128 to 0.25 μ g/ml. Before use, the agar plates, in duplicate, were dried at 37°C for 30 minutes.

The agar dilution test plates were inoculated with a Steers' replicator (15) resulting in a final inoculum of approximately 10^5 cell per spot. Plates without the metallic ion were used as control. The plates were incubated in anaerobic conditions (N_2 - 90%/CO₂ - 10%), at 37°C, for 48 h. The MIC

was defined as the lowest mercuric chloride concentration resulting in the absence of visible growth after 48 h of incubation at 37°C.

Stability testing - Both two human and one non-human tested strains, and also the two reference ones, were subcultured in brain-heart infusion broth supplemented with hemin (0.5 μ g/ml) and yeast extract (0.5%) in the absence of selective pressure, using the same incubation condition, for 24 h, for another MIC determination. This procedure was repeated ten-fold, each 24 or 48 h, as visible growth occurred.

Then, the MIC for each strain (last subculture) was again determined, and, with a platinum loop, aliquots were streaked on brain-heart infusion agar supplemented in the absence of selective pressure to obtain isolated colonies. After growth on BHI agar, 32 clones of each tested strain were grown in tubes with BHI broth, supplemented with hemin (0.5 μ g/ml) plus yeast extract (0.5%), and they all were individually submitted to MICs determination, using the same agar dilution method. On the other hand, those last broth subcultures were maintained in anaerobic conditions for more ten days, when another MIC determination was performed to observe the effects of a long term incubation period on mercuric ion susceptibility of the tested strains.

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows the MICs values as determined at the beginning, after ten successive subcultures,

TABLE 1 - "In vitro" activity of mercuric ion* against five parental *B. fragilis* group bacteria, and against 32 clones recovered from each tested strain.

Strain	Tested		
	Initial	After ten subcultures	32 clones ^a
<i>B. fragilis</i> ^b	8	8	8
<i>B. fragilis</i> ^b	8	8	8
<i>B. distasonis</i>	8	8	8
<i>B. fragilis</i> ATCC 23745	8	8	8
<i>B. vulgatus</i> ATCC 8482	4	4	4

* Breakpoint for mercuric ion, 2 μ g/ml.

^a MICs for 32 clones recovered from each tested strains.

^b Human strains.

^c Non-human strain.

and also the MICs for 32 clones recovered from each tested strain.

B. fragilis ATCC 23745 showed greater resistance when compared to *B. vulgatus* ATCC 8482 that was twofold more susceptible to the action of mercuric chloride.

On the other hand, all the strains maintained in incubation for ten days, after the last subcultures, showed MICs values twofold lower (data not shown). This MIC decreasing observed could be related to the gradual loss of cellular viability, or to an increasing in cell vulnerability. CFU on that subculture determined by colony count show a decrease in the original cell number from 10^8 to 10^6 , approximately.

It was also observed that the 32 clones, recovered from each tested strain, after the last growth (ten subcultures), showed MICs values similar to those initially determined. These data indicate that the resistance of the tested strains was very stable either after the ten successive subcultures or when each one of the individual 32 clones was tested for the action of mercuric chloride.

Studies on the stability of microbial resistance, including heavy metals, seems not to be reported in the literature. It is mentioned that bacteria that posses antimicrobial resistance mechanisms are eventually able to grow and multiply in the presence of gradually higher concentrations of antibiotics and heavy metals. It is suggest that both genetic and physiological bacterial factors could selectively suppress the susceptibility to the killing action of antibiotics (21). Since a bacterial population consists of different subpopulation of cells, there is much to be elucidate on these phenomena among *B. fragilis* group bacteria. These indigenous microorganisms in study, in their usual habitats, are constantly exposed to various antimicrobial agents, including heavy metals.

Genetic factors and ecological conditions can influence the survival of bacteria during treatment with beta-lactam antibiotics. It is to be established whether cyclic exposure to antibiotics selects "in vivo" tolerant mutants as it does "in vitro" (21). This phenomenon has, certainly, a great practical importance, and the studies must be extended to the heavy metals.

The literature on biochemical-physiological mechanisms of susceptibility and resistance of microorganisms to some chemical agents, such as heavy metals, is not convincing, but it is suggested that the phenomena could be mediated by chromosomes or by plasmids (10,12).

A variety of Gram-negative bacteria such as

Escherichia coli, *Salmonella typhimurium*, and *Pseudomonas* sp., carrying transferable plasmids, have showed resistance to mercuric ion (3,16).

Several studies have shown that *Bacteroides* spp. contain transferable plasmids associated with drug resistance (7,20) but whether or not heavy metal resistance in *Bacteroides* spp. is plasmid mediated, remains to be investigated, being possible, according to Riley & Mee (11) data, that heavy metals resistance in this microbial group would be intrinsic, rather than plasmid borne.

Certainly, although the stability of plasmids is a complex phenomenon, sensitive and resistant mutant strains could be used for the elucidation of genetic and physiologic aspects of this phenomenon, with taxonomic value.

These preliminary data are the basis for the evaluation of the presence and for the characterization of plasmids coding for mercury resistance in *B. fragilis* group bacteria, that are under way, and the stability of plasmids in plasmid-carrying cells.

RESUMO

Estabilidade populacional em espécies do grupo *Bacteroides fragilis*, sob a ação do bicloreto de mercúrio.

A resistência de bactérias do grupo *Bacteroides fragilis* a metais pesados, particularmente ao mercúrio, é pouco relatada. Como uma investigação preliminar sobre os aspectos da resistência ao mercúrio nessas bactérias anaeróbias, o presente estudo avaliou a estabilidade de resistência ao bicloreto de mercúrio em cepas humanas e de saguis *Callithrix penicillata*. A resistência de todas as cinco cepas testadas foi muito estável, após 10 subculturas sucessivas ou quando cada um dos 32 clones foi submetido à ação do bicloreto de mercúrio. Todas as cepas incubadas por 10 dias, após a última subcultura, mostraram os valores das CIMs duas vezes mais baixos. Este fato foi devido provavelmente, a uma perda gradual da viabilidade ou a um aumento na vulnerabilidade celular. UFCs nestas subculturas determinadas pela contagem do número de colônias, mostraram uma diminuição do número original de células de 10^8 para 10^6 , aproximadamente.

Palavras-chave: Grupo *Bacteroides fragilis*, bicloreto de mercúrio, estabilidade da resistência.

ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully acknowledge the technical assistance of Luzia Rosa Rezende.

This work was supported by grants from CNPq, FINEP, and CPq/UFMG.

REFERENCES

1. Bartlett, J.G.; Marien, G.J.R.; Dezfulian, M. & Joiner, M. - Relative efficacy of B-lactam antimicrobial agents in two animal models of infections involving *Bacteroides fragilis*. *Rev. Infect. Dis.*, 5: 338-344, 1983.
2. Brook, I. - Recovery of anaerobic bacteria in clinical specimens: a 12-year combined experience of two military hospitals. *J. Clin. Microbiol.*, 6:1181-1188, 1988.
3. Clark, D.J.; Weiss, A.A. & Silver, S. - Mercury and organomercurial resistances determined by plasmids in *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.*, 132: 186-196, 1977.
4. Foster, T. J. - Plasmid-determined resistance to antimicrobial drug and toxic metals in bacteria. *Microbiol. Rev.*, 47: 361-409, 1983.
5. Foster, T. J. - The genetics and biochemistry of mercury resistance. *Crit. Rev. Microbiol.*, 194: 117-149, 1987.
6. Gauthier, M.J.; Cauvin, F. & Breitmayer, J.P. - Influence of salts and temperature on the transfer of mercury resistance from a marine *Pseudomonas* to *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50: 38-40, 1985.
7. Guiney, D.C. & Davis, C.E. - Isolation of plasmid deoxiribonucleic acid from two strains of *Bacteroides*. *J. Bacteriol.*, 124: 503-510, 1975.
8. Holdeman, L.V.; Cato, E.P. & Moore, W.E.C. - *Anaerobic Laboratory Manual*, 4th ed., p. 52. Virginia, USA: Virginia Polytechnic Institute and State University, 1977.
9. Nakahara, H.; Ishikwa, T.; Sarai, Y.; Kondo, I. & Mitsuhashi, S. - Frequency of heavy-metal resistance in bacteria from patients in Japan. *Nature*, 266: 165-168, 1977.
10. Pan-Hou, H.S.K.; Hosono, M. & Imura, N. - Plasmids controlled mercury biotransformation by *Clostridium cochlearium* T-2. *Arch. Microbiol.*, 129: 49-52, 1980.
11. Riley, T. & Mee, B. - Susceptibility of *Bacteroides* spp. to heavy metals. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 22: 889-892, 1982.
12. Rudrik, J.T.; Bawdon, R.E. & Guss, S.P. - Determination of mercury and organomercurial resistance in obligate anaerobic bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 31: 276-281, 1985.
13. Salyers, A.A. - *Bacteroides* of the human lower intestinal tract. *Ann. Rev. Microbiol.*, 38: 293-313, 1984.
14. Savage, D.C. - Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Ann. Rev. Microbiol.*, 31: 107-133, 1977.
15. Steers, E.; Foltz, E.L. & Graves, B.S. - An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. *Antimicrob. Chemother.*, 9: 307-311, 1959.
16. Summers, A.D. & Silver, S. - Microbial transformation of metals. *Ann. Rev. Microbiol.*, 32: 637-672, 1978.
17. Sutter, V.L.; Barry, A.L.; Wilkins, T.D. & Zabransky, R.J. - Collaborative evaluation of a proposed reference dilution method of susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 16: 496-502, 1979.
18. Sutter, V.L.; Citron, D.M. & Finegold, S.M. - *Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual*, 3rd ed., p. 28. St. Louis, USA: C.V. Mosby, 1980.
19. Tally, F.P.; Syndman, D.R.; Gorbach, S.L. & Malamy, M.H. - Plasmid-mediated transferable resistance to clindamycin and erythromycin transferable resistance to clindamycin and erythromycin in *Bacteroides fragilis*. *J. Infect. Dis.*, 139: 83-88, 1979.
20. Tinnel, W.H. & Macrina, F.L. - Extrachromosomal elements in a variety of strains representing the *Bacteroides fragilis* group of organisms. *Infect. Immun.*, 14: 955-964, 1976.
21. Tuomanen, E.; Durack, D.T. & Tomasz, A. - Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 30: 521-527, 1986.
22. Wallace, B.L.; Bradley, J.E. & Rogolsky, M. - Plasmid analysis in clinical isolates of *Bacteroides fragilis* and other *Bacteroides* species. *J. Clin. Microbiol.*, 14: 383-386, 1981.

Received for publication in 09/11/90

ESTUDO DA ULTRAESTRUTURA DAS CEPAS R e CONN-F DE *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM*

Lourenço Balen¹
Edir Nepomuceno da Silva²
Clotilde E.M.P.D.M. Cappellaro³
Maria C. Gaviolle²
Marcia H.B. Catroxo³

RESUMO

A morfologia ultraestrutural celular foi estudada em duas cepas de *Mycoplasma gallisepticum*; a patogênica R e vacinal CONN-F. Muitas células da cepa R apresentaram formação de duas a três estruturas terminais tipo "bleb", por sua vez, a cultura de cepa vacinal, mostrou apenas uma dessa estrutura em cada célula. Comparativamente, foi observado áreas mais eletrodensas na superfície da membrana celular da cepa patogênica. O molibdato de amônio a 2,5%, permitiu melhor contraste negativo ao microscópio eletrônico de transmissão quando comparado com o acetato de uranila a 2,0% e fosfotungstato de potássio a 2,0%.

Palavras-chave: *Mycoplasma gallisepticum*, ultra-estrutura.

INTRODUÇÃO

O *Mycoplasma gallisepticum* (*M. gallisepticum*) apresenta a nível de ultraestrutura celular, uma formação externa com aspecto de uma bolha ("bleb"). Esta estrutura é constituída de fibrilas que se estendem ao longo da célula formando uma espécie de citoesqueleto primitivo (1 e 18). Além de se relacionar com a mobilidade do organismo (1, 3, 6 e 20), tem função no mecanismo de aderência (sítio) às células do hospedeiro (19 e 25). Outro aspecto que chama a atenção, a nível de ultraestrutura, nas células do *M. gallisepticum* é uma camada membranosa com aspecto de "lanugem", cobrindo total ou parcialmente a superfície celular. Embora a natureza química deste material ainda não totalmente elucidada, é provável que exerça papel na patogenicidade, por inibir a fagocitose ou facilitar a aderência à superfície das célu-

las do hospedeiro (20, 24 e 25). A virulência do *M. gallisepticum* pode estar relacionada com os sítios de aderência e a estrutura com aspecto de "lanugem" na superfície celular e a perda, total ou parcial deste caráter, pode ser acompanhada por modificações nestas estruturas. Neste trabalho são discutidos a nível de ultraestrutura, aspectos da morfologia celular das cepas: patogênica R e vacinal CONN-F de *M. gallisepticum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas duas cepas; a vacinal CONN-F (4, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 21), e a padrão patogênica R (8, 11, 15, 16, 21 e 22), ambas com número desconhecido de repicagem em laboratório. Foram cultivadas nos meios de cultura caldo e ágar Frey (10) conforme formu-

1. Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves (CNPSA) da EMBRAPA, Caixa Postal 21, CEP 89700 - Concórdia - SC.
2. Fac. de Med. Vet. e Zoot. da USP, Depto. de Patologia, CEP 05340 - São Paulo - SP
3. Inst. Biológico - Secção de Microscopia Eletrônica, CEP 04014 - São Paulo, SP.

lação descrita por Yoder (23).

As cepas eram mantidas em geladeira ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) na forma liofilizada. Foram reativadas pela semeadura em placa de petri contendo ágar de Frey e incubadas a 37°C em microerofilia por cinco dias. Cinco colônias isoladas foram clonadas e transferidas para tubos tamanho 13 X 100 mm com tampas rosqueadas de baquelite contendo três ml de caldo Frey. O cultivo foi adaptado ao meio de cultura através de passagens sucessivas. O experimento foi realizado com as culturas na fase logarítmica de crescimento (cultura de 24 horas).

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi realizada no microscópio marca Phillips EM 300*, na voltagem de 80kv. O método utilizado foi o da observação direta da cultura, por coloração negativa. O material foi preparado com telas de cobre "mesh", previamente cobertas por filme de colódio a 0,5% e estabilizadas por micropulverização de carbono. Três corantes foram testados para a coloração negativa: molibdato de amônio a 2,5%; e fosfotungstato de potássio a 2%. O preparo de cada tela foi feito colocando-se uma telinha para flutuar sobre uma gota de material, por um período de 10 minutos, sendo a seguir contrastadas, gotejando-se 8 gotas de corante; após a secagem, em estufa a 37°C , as preparações foram examinadas ao microcópico eletrônico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

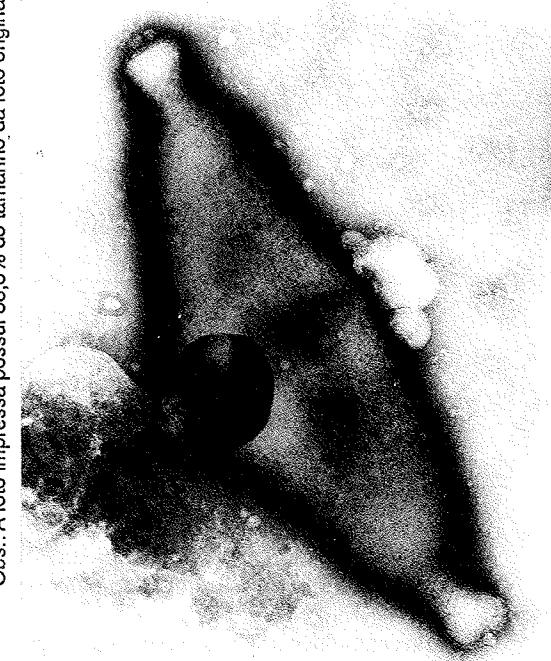
Este procedimento permitiu evidenciar duas ou três estruturas terminais (sítios de aderência) na maioria das células da cepa patogênica R (Figuras 1, 2 e 3). Nas células da cepa vacinal CONN-F não foram observadas células com mais de uma destas estruturas (Figura 4).

Também ficou evidenciado nas células da cepa patogênica R, nas áreas eletrodensas da porção externa da membrana, a presença de "lanugem" (Figura 1). Esta estrutura apresentava menor intensidade na cepa vacinal CONN-F (Figura 4).

A presença de "bleb" e estruturas eletrodensas tipo "lanugem" já tinham sido sugeridas como fatores de virulência de *Mycoplasma* (1, 6, 10, 18 e 23). Os resultados deste trabalho ratificam os achados destes autores em relação a presença de "bleb" e estrutura tipo "lanugem" nas células.

A ocorrência de mais de um "bleb" observado

FIGURAS 1, 2, 3 - Células de *M. gallisepticum* cepa R mostrando duas e três estruturas do tipo "bleb", A = 81.100, 71.200 e 64.700 respectivamente.



Obs.: A foto impressa possui 88,8% do tamanho da foto original



Obs.: A foto impressa possui 90% do tamanho da foto original

* Secção de Microscopia Eletrônica do Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo, SP.



FIGURA 4 - Células de *M. gallisepticum* cepa CONN-F mostrando uma única estrutura tipo "bleb" e áreas eletrodensas menos pronunciadas. A = 128.500.

Obs.: A foto impressa possui 88,8% do tamanho da foto original

Obs.: A foto impressa possui 85,7% do tamanho da foto original

somente nas células da cepa R neste trabalho, pode ser um dos fatores que determina sua maior patogenicidade, tendo em vista a sua maior capacidade de adesão nos tecidos do hospedeiro (19). Deve-se ressaltar no entanto, que isto pode ser uma expressão fenotípica ou um estado de pré-divisão celularconforme sugere estudos anteriores (2). A presença nas células dos micoplasmas parece também ser importante na propriedade hemaglutinante deste microorganismos, visto que, são estes sítios que aderem nos eritrócitos (19).

Os achados anteriores (6, 10 e 18) sobre a presença da estrutura com aspecto de "lanugem" no *M. gallisepticum* foi ratificada neste estudo. Esta estrutura foi visualizada nitidamente nas áreas eletrodensas da superfície externa da membrana das células da cepa patogênica R. A pouca evidência desta estrutura observada na cepa CONN-F, vem reforçar o argumento que a "lanugem" também contribui no grau de determinação de virulência das cepas de *M. gallisepticum*. É importante ressaltar que outros fatores devem contribuir na determinação do grau de virulência destes microorganismos como a participação de toxinas.

A melhor constatação negativa foi obtida com o molibdato de amônio. O acetato de uranila e o fosfotungstato de potássio não permitiu imagens satisfatórias das células na microscopia eletrônica.

O fato do molibdato de amônio ter possibilitado melhorar a contrastação negativa, se comparado com o acetato de uranila e fosfotungstato de potássio, sugere que estes corantes atuam de forma diferenciada sobre a membrana celular destes microrganismos.

Concluindo podemos afirmar que a maioria das células da cepa patogênica R de *M. gallisepticum* mostrou duas ou três estruturas tipo "bleb", enquanto que nas células da cepa vacinal CONN-F foi observado somente uma destas estruturas. As células da cepa patogênica R apresentam áreas eletrodensas na membrana externa de maior intensidade da ultraestrutura tipo "lanugem" se comparada com as células da cepa vacinal CONN-F.

O corante molibdato de amônio à 2,5% ofereceu a melhor contrastação negativa da ultraestrutura celular do *M. gallisepticum*.

SUMMARY

Ultrastructure studies of R and F strains of *Mycoplasma gallisepticum*

The cellular ultrastructure of R and F strains was studied using transmission electron microscopy. Cells from the pathogenic R strain showed two

or three bulbous tipped structures with bleb appearance. The vaccines non-pathogenic F strain on the average had only one these structures on the cell. Both strains showed an electron-dense thickening associated with the cell membrane. The thickening was more pronounced in the R strain. Amonium molybdate negative staining at a 2,5% concentration was the preferred technique as opposed the either uranyl acetate or potassium photungstate at 2,0% concentrations.

Key Words: *Mycoplasma gallisepticum*, ultrastructure

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Biberfeld, G. & Biberfeld, P. Ultrastructural features of *Mycoplasma pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, **102**: 855-61, 1970.
2. Boatman, E.S. Morphology and ultrastructure of the mycoplasmatales. In: Barile, M.F. & Razin, S., eds. *The mycoplasmas*, New York, Academic Press, v.1, p. 63-102, 1979.
3. Bredt, W. Motility. In: Barile, M.F. & Razin, S., eds. *The mycoplasma*, New York, Academic Press. v.1, p.141-55, 1979.
4. Branton, S.I. & Deaton, J. W. Egg production, egg weight, eggshell strength, and mortality in three strain of commercial vaccinated with F strain *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.*, **29**: 832-7, 1985.
5. Carpenter, T.F.; Mallison, E.T.; Muller, K. F.; Gentry, R.F. & Schwartz, L.D. Vaccination with strain *Mycoplasma gallisepticum* to reduce production losses in layer chickens. *Avian Dis.*, **25**: 404-9, 1981.
6. Collier, A. & Clyde, W. Model systems for studing the pathogens of infection causing bronchiolites in man. *Pediatr. Res.*, **11**: 243-6, 1977.
7. Cumings, T.S. & Kleven, S.H. Evaluation of protection against *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens vaccinated with the F strain of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.*, **30**: 169-71, 1986.
8. Cunningham, D.L. & Oslo, N.O. *Mycoplasma gallisepticum* vaccination of birds in a multiple-age laying flock. *Poul. Sci.*, **57**: 1131-2, 1978.
9. Fabricant, J. & Levine, P.P. Infection in young chickens for the prevention of egg transmission of *Mycoplasma gallisepticum* in breeders. In: World Veterinary Congress, **17**, Hannover, Proceedings, p. 1963.
10. Frey, M.C.; Hanson, R.P. & Anderson, D.O. A medium for the isolation of avian mycoplasma. *Am. J. Vet. Res.*, **29**: 2163-71, 1968.
11. Glisson, J.R. & Kleven, S.H. *Mycoplasma gallisepticum* vaccination: Effects on egg transmission and egg production. *Anim. Dis.*, **28**: 406-15, 1984a.
12. Glisson, J. R. & Kleven, S. H. *Mycoplasma gallisepticum* vaccination: Further studies on egg transmission and egg production. *Avian Dis.*, **29**: 408-15, 1984b.
13. Kleven, S.H. Summary of laboratory studies on the F strain of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.*, **27**: 337-8, 1983.
14. Levishon, S. & Kleven, S.H. Vaccination of chickens with non-pathogenic *Mycoplasma gallisepticum* as a means for displacement of pathogenic strains. *Isr. J. Med. Sci.*, **17**: 669-73, 1981.
15. Levishon, S., Glisson, J.R. & Kleven, S.H. In ovo pathogenic of *Mycoplasma gallisepticum* strains in the presence and absence of maternal antibody. *Avian Dis.*, **29**: 188-87, 1985.
16. Lin, M.Y. & Kleven, S.H. Correlation of titter preservation method starage of *Mycoplasma gallisepticum* F strain and the immune repouse in chickens. *Avian Dis.*, **28**: 273-7, 1983.
17. Lin, M.Y. & Kleven, S.H. Evaluation the *Mycoplasma gallisepticum* as vaccines in young chickens. *Avian Dis.*, **28**: 88-99, 1984.
18. Meng, K.E. & Pfister, R.M. Intracellular strutures of *Mycoplasma pneumoniae* revealed after membrana removel. *J. Bacteriol.*, **144**: 390-9, 1980.
19. Razin, S.; Banai, M.; Gamaliel, H.; Poliack, A.; Bredt, W. & Kahane, I. Scanning electron microscopy of mycoplasma adhering to erythrocytes infec. *Inf. Immun.*, **30**: 538-46, 1980.
20. Razin, S. & Freundt, I. The mycoplasma. In: Krieg, N.R. ed. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9.ed. Baltimore, Willians & Wilkins, p. 470-73, 1984.
21. Rodriguez, R. & Kleven, S.H. Evaluation of vaccine against *Mycoplasma gallisepticum* in commercial broilers. *Avian Dis.*, **24**: 879-89, 1984.
22. Yoder, H.W. Jr. Sorologic response of chickens vaccinatated with inactivated preparations of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.*, **23**: 493-506, 1979.
23. Yoder, H. W. Jr. Avian Mycoplasmosis. In: Hofstad, M.S., eds. Diseases of poultry. 8 ed, Ames, the Iowa State Univ. Press, p. 187- 2208100 = 128.500.
24. Wilson, M.H. & Gollier, A.M. Ultrastructural study of *Mycoplasma pneumoniae* in organ culture. *J. Bacteriol.*, **125**: 332-39, 1976.
25. Zucker-Franklin, D.; Davidson , M. & Thomas, L. The interaction of mycoplasmas with mammalian cells i hela cells, neutrophilus and eosinophilus. *J. Exp. Med.*, **124**: 521-31, 1966.

Recebido para publicação em 21/01/91

Lourenço Balen nasceu em Aratiba - RS a 28 de julho de 1944 e faleceu no dia 31 de dezembro de 1990. Exercia suas atividades profissionais no Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves, da EMBRAPA em Concórdia. Biólogo formado pela Faculdade de Ciências Biológicas da Fundação Educacional do Alto Uruguai Catarinense, Mestre em Microbiologia pelo Instituto de Ciências Biomédicas da USP e este trabalho integra parte de sua tese de doutorado.

**NEISSERIA MENINGITIDIS GROUP B SEROTYPE 2a, 2c, 1:
CROSS-REACTIVITY OF MOUSE ANTIBODY IgG, IgM AND IgA RESPONSE
IN IMMUNOBLOT TECHNIQUE**

Elizabeth Natal De Gaspari¹
Angela Cristina Rodrigues Ghillardi²

SUMMARY

Group B meningococci have been subdivided into a series of serotypes based upon the antigenic specificity of protein present in their outer membranes. Antigens of *N. meningitidis* B serotypes 2a, 2c, 1 were extracted with 0,2 M LiCl. The antigens were analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electroforesis (SDS-PAGE), and by the specific antibody raised in Balb/c mice immunized with antigens from the outer membrane or whole organisms. The reactivity against polipeptides from the *N. meningitidis* was determined by immunoblot, and the level of antibodies to bacterium outer membrane in the serum by immunodot. The immunonblot technique showed that antigens from outer membrane of *N. meningitidis* B induced the production of IgG, IgM and IgA antibodies which cross-reacted with epitopes present in *N. meningitidis* serogroups C, and A, both isolated from patients with meningococcal septicemia.

Key Words: *Neisseria meningitidis*, Immunoblot, Cross reactivity, Outer Membrane Components.

INTRODUCTION

In spite of considerable sucess in the development of drugs and vaccines, the problem of disease due to *Neisseria meningitidis* is far from being solved.

The continuing incidence of life-threatening meningococcal infections in both developed and developing countries emphasizes the need for an effective vaccine against *N. meningitidis*. Observations that meningococcal infections or carriages elicit protective antibodies directed against surface components such as capsule and outer membrane proteins (OMP) (7) point out these antigens as po-

tential vaccine candidates. Polysaccharide capsules responsible for serogroup specificity of meningococci and purified capsular vaccines have proven to be of same value against most meningococci serogroups (10). However, the immunogenicity of these polysaccharides is reduced in infants (11), who are most susceptible to infection. Group B polysaccharides are poorly immunogenic even in adults (17), constituting a particular problem since group B strain is the most common cause of meningococcal meningitis.

The chemical nature of *N. meningitidis* serotype antigens was determined by a combination of immunodiffusion and sodium dodecyl sulfate gel

1. Laboratórios de Imunologia
2. Coleção de Cultura
Instituto Adolfo Lutz, Avenida Dr. Amaldo 351, 11º andar, CP 7027, 01246 São Paulo-SP, Brasil.

electroforesis (6, 15), and recently with monoclonal antibodies (9). Serotype 2 can be divided into three related types called 2a (originally serotype 2), 2b and 2c. The specific antigens being proteins have molecular weights of 41,000, 41,500 and 41,500, respectively. Serotype 2b was present in about half of the serogroup B and small part of serogroup C strains isolated from patients with meningitis, but absent in serogroup B and C strains from carriers.

Invasive group B meningococcal disease induces the formation of bactericidal antibodies directed against the cell surface outer membrane proteins (6). Although serogroups B and C have been divided into 20 different serotypes based upon immunological differences in the class 2 or 3 major outer membrane proteins (6), most outbreaks of group B disease have been caused by relatively few serotypes (3,5). Zollinger (18) found most of the bactericidal antibodies resulting from carriage of group B meningococci was directed against the cell membrane proteins, and little against the polysaccharides or capsular polysaccharides.

When the antiserum against a *N. meningitidis* serotype reaches a satisfactory precipitating antibody titer, preabsorption becomes necessary with an equivalent volume of packed meningococci of others serotypes in order to remove all the cross reacting antibodies found in this antiserum (7).

The objective of the present study was to define antibody specificity in the sera of immune mice on the basis of their reactivity with bacterial antigens, in an attempt to obtain better basis about bacterial antigens, with potential interest for vaccines. The complex polypeptide mixture of each *N. meningitidis* group was separated into individual polypeptides by electrophoresis on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels, and transferring these onto a nitrocellulose paper (immunoblot). Antibodies that bound to individual polypeptides were visualized with peroxidase-labelled IgG, IgM and IgA antisera.

MATERIALS AND METHODS

Strains and growth conditions

The prototype meningococcal B strains M1080 (serotype 1), B16B6 (serotype 2a), M 2396 (serotype 2c), were kindly provided by Dr. Carl Frasch FDA, USA. Meningococci serogroups B, C and A were isolated from patients with meningococcal septicemia and kept freeze drying at culture collection of Adolfo Lutz Institute. Meningococci were thawed and cultured on agar plates at 37°C in at-

mosphere with, 5% CO₂ and 80% humidity, for 18 h. Large masses of cells (6) were then inoculated in 1 litre of Trypticase Soybroth (TSB), and incubated at 37°C with shaking during 18 hours.

Preparation of antisera

Two month old Balb/c mice were first immunized by subcutaneous injection with 20 µg of antigen of outer membrane of meningococcal strains M1080 (serotype 1), B16B6 (serotype 2a), M2396 (serotype 2c) suspended in Freund complete adjuvant. Afterwards the immunization was repeated twice in fifteen days of intervals with 20 µg of the same inoculum in PBS (0.01 M phosphate buffered saline pH 7.2, with no adjuvant, intravenously).

Fourty five days after immunizatio the mice were bled from the axilar plexus. The sera was pooled inactivated at 56°C for 1h and kept frozen in small aliquots at 70°C.

Isolation of bacterial outer membrane antigens

Wet weight cells approximately 1g, grown overnight in TSB medium were washed once with 0.15 M NaCl, resuspended in 10 ml 0,2 M LiCl, and extracted at 45°C for 2h. Glass beads (6mm diameter) were added to maintain an uniform cell suspension during agitation process on a rotary shaker. The cell suspension was centrifuged at 12,000 g at 4°C for 20 min, and the supernatant centrifuged again at 30,000 g at 4°C for 40 min to pellet any large membranous material. The outer membrane antigens were recovered by centrifuging the supernatant at 100.000 g for 2h. The resulting pellet was washed twice in distilled water, repelleted by centrifugation at 100,000 g, and resuspended in 0,5 ml distilled water. Protein content of distilled water suspension was determined by the method of Lowry (12).

Dot immunobinding assay

The antibody titer against outer membrane antigens were quantified by an enzymatic dot immunobinding assay. The application of antigen was done as a spot onto nitrocellulose filters 0,45 µc (Millipore). The amount of antigen in 1µl corresponded to 1µg protein of bacterial outer membrane. All the procedures were carried out at room temperature and all working solutions were made using TBS [50 mM NaCl buffered with Tris (hy-

droxymethyl) aminomethane, pH 7.5]. Nitrocellulose sheets were blocked with 5% (w/v) skimmed milk (Nestlé do Brasil) for 2h and rinsed twice in TBS. Serum samples were diluted in 96 plastic plate wells, to which dotted antigens strips were firmly clamped and incubated on a rocking platform for 2h. The strips were rinsed in TBS and covered with peroxidase labelled goat anti-mouse IgG, IgM and IgA (Cappel, Cooper Bio Medical Inc., Malvern, PA) at 1/1000 (v/v) dilution for 2h. After rinsing in PBS, the strips were visualized by adding freshly prepared solution containing H₂O₂ (30%) and 4 chloro-1-naftol in TBS. The strips were rinsed, dried and scored according to the intensity of reaction. The last serum dilution still providing a discernible blue spot was considered its titre. Normal mouse sera (pooled) from the studied strains were consistently negative at dilutions as low as 1/5.

SDS-PAGE and western transfer

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed as describe by Laemmli (13) on 10% (w/v) of acrylamide. For immunoblot, whole bacteria were recovered and suspended in phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2, to an optical density of 0.6 at 540 nm (1). Samples containing 1.5 ml this standardized suspension were transferred to microfuge tubes and centrifuged for 5 minutes and the pellets resuspended in 100 µl of PBS. This concentrated suspension was added to a solubilization buffer comprising 4% sodium dodecyl sulfate, 4% 2-mercaptethanol, 20% glycerol and 1.25 M Trishy-

drochloride (pH 6.8), (v/v).

Apparent molecular weights of separated cell componentes were determined by comparing migrations of these with that of molecular weight markers (Pharmacia Fine Chemicals, Inc.). Transfer of eletrophoretically separated proteins to the nitrocellulose was performed as reported by Towbin (16). Briefly, nitrocellulose was cut into vertical strips, blocked with 5% (w/v) skimmed milk (Nestlé de Brasil) at room temperature (RT) for 2h, overlaid with mouse serum in TBS at 4°C for 12h and incubated with peroxidase -labelled goat anti-mouse IgG, IgM and IgA (Cappel, Cooper Biomedical Inc., Molven, PA) for 2h. After rinsing in PBS, the strips were incubated with 4 - chloro-1-naphthol and H₂O₂ in TBS, dried and read by visual inspection.

RESULTS

Antibody levels to *Neisseria meningitidis* B

IgG, IgM and IgA antibodies against *N. meningitidis* B, were detected by a sensitive dot-immunobinding assay (Table 1).

SDS-PAGE and immunoblot

The antigens present in outer membrane of *N. meningitidis* B used in immunization of Balb/c mice can be seen in the (Figure 1), where the polypeptides was separated by SDS-PAGE. Gels were stained with Coomassie brilliant blue (4).

The figure 2 shows the patterns of recognition obtained for IgG, IgM and IgA isotypes from mice

TABLE 1 - Antibody levels in the sera of Balb/c mice immunized with *Neisseria meningitidis* B.

Balb/c** mouse immunized with	Strains		Reciprocal titre of serum dilution assayed on dot immunobinding assay outer membrane antigen*		
			IgG	IgM	IgA
Whole oma organisms	B16B6	2a	640	320	—
	2396	2c	320	320	—
	M1080	1	160	320	—
Whole oma organisms	B16B6	2a	640	320	20
	2396	2c	320	320	20
	M1080	1	160	320	20

* Outer membrane antigens isolated with LiCl

** Day after immunization 45°

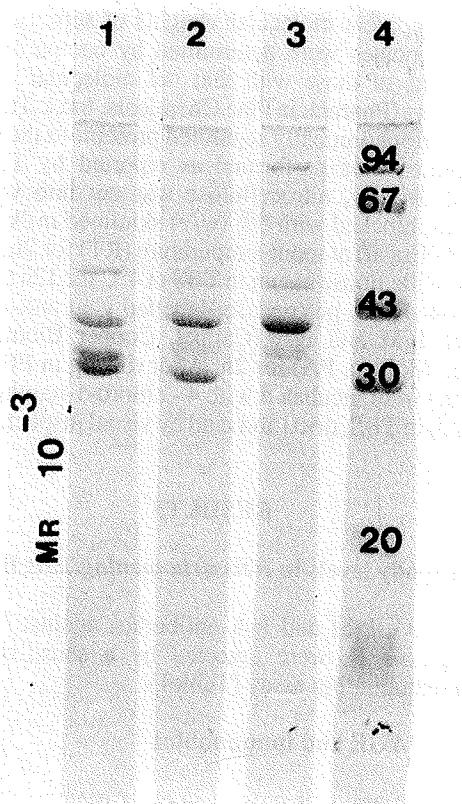


FIGURE 1 - SDS polyacrilamide gel electrophoresis. Approximate 10 µg of outer membrane antigens from *Neisseria meningitidis* B using for immunizes Balb/c mice 30 µl sample buffer were run and each track of a 10% acrylamide gel. Lane 1 (B16B6) serotype 1; Lane 2 M (2396) serotype 2a; Lane 3 (M1080) serotype 2c; Lane 4 Apparent molecular weights markers.

immunized with *N. meningitidis* serotypes 1, 2a and 2c reacted by immunoblot after SDS-PAGE separation of *N. meningitidis* B, isolated from patients; whereas the figures 3 and 4 correspond to those recognized with same IgG and IgM antibodies applied to *N. meningitidis* C and A antigenic bands.

The reactivity of IgM antibodies to *N. meningitidis* B, C and A was less complex than that obtained with IgG of the same sera. The results are consistent with the titres (Table 1) of IgM and IgA as compared with IgG antibodies after immunization with outer membrane antigens or whole antigenic preparation of *N. meningitidis* B. The analysis of IgG reactivity against *N. meningitidis* B shows a complex antigenic recognition. The antigen of 70 KDa is recognized by antibodies IgG, IgM and IgA in *N. meningitidis* B, C and A.

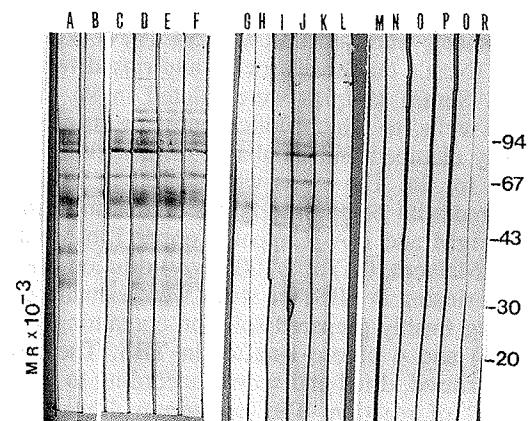


FIGURE 2 - A) Immunoblot of *Neisseria meningitidis* (serogroup B) lysates reacted with pooled sera from Balb/c mice immunized with outer membrane antigens of *N. meningitidis* B. A) lane A serotype 1 (B16B6); Lane B serotype 2a (M2396); Lane C serotype 2c (M1080), and whole organisms; Lane D serotype 1 (B16B6); Lane E serotype 2a (M2396); Lane F serotype 2c (M1080) developed with peroxidase labelled anti-mouse IgG; B) lane G (B16B6); lane H (M2396); lane I (M1080) and whole organisms lane J (B16B6); lane K (M 2396); lane L (M1080) developed with peroxidase labelled anti-mouse IgM; C) lane M (B16B6); lane N (M2396); lane O (M1080) and whole organisms lane P (B16B6); lane Q (M2396); lane R (M1080) developed with peroxidase labelled anti-mouse IgA.

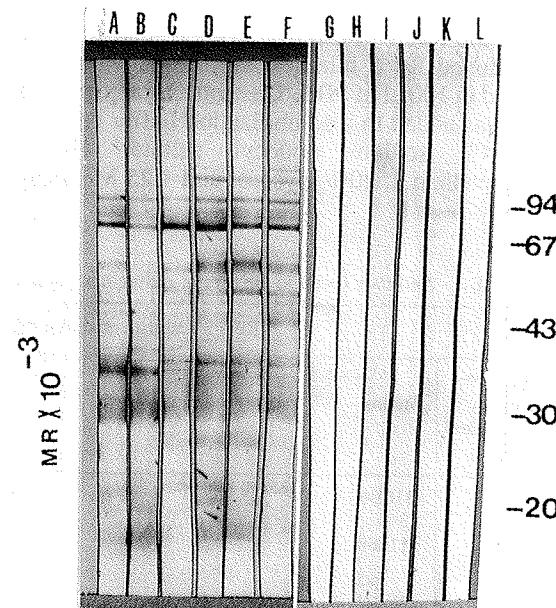


FIGURE 3 - A) Immunoblot of SDS-PAGE of *Neisseria meningitidis* (serogroup C) lysates reacted with pooled from immunized Balb/c mice with outer membrane antigens of *Neisseria meningitidis* B Lane A trough E as in Fig. 2, developed with peroxidase labelled anti-mouse IgG and IgM respectively.

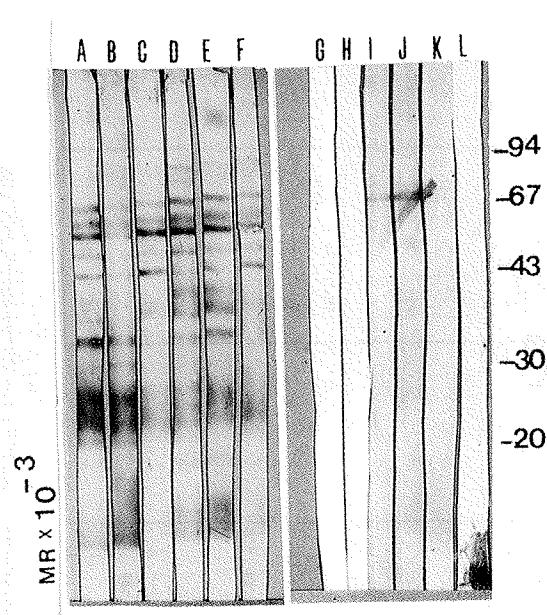


FIGURE 4 - A) Immunoblot of SDS-PAGE of *Neisseria meningitidis* (serogroup A) lysates reacted with pooled sera from immunized Balb/c mice with outer membrane antigens of *N. meningitidis* B Lane A through E as in Fig. 2., developed with peroxidase labelled anti-mouse IgG and IgM respectively.

The antibodies produced against serotype 2a recognized specifically polypeptides in the range between 34 to 64 KDa. IgM antibodies recognized antigens of 45,70 and 84 KDa in the three serotypes used for immunization. Whereas IgA antibodies only recognized the polypeptide of 70 KDa when immunized with outer membrane antigens of serotype 1.

The comparative analyses of IgG, IgM and IgA isotype reactivities among the sera from Balb/c mouse immunized with *N. meningitidis* serotype B showed the most complex spectra of antigen recognition was provided by IgG antibodies followed by IgM and IgA as can be seen in the Table 2.

DISCUSSION

The extensive cross reactivity of hyperimmune antisera prepared against outer membrane antigens of *N. meningitidis* B is due to common antigens present among its serotypes as reported (8). When hyperimmune antisera were adsorbed at 37°C for 1h with one of the cross reacting heterologous group B strains, the precipitins reactions against the heterologous strains were removed and the homologous types specific precip-

itin reaction remained.

The current understanding of the structure and function of *N. meningitidis* cell antigens is at fairly basic level, and this understanding should increase in the future with technical developments which will include the identification of new antigens of potential interest.

This work aims to analyze the antibody isotypes induced during immunization of mice with bacterial outer membrane of the serotypes 1, 2a and 2b, the patterns of polypeptides recognized by these, and the cross reactivity with *N. meningitidis* C, A isolated from patients. It is interesting to note that antigens recognized by IgG antibodies to *N. meningitidis* give cross reactivities with the polypeptide of 70 and 84 KDa of serogroup C and A. Whereas only the antigen of 43 KDa protein class 2 cross reacted with IgM antibodies.

The recognition of the antigen of 70 and 84 KDa by antibodies against outer membrane suggest that this protein is exposed on the surface membrane of the bacteria and could be the target for bactericidal antibodies. Whether the common antigens of 70 and 84 KDa are related with bactericidal antibodies or other immunological mechanisms are under investigation. This antigen appeared to be highly immunogenic in mice infected with *N. meningitidis* as described (14).

Thus the polypeptides here analyzed by immunoblot seem to be relevant, and helps to find the polypeptides that are involved in protections, as well as the study of common antigens present in *N. meningitidis* A, B and C, for the future production of polyvalent vaccines against *Neisseria meningitidis*.

Keeping in mind the reported developments in the fields of peptide immunochemistry and recombinant DNA, synthetic vaccines may be a reality in the medium or long term. It is important to remember that while such successful vaccines need to be of high antigenic specificity adequately built in adjuvant, investigations should also encompass the genetic background of the recipients, in order to best insure long lasting protection, as well as to cope with antigenic competitions, for the outcome of efficient vaccines made of molecules containing several protective specificities.

RESUMO

Neisseria meningitidis B sorotipos 2a, 2c, 1: Reatividade cruzada de anticorpos IgG, IgM e IgA de camundongos por "Immunoblot".

TABLE 2 - Composition of major polypeptides recognized by anti-*N. meningitidis* serotype B using immunoblotting.

Balb/c mouse immunized with	Strains <i>N. meningitidis</i> B	Serotypes	Apparent MW major polypeptides												<i>N. meningitidis</i> A*					
			<i>N. meningitidis</i> B*						<i>N. meningitidis</i> C*						<i>N. meningitidis</i> A*					
			IgG	IgM	IgA		IgG	IgM	IgA		IgG	IgM	IgA		IgG	IgM	IgA			
B16B6	2a	41 34 43 48 64 70 84 92 105 110 120	30 40 50 60 70 80 90 100 110 120	30 40 50 60 70 80 90 100	30 40 50 60 70 80 90 100		30 40 50 60 70 80 90 100	30 40 50 60 70 80 90 100	30 40 50 60 70 80 90 100		30 40 50 60 70 80 90 100	30 40 50 60 70 80 90 100	30 40 50 60 70 80 90 100		30 40 50 60 70 80 90 100	30 40 50 60 70 80 90 100	30 40 50 60 70 80 90 100			
M2396	2c	70 78 84 100	45 48 66 78 43 64 70	84 78 70	45 48 43		48 45 70	84 84 70	45 48 43		43 48 45	84 78 70	45 48 43		41 41 41	64 70 84 70	70			
M1080	1	78 84 105 110	45 66 78	84 66 78	45 66 78		45 45 70	84 84 70	45 48 43		43 48 45	84 78 70	45 48 43		41 41 41	64 70 84 70	70			
B16B6	2a	41 34 48 64 84 43 78 105	70 110 120	43 64 84 100	70 78		43 48 43	70 78 43	43 48 43		70 84 100	70 78 70	70 84 100		41 41 41	70 84 92 105 70	70			
M2396	2c	34 48 64 84 43 78 105	110 120	64 45 43	84 100 78 70		64 64 43	84 100 84 100 43	64 45 43		84 100 84 100 70	70 78 70	70 84 100		41 41 41	70 84 92 105 70	70			
M1080	1	34 48 64 84 43 78 105	110 120	64 45	84 100 78		64 45	84 100 84 100	64 48		84 100 78	70 45	70 78		41 41	70 84 92 105	70			

* Serogroups B, C, A isolated from patients with meningococcal septicemia.
 * The antigens were solubilized with 4% sodium dodecyl sulfate, 4% 2 mercapto ethanol, 20% Glycerol, 1.25 M Tris — Hydrochloride (pH 6.8).

Neisseria meningitidis do grupo B subdivides em sorotipos baseando-se na especificidade antigenica de antígenos protéicos presentes na membrana externa deste microrganismo. Antígenos presentes na membrana externa de bactérias dos sorotipos 1, 2a, 2c foram obtidos após tratamento com LiCl 0.2 M.

Os antígenos foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), e a resposta imune específica frente a estes antígenos foi obtida por imunização de camundongos isogênicos (Balb/c). A reatividade de anticorpos direcionados para antígenos presentes em *N. meningitidis* foi analisado por "Immunoblot" e o nível de anticorpos presentes determinado por "Immuno-dot". Os resultados mostraram que anticorpos dos isotipos IgG, IgM e IgA específicos para antígenos de membrana externa de *N. meningitidis* B apresentam reatividade cruzada para antígenos de *Neisseria meningitidis* dos sorogrupo C e A, isolados de pacientes durante a fase aguda da infecção.

Palavras-chave: *Neisseria meningitidis*, "imuno-dot", reatividade cruzada, membrana externa.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was carried out with financial support from CNPq (Projeto CNPq 405629/88).

REFERENCES

1. Brener, D.J.; Mayer, L.W.; Carlone, M.; Harrison, L.H.; Bibb, W. F.; DeCunto Brandileone, M.C.; Sottnek, F.O.; Irino K.; Reeves M.W.; Swenson, J.M.; Birkness, K.A.; Weyant, R.S.; Berkley, S.F.; Wood, T.C.; Steigerwald, T.G.; Grimont, P.A.; Mgrimont, R.; Mckinney, R.M.; Fleming, D.W.; Gheesling, L.L.; Cooksey, R.C.; Arko, C.V.; Broome C.V. & the Brazilian purpuric Fever Study Group. Biochemical, genetic, and epidemiologic characterization of *Haemophilus influenzae* biogroup aegyptius (*Haemophilus aegyptius*) strains associated with Brazilian purpuric fever. *J.Clin.Microbiol* 26: 1524-1534, 1988.
2. De Gaspari, E.N. - Analyses of antigens in *Neisseria meningitidis*. 7th International Congress of Immunology. July 30: 724, 1989 - Berlin.
3. De Marie, S.; Poolman, J.T.; Holijmakers, H.J.; Bol, P.; Spanjaard, L & Zanen H.C - Meningococcal disease in the Netherlands 1959-1981: the occurrence of serogroups and serotypes 2a and 2b of *Neisseria meningitidis*. *J. Infect. Dis.* 12: 133-143, 1986.
4. Faribanks, G., Steak T. L. & Wallach. D.F. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, 10: 2606-2617.
5. Frash, C.E. & Chapman S.S - Classification of *Neisseria meningitidis* group B into distinct serotypes. III Application of a new bactericidal-inhibition technique to distribution of serotypes among cases and carriers. *J.Infect. Dis.*, 127: 149-154, 1973.
6. Frasch, C.E. & Gotschlich E.C. - An outer membrane protein of *N. meningitidis* group B responsible for serotype specificity. *J. Exp. Med.*, 140: 87-104, 1974.
7. Frasch, C.E. - Immunization against *N. meningitidis* p. 115-144. In C.S.F. Easmon and J.J. Jeljaszewicz (ed), Medical Microbiology Vol. 2 Immunization against bacterial disease. Academic Press, Inc (London) Ltd., London.
8. Frash, C.E., Zollinger W.D., & Poolman J.T. - Serotype antigens of *Neisseria meningitidis* and proposed schema for designation of serotypes. *Rev. Infect. Dis.*, 7: 504-510, 1985.
9. Frasch, C.E.; Mocca, L.F. & Karpas, A.B. Appearance of new strains associated with group B meningooccal disease and their use for rapid vaccine development. Gonococci and Meningococci. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, Netherlands, 1988.
10. Hankins, W.A. , Gwaltney, J.M; Hendley, J.O.; Farquhar, J.D & Samuelson J.S. - Clinical and serological evaluation of a meningococcal polysaccharide vaccine, group A, C, Y and W. 135. *Proc. Soc. Exp. Biol. med.*, 169: 54-57, 1982.
11. Kayhty, H., Karanko, V.; Peltola, H.; Sarna, S & Makela, P.H. Serum antibodies to capsular polysaccharide vaccine of group A *N. meningitidis* followed for three years in infants and children. *J. Infect. Dis.*, 142: 861-868, 1980.
12. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J.; Farr, A. L. & Randall, R.J. - Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951.
13. Laemmli, U.K. - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227: 680-685, 1970.
14. Martin, P.M.V., Laviotola, A. Aoun, L.; Ancelle, R.; Cremaux, A.C. & Riou, J.Y. A common neisserial antigen evidenced by immunization of mice with live *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.*, 53: 229-233, 1986.
15. Poolman, J.T., Hopman, CTP & Zanen, H.C.- Immunological characterization of *N. meningitidis* serotype antigens by immunodiffusion and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis immunoperoxidase techniques and the distribution of serotypes among cases and carriers. *J. Gen. Microbiol.*, 116: 465-473, 1980.
16. Towbin, H.; Staehelin, T & Gordon, J. - Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 4350 - 4354, 1979.
17. Zollinger, W.D. & Mandrell, R.E. - Studies of the Human antibody response to specific meningococcal outer membrane proteins of serotype e 2 and 15. *Med. Trop.*, 43: 143-147, 1983.
18. Zollinger, W.D., Moran, E.E.; Connelly, H.; Mandrell, R E & Brandt B. Monoclonal antibodies to serotype 2 and serotype 15 outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* and their use in serotyping. *Infect. Immun.*, 46 : 260-266, 1984.

Received for publication in 21/06/90

CELL CULTURE PROPAGATION OF ROTAVIRUS FROM FECES OF DIARRHEIC PIGLETS

Aurora Maria Guimarães Gouveia¹
Carlos Mitihiko Nozawa²
Humberto Araújo³

SUMMARY

Isolation of rotavirus (RV) from feces of diarrheic piglets of southeastern Brazil is described. Five RV isolates were obtained in cell cultures (MA-104 cells) out of 103 field samples. Typical rotaviral cytopathic effect (CPE) was observed at different passages and viral antigen was also detected in the cytoplasm of the infected cells by immunofluorescent antibody (IF) staining. Adaptation of RV in cell cultures was also monitored by electron microscopy (EM), polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and enzyme immunoassay (EIA).

Key Words: Porcine rotavirus, diarrhea, cell culture, isolation.

INTRODUCTION

Rotavirus has been known as cause of diarrhea in suckling or weaned pigs since the seventies (2, 9, 10, 18). Infection seems to be prevalent and most animals become infected during the first few weeks of life (1, 2, 17). Rotaviruses are also incriminated as a major cause of diarrhea in other species (4).

The isolation procedure of porcine rotavirus in different cell cultures is well established (1, 4, 11, 16). In Brazil, data on the prevalence of rotaviral infection in pigs are scarce and at our knowledge virus isolation in cell culture has not been reported yet. In São Paulo State a prevalence of rotaviral infection of 20.5 and 18.2% was reported (15) based on EIA and PAGE, respectively. These data was later confirmed, in the same area (5, 6) when a prevalence of 19.5% was found by PAGE, EIA and immune electron microscopy (IEM).

In the present work we report on the isolation of five porcine rotavirus from feces of diarrheic piglets in our country. The cell culture adaptation was monitored by the appearance of CPE, IF, PAGE, EM and EIA.

MATERIAL AND METHODS

Reference viruses - group A OSU strain (porcine rotavirus) kindly supplied by Dr. L. J. Saif (Ohio State University), and SA-11 (simian rotavirus) from the collection of the Department of Virology IM-UFRJ were used as reference viruses for PAGE. They all were grown in MA-104 cell cultures as mentioned before.

Fecal samples - 103 fecal samples were collected during 1987 and 1988 from 1- to 8-week old piglets at the acute phase of diarrhea from

1. Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Caixa Postal 567 - CEP 30161 - Belo Horizonte - MG - Brazil.
2. Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Caixa Postal 68040 - CEP 21944 - Rio de Janeiro - RJ - Brazil.
3. Fundação Oswaldo Cruz, Departamento de Virologia - Caixa Postal 926 - CEP 20001 - Rio de Janeiro - RJ - Brazil.

herds located in Minas Gerais and Rio de Janeiro States, southeastern Brazil. Approximately 20% (v/v) suspension of fecal samples made in Eagle's Minimal Essential Medium (MEM), containing 1000 IU of penicillin/ml, 1000 ug of streptomycin/ml and 5 ug of fungizone/ml were kept at 4°C overnight. Suspensions were clarified by centrifugation at 3,000g for 20 min, at 4°C. Supernatants were separated and frozen at - 20°C for cell culture inoculation, PAGE and EIA, when not processed immediately.

Viral isolation in cell cultures - Monolayers of MA-104 cell line (fetal Rhesus monkey kidney cells) were grown in Leighton tubes and in 13 x 100 mm tubes, in Eagle's MEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Lab. Bruch, São Paulo, Brazil) and antibiotics.

Inocula were treated at 37°C for 1 h. with crystalline trypsin (Merck, W. Germany), at a final concentration of 50 ug/ml., before adsorption to cell monolayers. Cultures were maintained in medium free of FCS added of 10 ug/ml of trypsin. Cultures were daily examined for CPE. When CPE developed coverslips were harvested and processed for IF staining, PAGE, EIA and EM as described next. At least six blind passages were always performed at the 7th day post-inoculation (p.i.) before excluding any fecal sample.

Electron Microscopy (EM) - Infected tissue culture homogenates obtained after three cycles of freeze and thaw were prepared in 300 mesh copper grid precoated with formvar-carbon, negatively stained with 2% phosphotungstate pH 6.5 by superdirect method (12) and observed in a Philips EM-301 electron microscope throughout.

Poliacrylamide gel electrophoresis (PAGE) - Either clarified homogenates of infected cell cultures or 50% (v/v) fecal suspensions in PBS were subjected to PAGE, according to Laemmli (8) with adaptations. Viral RNA extraction was performed as previously described (13). The continuous slab gel consisted of 7,5% acrylamide, measuring 7.5 cm long, 6.5 cm wide and 0.1 cm thick. After the electrophoresis, at 25mA for approximately 2 h. at room temperature, gels were stained with silver nitrate (7).

Enzyme-immunoassay (EIA) - The combined peroxidase-immunoassay (double antibody sandwich) for rotavirus and adenovirus (EIARA Test) reagents were kindly provided by Dr. H. G. Pereira and the test was performed at the Instituto

Oswaldo Cruz, as previously described (13). Confirmatory EIA tests were carried out whenever necessary with pre-and post-immune goat capture sera.

Immunofluorescent antibody (IF) staining - When CPE developed, coverslips containing infected cells were collected. Cells were washed with PBS, fixed with cold acetone (-20°C) for 30 min., and incubated with guinea pig anti-simian rotavirus serum for 60 min. at 37°C. An additional incubation for 60 min. at 37°C was followed, with rabbit anti-guinea pig immunoglobulin FITC-conjugate. Coverslips were washed several times with PBS, mounted in 50% (v/v) buffered-glycerol and examined in an UV Leitz microscope (14).

RESULTS

Five of 103 fecal samples showed typical rotaviral CPE after 3-6 passages. Patches of round and refringent cells were observed in the monolayer as well as filamentous cells were found as CPE developed (Fig. 1). Viral antigen was found in the cytoplasm of infected cells examined by IF staining, as typical granular fluorescence.

Infected cell culture homogenate contained viral particles with typical morphology of both single- and double-shelled rotavirus.

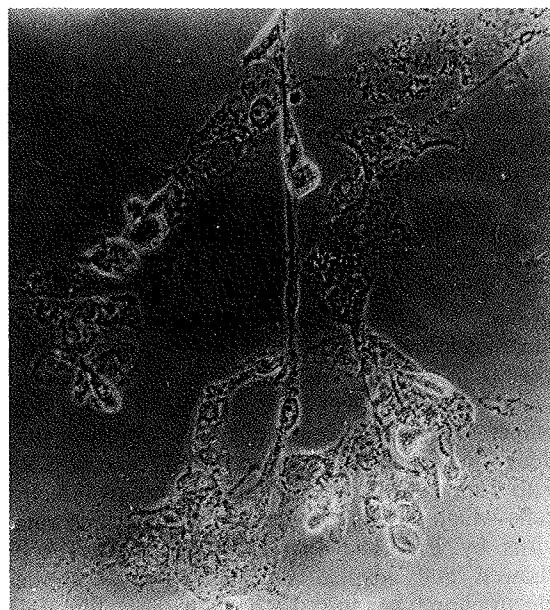


FIGURE 1 - Cytopathic effect in infected MA-104 cell culture five days after inoculation with virus # 3/011 (4th passage) observed by phase contrast (160x).

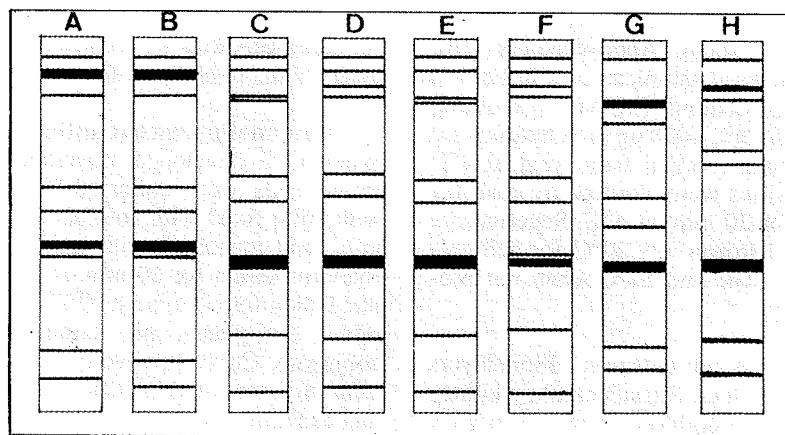


FIGURE 2 - Diagram of the electrophoretic migration patterns of ds RNA preparations extracted from infected MA-104 cells. (A) Porcine rotavirus isolate 3/010. (B) Porcine rotavirus isolate 3/011. (C) Porcine rotavirus isolate 13/038. (D) Porcine rotavirus isolate 16/081. (E) Porcine rotavirus isolate 21/102. (F) Porcine rotavirus OSU strain. (G) Human rotavirus 3052. (H) Simian rotavirus SA-11 strain.

Upon electrophoretic analysis, the five cell culture isolates showed eleven segments of dsRNA in a 4-2-3-2 pattern, therefore classified as group A (Fig. 2). All the isolates were also considered positive when tested by EIA.

The initial analysis of 103 fecal samples by PAGE and EIA showed that 23 and 22 samples were positive for rotavirus respectively.

DISCUSSION

Primary pig kidney cells and PK-15 an established porcine cell line are useful for porcine rotavirus isolation (14) but MA-104 cell line seems to be more suitable for this purpose (3) and were used throughout our study. Out of 103 fecal samples we were able to isolate five rotaviruses. Two of them were originated from the same herd, and the others were originated from different herds.

CPE was observed after three to six passages in MA-104 cells, initially at the periphery of the monolayer and later in most of its extension, suggesting that replicating cells were more susceptible to infection and apt to express CPE earlier than others. With successive passages, the ability to produce CPE gradually improved. Cells showed CPE 5 to 7 days p.i. Clarified supernatants of infected cells which developed CPE were positive to rotavirus by EIA and PAGE. Additionally PAGE showed that adapted viruses presented similar electrophoretotypes to those of their respective field samples, demonstrating the stability of the virus during cell culture passages, as suggested else-

where (3) using porcine rotavirus and the same established cell line.

Viral preparation examined by EM particles detected after cell culture adaptation showed typical rotavirus morphology. It is therefore concluded that cell cultures adapted viruses are group-A rotavirus since they were detected by IF and EIA and showed a 4-2-3-2 electrophoretic pattern.

Further work is on progress to determine the serotypes of the isolates.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Dr. H. G. Pereira (Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil) for providing EIA reagents and for valuable advice and criticism. This work was partially supported by CNPq, CAPES, FIPEC/Banco do Brasil and CEPG/UFRJ

RESUMO

Propagação de rotavírus em cultura células a partir de fezes de leitões com diarréia

O trabalho descreve o isolamento no Brasil de rotavírus (RV) em fezes de leitões com diarréia, provenientes de rebanhos da região sudeste brasileira. Cinco isolamentos foram obtidos em culturas de células MA-104, a partir de 103 amostras de campo. Escito citopático (ECP) característico de

RV foi observado em diferentes passageiros, e o antígeno viral foi demonstrado no citoplasma das células infectadas, por imunofluorescência (IF). A adaptação do RV em cultura de células foi ainda monitorada por microscopia eletrônica (EM), eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) e ensaio imunoenzimático (EIA).

Palavras-chave: Rotavírus suíno, diarréia, cultura de células, isolamento.

REFERENCES

1. Bohl, E. Rotaviral diarrhea in pigs: brief review. *J. Vet. Med. Ass.*, 174: 613-615, 1979.
2. Bohl, E.; Kohler, E.; Saif, L.; Cross, R.; Agnes, A. & Theil, K. Rotavirus as a cause of diarrhea in pigs. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 172: 458-463, 1978.
3. Bohl, E.; Theil, K. & Saif, L. Isolation and serotyping of porcine rotaviruses and antigenic comparison with other rotaviruses. *J. Clin. Microbiol.* 19: 105-111, 1984.
4. Flewett, T. & Woode, G. The rotaviruses: brief review. *Arch. Virol.*, 57:1-23, 1978.
5. Incidência de rotavírus suíno na região de Campinas, SP. In: PROCEEDINGS CONGRESSO BRASILEIRO MEDICINA VETERINÁRIA, 21., 1988. Proceedings. Salvador, Brazilian Society Veterinary Medicine, 1988. p. 180.
6. Gatti, M.; Castro, A.; Barsanti, I. & Hifumi, N. Presence of group A and non-A rotaviruses in neonatal piglets in Campinas, SP, Brazil. *Med. Microbiol. Immunol.*, 178: 347-349, 1989.
7. Herring, A.; Inglis, N.; Ojeh, C.; Snodgrass, D. & Menzies, J. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Clin. Microbiol.*, 16: 473-477, 1982.
8. Laemmli, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.
9. Lecce, J.; King, M. & Mock, R. Reovirus-like agent associated with fatal diarrhea on neonatal pigs. *Infect. Immun.*, 14: 816-825, 1976.
10. McNulty, M.; Pearson, G.; McDowell, J.; Collins, D. & Allan, G. A reovirus-like agent (rotavirus) associated with diarrhea in neonatal pigs. *Vet. Microbiol.*, 1: 55-63, 1976.
11. Nagesha, H. & Holmes, I. New porcine serotype antigenically related to human rotavirus serotype 3. *J. Clin. Microbiol.*, 26: 171-174, 1988.
12. Nozawa, C.; Vaz, M. & Guimarães, M. Detection of astrovirus-like in diarrhoeic stool and its coexistence with rotavirus. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 27: 238-241, 1985.
13. Pereira, H.; Azeredo, R.; Leite, J.; Andrade, Z. & Castro, L. A combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA). *J. Virol. Meth.*, 10: 21-28, 1985.
14. Riggs, J. Immunofluorescence staining. In Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections, 5th ed., Washington DC. Lennette, E. & Schmidt, N. eds., 1979. p. 141-151.
15. San Juan, C.; Bellinzoni, R.; Mattion, N.; Latorre, J. & Scodeller, E. Incidence of group A and atypical rotaviruses in Brazilian pig herds. *Res. Vet. Sci.*, 41: 270-272, 1986.
16. Theil, K.; Bohl, E. & Agnes, A. Cell culture propagation of porcine rotavirus (reovirus-like agent). *Am. J. Vet. Res.*, 38: 1765-1768, 1977.
17. Woode, G. & Bohl, E. Rotavirus. In Diseases of swine, 5th ed., Leman, A.; Glock, R.; Mengeling, W.; Penny, R.; Scholl, E. & Straw, B. eds. Iowa State University Press, Ames, 1981. p. 310-322.
18. Woode, G.; Bridger, J.; Hall, G.; Jones, J. & Jackson, G. The isolation of reovirus-like agents (rotavirus) from acute gastroenteritis of piglets. *J. Med. Microbiol.*, 9: 203-209, 1976.

Received for publication in 20/04/90.

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE *CAMPYLOBACTER* spp EM SUÍNOS: SUA RELAÇÃO COM A OCORRÊNCIA DE DISTÚRBIOS ENTÉRICOS

Eliana Scarcelli¹

Margareth Élide Genovez¹

Sandra Rojas¹

Josete Garcia Bersano²

Maria Helena S. S. Schotten²

RESUMO

Suspensão de fezes e raspado de mucosa de intestino delgado de 100 animais, 75 doentes e 25 sadios, foram submetidos a exame bacteriológico para isolamento e identificação de *Campylobacter* spp. Procurou-se realizar diagnóstico diferencial com enterobactérias patogênicas e *Treponema hyodysenteriae*. Entre os animais doentes, 43(57,3%) foram positivos para *Campylobacter* spp, sendo isolados *C. coli*, *C. jejuni*, *C. fetos* e *C. hyoilealis*. Dos animais sadios 15(60,0%) foram positivos para *Campylobacter coli* e *C. jejuni*. Apenas do grupo dos animais doentes foram isoladas enterobactérias como *E. coli* (hemolítica) e *Salmonella choleraesuis*. *Treponema hyodysenteriae* foi observado em 5(9,1%) dos animais doentes através da Imunofluorescência Direta. Os autores discutem a presença de diferentes espécies de *Campylobacter* em suínos doentes e aparentemente sadios.

Palavras-chave: *Campylobacter* spp, isolamento e identificação, diarréia suína, *Treponema hyodysenteriae*.

INTRODUÇÃO

O gênero *Campylobacter* apresenta-se amplamente distribuído na natureza (8), sendo isolado de diversas espécies animais, domésticas (17) e silvestres (14), assim como, do homem (22). *C. coli* e *C. jejuni* têm sido isolados de carcaças e de fezes de suínos aparentemente sadios abatidos em matadouros (24), como também de animais com sintomas clínicos de distúrbios entéricos manifestados sob forma de diarréia (2,22,26). O presente trabalho tem por objetivo pesquisar e analisar a ocorrência de diferentes espécies do gênero *Campylobacter* no intestino de suínos

doentes e compará-las àquelas encontradas em suínos aparentemente sadios encaminhados ao abate.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de intestino delgado e grosso coletados de 100 suínos, 75 doentes apresentando sintomas como prostração, inapetência ou anorexia, baixo ganho de peso ou emagrecimento progressivo, diarréia aquosa amarelada ou muco-hemorrágica, febre (sendo que 40 vieram a óbito e 35 foram sacrificadas) e 25 aparentemente sa-

1 Instituto Biológico

Seção de Doenças de Bovinos

2 Seção de Doenças de Suínos

Caixa Postal 7119, 04014 São Paulo SP, Brasil

dios abatidos em matadouro. Foram processadas segundo adaptação do método proposto por Lawson & Roland, 1974 (13). Resumidamente, este método baseia-se na obtenção do epitélio glandular do intestino delgado através da raspagem da mucosa e suspensão em 10 ml de solução salina tamponada estéril (pH 7,2). Após agitação vigorosa, uma alçada do sobrenadante da suspensão foi cultivada diretamente em Ágar Brucella (DIFCO) acrescida de 10% de sangue desfibrinado de carneiro e de mistura antibiótica ocomposta de 15.000 UI/l de Bacitracina, 10.000 UI/l de Polimixina B, 0,005 g/l de Novobiocina e 0,02 g/l de Actidione (1).

Uma alíquota do restante foi filtrada em Millipore 0,65 µm e cultivado em Ágar Brucella Sangue e em Tioglicolato acrescido de 0,16% de Bacto - Agar (DIFCO).

Amostras de fezes foram obtidas diretamente do intestino grosso ou por "swab" retal e um grama suspenso em 10 ml de solução salina tamponada estéril, sendo esta suspensão submetida ao mesmo processo efetuado para o raspado de mucosa.

As placas foram colocadas em jarra adaptadora+, onde onde o ar era retirado através de bomba vácuo até - 600 mmHG e incubadas a 37°C por 96 horas sob atmosfera de 90% de N₂, 5% de CO₂ e O₂ residual. As culturas suspeitas foram submetidas a coloração pelo método de Gram, motilidade em campo escuro e oxidase. Para identificação, foram empregadas as seguintes provas bioquímicas: catalase, sensibilidade ao ácido nalidíxico (30 mg) e a cefalotina (30 mg), produção de H₂S em TSI, hidrólise do hipurato e crescimento a 25 e 42°C (15,21). Visando o diagnóstico diferencial com outras causas bacterianas de enterite, amostras de fezes foram também submetidas ao processamento usual para isolamento e identificação de enterobactérias (19,28), utilizando-se Caldo Enriquecimento para *Salmonella* segundo Rappaport, Agar Tryptose sangue e EMB-Levine (DIFCO). Para diagnóstico de *T. hyodysenteriae* foram empregadas as técnicas de coloração de Ryu (18)(exame direto) e de imunofluorescência direta++ sobre a suspensão de fezes (5).

+ Panela de Pressão "Eterna"- Nigro
++ Conjugado gentilmente cedido pelo Dr. Sérgio J. de Oliveira, Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor" - R. S.

RESULTADOS

Dos 100 animais examinados, 58 apresentaram microrganismos compatíveis com o gênero *Campylobacter*, sendo 43(57,3%) dos 75 doentes e 15(60,0%) dos 25 suínos de abate. Apenas as espécies *C. coli* e *C. jejuni* estavam presentes no grupo dos não doentes sem associações com outras bactérias, enquanto que várias interações bacterianas foram observadas nos suínos com problemas entéricos, como mostra a Tabela 1. Apesar da Técnica de raspado de mucosa ter sido empregada, as estirpes de *C. hyointestinalis* foram isoladas a partir das fezes. *Campylobacter sputorum* subsp. *mucosalis* não foi detectados por ambas as técnicas.

Para o isolamento de *C. coli* e *C. jejuni* não houve diferença significativa entre o emprego do raspado de mucosa (35/100) e o exame das fezes (38/100) ($\chi^2 = 1,94$ para χ^2 crit. = 3,84 p ≤ 0,05).

A técnica de filtração em Millipore 0,65µm apresentou resultados superiores à inoculação direta em meio seletivo, proporcionando uma freqüência de isolamento de *Campylobacter* spp de 86,2% contra 13,8% de positividade para o meio com mistura antibiótica.

Pela coloração de Ryu (18) constatou-se que 26 (47,3%) dos 55 animais examinados para diagnóstico da Disenteria Suína, apresentaram espiroquetas no material fecal compatíveis com *Treponema hyodysenteriae*, sendo que apenas 5(9,1%) foram confirmados pela imunofluorescência direta.

TABELA 1 - Diagnóstico bacteriano obtido a partir de fezes e raspado de mucosa intestinal de 75 suínos doentes.

Espécie	Freq.	%
<i>C. coli</i>	19	25,3
<i>C. jejuni</i>	6	8,0
<i>C. coli + C. jejuni</i>	3	4,0
<i>C. hyointestinalis</i>	1	1,3
<i>C. jejuni + C. hyointestinalis</i>	1	1,3
<i>C. coli + E. coli</i> (hemolítica)	4	5,3
<i>C. jejuni + E. coli</i> (hemolítica)	1	1,3
<i>C. coli + Salmonella choleraesuis</i>	1	1,3
<i>C. jejuni + C. coli + C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	1	1,3
<i>C. coli + Clostridium perfringens</i>	1	1,3
<i>C. coli + C. jejuni + E. coli</i> (hemolítica)	1	1,3
<i>Treponema hyodysenteriae</i>	1	1,3
<i>T. hyodysenteriae + Salmonella</i> sp	1	1,3
<i>T. hyodysenteriae + C. jejuni</i>	3	4,0
<i>T. hyodysenteriae + C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> + <i>C. hyo.</i>	1	1,3
<i>E. coli</i> (hemolítica)	5	6,7
<i>Salmonella</i> sp	1	1,3
Positivos para <i>Campylobacter</i> e outras bactérias	50	66,6
Negativos para bactérias patogênicas	25	33,3

DISCUSSÃO

A grande dificuldade na diferenciação entre as espécies de *Campylobacter* refere-se à padronização das provas bioquímicas (10). Duas estirpes classificadas como *C. hyoileum*, apresentaram pequena quantidade de H₂S em TSI, visualizada apenas na linha de picada. Embora esta prova tenha sido considerada como fundamental na diferenciação entre as espécies *C. fetus* subsp. *fetus* (H₂S⁻) e *C. hyoileum* (H₂S⁺), está sujeita a alterações dependentes do envelhecimento do meio e ou das condições atmosféricas utilizadas, como a atmosfera de N₂ empregada (3,11,15,21).

Duas estirpes de *C. jejuni* também apresentaram variação no comportamento bioquímico, não hidrolisando o hipurato de sódio, contrariando assim o modelo clássico de biotipagem (21). Semelhantes descrições foram relatadas por outros autores, onde 20% das estirpes de *Campylobacter* não hidrolisam o hipurato pelo método usual (6). Estas estirpes puderam ser confirmadas como sendo *C. jejuni* através de técnicas avançadas de hibridização de DNA (7), ou por cromatografia gás-líquida que detecta quantidades diminutas de glicina (16,27). Este patógeno, importante causador de diarréias, possui mecanismos de ação ainda pouco conhecidos. Devido a sua participação na diarréia tipo inflamatória, tem sido postulada a produção de uma toxina semelhante a de outros microrganismos bem conhecidos como *E. coli* enterotoxigênica e *Shigella dysenteriae* (9,20).

O fato do *C. jejuni* ter sido isolado com a mesma freqüência de animais doentes (21,3%) e saudáveis (12,0%) ($X^2 = 1,33$ para X crit. = 3,84 p ≤ 0,05) põe em dúvida o estado sanitário dos suínos de abate.

Neste estudo, verificou-se que 58,0% dos suínos portavam ao menos uma espécie do gênero *Campylobacter*, não havendo diferença significativa entre o isolamento de enfermos (57,3%) e dos aparentemente saudáveis (60,0%) ($X^2 = 0,054$ para X² crit. = 3,84 p ≤ 0,05). Apenas *C. coli* e *C. jejuni* estavam presentes no grupo dos saudáveis, sem associações com outras bactérias patogênicas, enquanto várias interações potencialmente patogênicas foram observadas nos animais diarréicos (Tabela 1). Segundo Sojka (23), é frequente o isolamento de estirpes de *E. coli* hemolítica associado a gastroenterites, septicemias e Doença do Edema em suínos. As bactérias classificadas como *E. coli* (hemolíticas) foram consideradas como potencialmente patogênicas,

uma vez que foram isoladas em cultura pura ou associadas a *Campylobacter* spp.

O papel do *C. coli* nas entertes de suínos ou nos distúrbios entéricos em pacientes humanos é ainda questionável (10). Este agente pode causar lesões no intestinos delgados de leitões não desmamados ou recém desmamados quando submetidos a ação de certas drogas ou então por ação oportunista primária. Dessa forma, pode propiciar interações com outros agentes bacterianos e estender sua ação ao intestino grosso, determinando o aparecimento de episódios diarréicos mais severos (2,26).

Campylobacter coli foi isolado de suínos de abate (48,0%) e dos enfermos (41,3%) não havendo diferença significativa entre os dois grupos ($X^2 = 0,49$ para X^2 crit. = 3,84 p ≤ 0,05) e ainda foi observado em associação com *E. coli*, *Salmonella* spp., *Treponema hyoileum* e outras espécies de *Campylobacter* (Tabela 1).

Sintomatologia compatível com o quadro de entere proliferativa suína (13), foi observada nos animais onde *C. hyoileum* pôde ser isolado; contudo segundo Lawson (12), o simples encontro deste agente até mesmo associado ao *C. sputorum* subsp. *mucosalis*, não permite confirmar a presença da enfermidade sem o auxílio do exame histopatológico.

Campylobacter fetus subsp. *fetus* foi isolado de dois suínos doentes juntamente com outras espécies de *Campylobacter*. Embora esta bactéria tenha um importante papel como patógeno causador de abortamentos nas espécies bovina e ovina e até mesmo para o homem (25): em suínos seu poder patogênico não está claramente definido (14,25). Assim sendo, os suínos portadores de *C. fetus* subsp. *fetus* podem comportar-se como disseminadores desse agente.

O diagnóstico da Disenteria Suína por meio da imunofluorescência direta mostrou-se específico e deve ser precedido pela técnica de coloração de Ryu (18) como prova de triagem. Dos cinco animais com quadro de diarréia mucohemorrágica e emagrecimento progressivo identificados como portadores de *Treponema hyoileum*, três apresentaram também *C. jejuni*, o que concorda com as observações de outros autores onde a enfermidade seria decorrente da associação de *Treponema hyoileum* a outros agentes (2,4,5).

A elevada freqüência das diversas espécies do gênero *Campylobacter* isoladas das amostras intestinais de suínos, confirma seu papel como potencial fonte de infecção para o homem como consumidor através da contaminação de carcaças e subprodutos, além de configurar o suíno como portador assintomático do microrganismo.

SUMMARY

Evaluation of the presence of *Campylobacter* spp in swine: its relation with occurrence of enteric disorders.

Suspension of feces and scraped small intestine mucosa from 100 animals, 75 sick and 25 apparently healthy, were cultured for *Campylobacter* spp. Differential diagnosis for enterobacterias and *Treponema hyodysenteriae* was also carried out. Among the sick animals, 43 (57,3%) were found positive to *Campylobacter* and the following species were isolated: *C. coli*, *C. jejuni*, *C. fetus* subsp. *fetus* e *C. hyoileitis*. From the apparently healthy animals 15(60,0%) were found positive to *Campylobacter coli* and *C. jejuni*.

Only from the group of the sick animals, were isolated enterobacterias such as: *E. coli* (hemolytic) and *Salmonella choleraesuis*.

Treponema hyodysenteriae was detected in 5 (9,1%) sick animals (Direct Immunofluorescence). The authors discuss the role of bacterias found in sick and apparent healthy pigs.

Key Words: *Campylobacter* spp, isolation and identification, swine diarrhea, *Treponema hyodysenteriae*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Dufty, J. H. Diagnosis of vibriosis in the bull *Austr. Vet. J.*, 43: 433-437, 1967.
- Fernie, D. S.; Griffin, R. M.; Parck, R. W. A. - The possibility that *Campylobacter coli* and *Treponema hyodysenteriae* are both involved in swine dysentery. *Br. Vet. J.*, 131: 335-338, 1975.
- Gebhart, B. S.; Connie, J.; Ward, G. E.; Chang, K.; Kurtz, H. J. - *Campylobacter hyoileitis* (new specie) isolated from swine with lesions of proliferative ileitis. *Am. J. Vet. Res.*, 44: 361-367, 1983.
- Glock, R. D. Disenteria suína - A doença. Simpósio Internacional de Disenteria Suína, Rio de Janeiro, Brasil, Squibb Veterinária, 1988. 19 p.
- Glock, R. D. - Swine dysentery: cause, transmission and diagnostic. *J. Am. Vet. Med.*, 171: 1090, 1978.
- Harvey, S. M.- Hippurate hydrolysis by *Campylobacter fetus*. *J. Clin. Microbiol.*, 11: 435-437, 1980.
- Harvey, S. M. and Greenwood, J. R.- Relationships among catalase-positive *Campylobacters* determined by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 33: 275-284, 1983.
- Holt, J. C. & Krilg, N. R., eds. - Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore, Williams & Wilkins, 1984, p. 111-118.
- Jamarillo, H. F.- Espécies termófilas de *Campylobacter*: aspectos bacteriológicos, epidemiológicos e patogênicos. São Paulo, 1983. [Tese (dout.) - Escola Paulista de Medicina].
- Jorgensen, K. - Identification methods for *Campylobacters*. In: Proceedings of a Conference Held in Brussels. Eds. K. P. Lander, 1985. p. 33-47.
- Lambert, M.; Jones, J. M. W.; Lester, S. A.-Isolation of *C. hyoileitis* from pig in the United Kingdom. *Vet. Rec.*, 11: 128-129, 1984.
- Lawson, G. H. K.; McOrist, S.- Reproduction of proliferative enteritis in gnotobiotic pigs. In: International Congress of Pig Veterinary Society, 10, Rio de Janeiro, 1988. *Proceedings*. p. 132.
- Lawson, G. H. K.; Rowland, A. C.- Intestinal adenomatosis in the pig: a bacteriological study. *Res. Vet. Sci.*, 17: 331-336, 1974.
- Luechtefeld, N. W.; Cambre, R. C.; Wang, W. L. L.- Isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* from zoo animals. *J.Am.Med.Assoc.*, 199: 1119-1122, 1981.
- Mooris, G. K. & Patton, C. H.- *Campylobacter*. Manual of Clinical Microbiology, 4^a ed., Atlanta, USA, 1985. p. 302-308.
- Mooris, G. K.; El Sherbeeny, M. R.; Patton, C. M.; Kodaka, H.; Lombard, G. L.; Edmonds, P.; Hollis, D. G. and Breener, D. J.- A comparison of four hippurate hydrolysis methods for identification of thermophilic / *Campylobacter* spp. *J. Clin. Microbiol.*, 22: 714-718, 1985.
- Prescott, J. F.; Munroe, D. L.- *Campylobacter jejuni* in men and domestic animals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 181: 1524-1530, 1982.
- Ryu, E.- A simple method for staining *Leptospira* and *Treponema*. *Jap.J.Microbiol.*, 7: 85-89, 1965.
- Sack, B. L.; Tilton, R. C.; Weissfeld, A. S.- Laboratory diagnosis of bacterial diarrhea. In: Rubin, S. J. Ed. Cumitech 12. Am. Soc. for Microbiol., Washington, D. C., 1980. p 1-12.
- Serafin, G.; Caramello, S.; Maggi, C.- *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*: aspetti eziologici, epidemiologici e di prevenzione. *Gion. Batt. Virol. Immunol.*, 77: 63-85, 1984.
- Skirrow, M. B. & Benjamin, J.- Differentiation of enteropathogenic *Campylobacter*. *J. Clin. Pathol.*, 33: 1122, 1980.
- Smalley, J. R.; Kliish, W. J.; Brow, M. R.; Campbell, M. A.- Chronic diarrhea associated with *Campylobacter*. *Clin. Ped. (Philad.)*, 21: 220, 1982. 23. Sojka, W. J.- *Escherichia coli* in domestic animals and poultry. Weybridge, England, the Eastern Press, 1965. 204 p.
- Sticht-Groh; V.- *Campylobacter* in health slaughter pigs : a possible / source of infection for man. *Vet. Rec.*, 110: 104-106, 1982.
- Stoessel, F.- Las enfermedades venéreas de los bovinos: trichomoniasis y vibriosis genital. Zaragoza, Ed. Acribia, 1982, 163 p.
- Taylor, D. J.; Olubunmi, P. A.- A re-examination of role of *Campylobacter fetus* subsp. *coli* in enteric disease of pig. *Vet. Rec.*, 101: 112-115, 1981.
- Totten, P. A.; Patton, C. M.; Tenover, F. C.; Barret, W. E. S.; Steigerwalt, A. G.; Lin, J. Y.; Holmes, K. K. and Brenner, D. J.-Prevalence and characterization of hippurate-negative *Campylobacter jejuni* in King County Washington. *J. Clin. Microbiol.*, 25: 1747-1752, 1987.
- Trabulsi, L. R.- Microbiologia das infecções intestinais. Rio de Janeiro, Atheneu, 1981, 136p.

Recebido para publicação em 5/3/90.

INFLUÊNCIA DO pH, MEIO DE CULTURA E INÓCULO NO NÍVEL DE RESISTÊNCIA AO BICLORETO DE MERCÚRIO EM *ESCHERICHIA COLI*

Laura Maria Guimarães Carneiro
Laura Silviano Brandão Vianna
Edmar Chartone de Souza

RESUMO

Investigou-se a influência simultânea do pH, meio de cultura e efeito de inóculo na determinação do nível de resistência ao mercúrio, na linhagem selvagem *Escherichia coli* BH 100. Culturas de *E. coli* BH 100, apresentando resistência plasmidial ao mercúrio, foram diluídas e alíquotas semeadas em quatro meios de cultura (Agar Nutriente — AN; Meio de Antibiótico — MA; Agar de Mueller Hinton — MH e Agar Eosina Azul de Metileno — EMB), nos pHs 6,0 7,0 e 8,0, adicionados de diversas concentrações de bicloreto de mercúrio. Observou-se uma grande influência dos três parâmetros sobre os níveis de resistência ao bicloreto de mercúrio, que aumentaram com o pH e o inóculo. Observaram-se níveis mais altos em Agar EMB e Agar MH que em MA e AN. A partir destes resultados, optou-se pelo uso de Agar ou Caldo Nutriente, pH 7,0, adicionado de cloreto de sódio na concentração de 0,5% (p/V), uma vez que se verificou que a osmolaridade do meio de cultura também afetava o nível de resistência ao bicloreto de mercúrio.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, resistência ao $HgCl_2$

INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana ao mercúrio é geralmente codificada por genes plasmidiais (20, 25), embora, recentemente, variantes cromossômicos resistentes a este elemento já tenham sido obtidos (L.M.V. Guimarães & E. Chartone-Souza, Resumos da 36^a Reunião Anual da SBPC, 1984) e o gene para resistência cromossômica ao mercúrio em *Bacillus* sp já tenha a sua sequência de nucleotídeos determinada (28). O mecanismo e a genética da resistência plasmidial ao mercúrio estão bem estabelecidos (20,25): a presença do mercúrio induz a síntese de proteínas que se ligam a ele, transportando-o para o interior da célula. No citoplasma, os íons Hg^{2+} e Hg^+ são reduzidos a Hg^0 pela enzima

mercúrico-redutase, também induzida pelo mercúrio, e o Hg^0 é volatilizado. No caso da resistência a organomercuriais, inicialmente há uma quebra da ligação C-Hg destes compostos, catalizada pela organomercurial-liase. A regulação dos genes envolvidos também já está em parte, compreendida (25).

Os genes que conferem resistência plasmidial ao mercúrio são amplamente disseminados na natureza e se encontram quase sempre associados a genes para resistência a antibióticos. Esta disseminação é facilitada pela frequente localização dos genes de resistência ao mercúrio em transposons (12). A alta frequência com que estes genes ocorrem em populações bacterianas pode ser devida à alta pressão seletiva ambiental causada pela po-

Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG — Campus Universitário — Pampulha, 30.161 Belo Horizonte, MG, Brasil.

luição pelo mercúrio e/ou pelo uso inadequado de antibióticos, já que os respectivos genes de resistência estão associados nos mesmos plasmídios (25). Em *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* tem sido encontrada uma frequência de resistência ao mercúrio igual ou mais alta que a frequência de resistência a certos antibióticos (9, 22).

Alguns fatores ambientais influem na toxicidade dos metais pesados, como a sua ligação a constituintes do ambiente, o pH, e interações iônicas que podem interferir na disponibilidade do mercúrio (20). A influência da complexidade de meios de cultura sobre o nível de resistência ao mercúrio na linhagem *E. coli* B também já foi observada (24). Outro fator que pode interferir na resistência ao mercúrio é o tamanho do inóculo (1), fato amplamente conhecido em relação a antibióticos beta-lactâmicos (20) e aminoglicosídeos (5).

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de investigar e acrescentar à literatura dados sobre a influência simultânea do pH, tamanho do inóculo e de quatro meios de cultura, sendo três deles usados internacionalmente na determinação de níveis de resistência bacteriana a drogas, usando a *E. coli* BH 100, uma linhagem selvagem com resistência ao mercúrio inorgânico codificada em um plasmídio R.

MATERIAL DE MÉTODOS

Linhagens Bacterianas - *Escherichia coli* BH 100, fermentadora de lactose e portadora de plasmídio de resistência a drogas (plasmídio R conjugativo, com 60 megadaltons, com marcadore de resistência para cloranfenicol, canamicina, tetraciclina, estreptomicina e bicloreto de mercúrio; plasmídio R com 10 Mdal, com marcadore para resistência à ampicilina) (9, 17); *E. coli* K12 Sm^r, não fermentadora de lactose, não portadora de plasmídio, sensível ao mercúrio e às outras drogas mencionadas para a *E. coli* BH 100, e resistente a altas concentrações de estreptomicina, pela presença de gene cromossômico.

Meios e condições de crescimento - as linhagens eram mantidas a 4°C em meio de lignières (g/L de água destilada: Agar Agar Difco - 7,0, Caldo Nutriente Difco - 8,0 e gelatina Riedel de Haën - 5,0 conforme Bier (6), pH 7,4) e cultivadas em tubos com 4,5 ml de Caldo Nutriente (Difco), pH 7,0, a 37°C, por 24 horas.

Determinação do Título - o título foi determinado através de diluições seriadas a partir da cultura original, sendo alíquotas de 0,1 ml semeadas com alça de Drigalski em cada um dos meios, nos diversos pHs.

Determinação do nível de resistência - uma cultura de *E. coli* BH 100 crescida por 24 horas, a 37°C, em Caldo Nutriente, com cerca de 5×10^8 células por mililitro, era diluída (10^{-1} , 10^{-2} 10^{-7}) em solução fisiológica (cloreto de sódio Reagen 0,85%). Os níveis de resistência ao mercúrio eram determinados pelo método da diluição em placa: alíquotas de 0,01 ml da cultura original e suas diluições eram inoculadas com alças de níquel-cromo (multialça) em placas contendo Caldo Nutriente (Difco) adicionado de Agar - Agar 1,5% (Difco), Agar de Mueller Hinton (Difco), Meio de Antibiótico (Difco) e Agar Eosina Azul de Metileno - Teague (Difco), nos pHs 6,0, 7,0 e 8,0, adicionados de bicloreto de mercúrio (Merck) e em placas sem droga, para controle. Após incubação a 37°C por 24 horas, os níveis de resistência eram determinados, considerando-se a maior concentração de mercúrio em que houve crescimento bacteriano. Utilizou-se como controle a linhagem sensível ao mercúrio, *E. coli* K12 Sm^r.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em experimento prévio à determinação dos níveis de resistência da *E. coli* BH 100 ao bicloreto de mercúrio, determinou-se o número de unidades formadoras de colônias nos quatro meios de cultura e nos três pHs, na ausência da droga, com o objetivo de se estimar a população que estava sendo exposta ao mercúrio, nas diversas diluições, e de se investigar o efeito do meio de cultura e do pH no crescimento bacteriano. Os resultados estão apresentados na Tabela 1.

Efeito do inóculo - A Figura 1-A apresenta os níveis de resistência ao bicloreto de mercúrio da linhagem *E. coli* BH 100, usando diversos inóculos,

TABELA 1 - Unidades formadoras de colônias de *E. Coli* BH 100 presentes em cultura em caldo nutriente, incubada a 37°C por 24 horas, em diferentes meios de cultura e pHs.

pH	Colônias em diversos meios de cultura** (x 10 ⁷)			
	AN	EMB	MH	MA
6,0	49*	46	85	72
7,0	52	72	91	74
8,0	49	63	80	74

* Valor médio do número de UFC de 3 placas por mililitro

** AN — Ágar Nutriente; EMB — Ágar Eosina Azul de Metileno; MH — Ágar de Mueller Hinton; MA — Meio de Antibiótico.

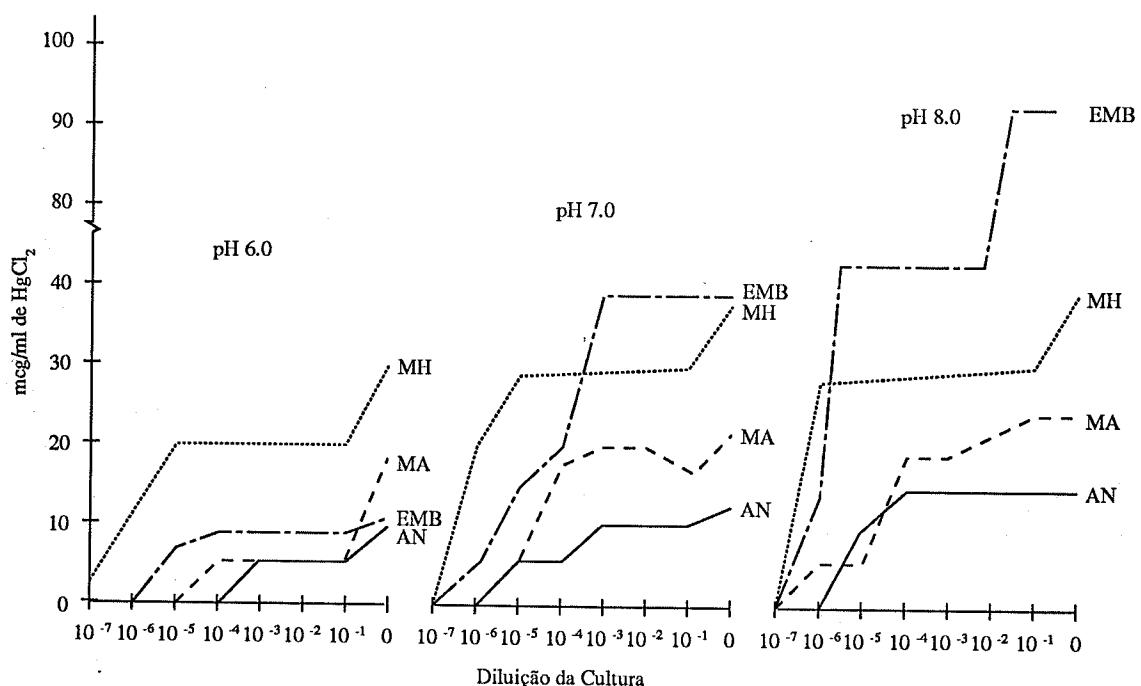


FIGURA 1 - Níveis de resistência ao bicloreto de mercúrio da linhagem *E. coli* BH 100 usando diversos inóculos em meios de cultura sólidos, nos pHs 6,0 (A), 7,0 (B) e 8,0 (C).

nos quatro meios de cultura (Agar Eosina Azul de Metíleno - EMB, Agar Mueller Hinton - MH, Meio de Antibiótico - MA e Agar Nutriente - AN), no pH 6,0. As Figuras 1-B e 1-C apresentam os níveis de resistência nos mesmos meios, nos pHs 7,0 e 8,0, respectivamente. Os gráficos mostram que quanto maior o inóculo, maior o nível de resistência ao mercúrio, e que as curvas são diferentes para os diversos meios de cultura. A linhagem *E. coli* K12 Sm^r, utilizada como controle, sensível ao mercúrio e não portadora de plasmídio, não foi submetida às diluições mencionadas para a *E. coli* BH 100.

O efeito de inóculo observado no nível de resistência ao mercúrio pode ser devido a uma maior proteção contra a droga, fato já conhecido em relação a antibióticos beta-lactâmicos (15) e aminoglicosídeos (5). Enquanto o efeito de inóculo para os beta-lactâmicos pode ser decorrente da secreção de lactamases, principalmente em gram-positivos, a mesma hipótese não é válida para os aminoglicosídeos, cujas enzimas envolvidas com a resistência são intracelulares, como ocorre também com as enzimas responsáveis pela resistência plasmidial ao mercúrio.

O efeito protetor de um inóculo maior na resistência ao mercúrio foi observado inicialmente

em linhagens de *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (1): determinaram-se concentrações inibitórias mínimas (MIC) de HgCl₂ para inóculos de 10⁶ e 10² células/ml de ambas as linhagens e constatou-se que as MIC eram mais altas quando os inóculos eram maiores. No entanto, outros pesquisadores não observaram diferenças significativas nos níveis de resistência em *E. coli*, quando utilizaram diferentes inóculos (16, 24).

A proteção conferida aos microrganismos através da inativação dos íons de mercúrio por compostos sulfidrílicos (-SH) é conhecida na literatura. A adição de compostos sulfidrílicos, como a cisteína e a glutationa, ao meio de cultura conferiu certo aumento de resistência à linhagem *Pseudomonas* K-62 (11) e a linhagens de *E. coli* (16). Este efeito protetor da cisteína foi observado também em relação à *E. coli* K12 Sm^r sensível ao mercúrio (10). Além disso, dados da literatura atestam a necessidade destes compostos sulfidrílicos e outros, como o tioglicolato, em excesso em relação à concentração do composto de mercúrio, para que ocorra a atividade enzimática da permease, mercúrio-redutase e organomercurial-liase, em sistemas livres de células (20).

Sabe-se que bactérias e outros microrganismos produzem naturalmente compostos inativadores de mercúrio (21). Portanto, uma cultura mais densa poderia produzir maior quantidade de tióis, levando a uma proteção contra o mercúrio do ambiente, pela ligação destes grupos com o íon de mercúrio, inativando-o. Além disso, numa maior concentração de células, a quantidade de mercúrio que vai interagir com cada célula é menor, o que pode apresentar um aumento de resistência. A presença de mutantes resistentes ao mercúrio em culturas mais densas também pode influir na determinação do nível de resistência, ou seja, uma resistência mais alta pode ser devida ao crescimento de variantes ou mutantes, não correspondendo à resposta da população como um todo.

Efeito do pH - A Figura 2 apresenta as curvas dos níveis de resistência ao bicloreto de mercúrio da linhagem *E. coli* BH 100, cuja cultura original foi diluída 100 vezes, em diversos pHs e meios de cultura. A diluição 10^{-2} foi escolhida por ser a menos afetada pelo efeito de inóculo; nesta diluição, o nível de resistência é semelhante ao das diluições mais próximas, como pode ser observado nas Figuras 1-A, 1-B e 1-C, além de corresponder a uma população adequada para a realização de antibiogramas, incluindo antibióticos e outras drogas. Para os três pHs ensaiados, o nível de resistência aumentou com o pH, qualquer que fosse o meio. Pode-se observar através da Tabela 1, que a *E. coli* BH 100 é pouco afetada pela variação do pH, quanto ao número de unidades formadoras de colônias, quando cultivada num mesmo meio sem a adição de mercúrio, ocorrendo o contrário quando o mercúrio está presente.

Uma possível causa do efeito do pH na resistência ao mercúrio, observado na Figura 2, é a especiação deste íon e, consequentemente, sua disponibilidade em diferentes pHs. Já se observou que a volatilização abiótica do mercúrio de meios de cultura é proporcional ao pH (2; P.P. Magalhães, Comunicação Pessoal). A taxa de metilação do íon mercúrico sofre uma queda quando há uma redução do pH de sedimentos, possivelmente pela menor disponibilidade deste íon em pHs baixos; a taxa de desmetilação (degradação do metilmercúrio) também sofre a influência do pH, apesar de sua menor extensão (19). Sabe-se que o pH das soluções normalmente afeta a química dos metais, a atividade de grupos funcionais da biomassa e a competição entre íons metálicos por sítios ativos (13).

Outra possível causa do efeito do pH na resistência ao mercúrio é o pH ótimo das enzimas mercúrico-redutase e organomercurial-liase. O pH ótimo da enzima mercúrico-redutase isolada de *E.*

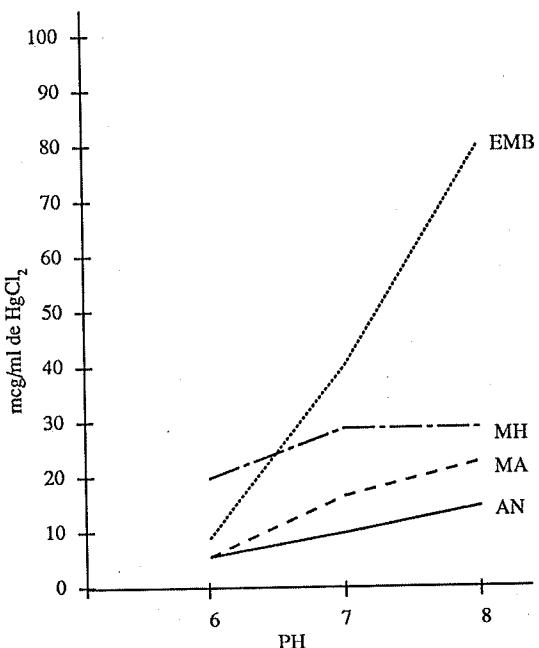


FIGURA 2 - Níveis de resistência ao bicloreto de mercúrio da linhagem *E. coli* BH 100, cultivada em caldo nutriente, a 37°C, por 24 horas e diluída a 10^{-2} , em diversos meios de cultura sólidos e pHs.

coli é 7,5 (23), o mesmo determinado para a enzima de *Thiobacillus ferrooxidans* (7). Encontrou-se um pH ótimo igual a 7,0 para a organomercurial-liase S-1 da *Pseudomonas K-62* (26) e determinou-se um pH ótimo igual a 5,0 para a organomercurial-liase S-2 da mesma linhagem (27). Os resultados obtidos neste trabalho concordam parcialmente com estas informações, uma vez que os níveis de resistência mais altos foram encontrados nos pHs 7,0 e 8,0, próximos do ótimo 7,5; no pH 6,0, onde se observaram níveis mais baixos, certamente as enzimas envolvidas não estavam na sua atividade ótima.

Efeito de meio de cultura - Neste trabalho, o meio de cultura que possibilitou o maior nível de resistência da *E. coli* BH 100, no pH 6,0, foi o Agar MH, seguido de MA, EMB e AN; nos pHs 7,0 e 8,0, os níveis mais altos foram encontrados em EMB, seguido de MH, MA e AN. O crescimento desta linhagem bacteriana na ausência da droga, determinado através da frequência da UFC/ml após 24 horas de cultivo, foi afetado pela complexidade do meio de cultura (Tabela 1). A maior frequência de crescimento da *E. coli* BH 100 foi observada no MH, seguido de MA, EMB e AN. Não se observou uma associação direta entre a frequência de crescimento bacteriano e nível de resistência ao

mercúrio, nos diversos meios. A composição destes meios apresenta diferentes complexidades. O Agar Nutriente é o meio, entre os usados neste trabalho, que apresenta composição mais simples, permitindo menor frequência de crescimento e menor nível de resistência para *E. coli* BH 100. Os meios mais complexos, Agar EMB e Agar MH foram os que levaram ao maior nível de resistência, indicando uma associação positiva. Estes meios têm um teor mais alto em radicais capazes de se ligar ao mercúrio, inativando-o, e desta forma dando uma resistência aparentemente aumentada a este íon (18).

O Agar Nutriente, juntamente com o Agar MH, apresentou menor variação dos níveis de resistência, nos diferentes pHs. Por isso e por ter levado a um menor nível de resistência, e, portanto, ter afetado menos a atividade do mercúrio, o Agar Nutriente foi escolhido para o desenvolvimento de ensaios subsequentes. Foi escolhido também o pH 7,0, por situar-se próximo do pH indicado para diversas soluções e meios de cultura para bactérias e também para se efetuar antibiogramas para a maioria dos antimicrobianos.

A influência da composição do meio de cultura no nível de resistência ao mercúrio já havia sido observada em linhagens de *E. coli* B (27): em meio mínimo, determinou-se uma concentração inibitória mínima de 3×10^{-6} moles de mercúrio por litro, e em meio enriquecido, $2,5 \times 10^{-4}$ moles/litro. Encontrou-se também, para uma linhagem de *P. aeruginosa*, um nível de resistência ao mercúrio mais alto em Brain Heart Agar (BHI), um meio rico, que em meio mínimo (14); linhagens de *E. coli* apresentaram níveis de resistência mais altos em Agar Nutriente que em meio quimicamente definido (16). Outro fator que pode interferir é a concentração de fonte de carbono; metais absorvidos por microrganismos através de um sistema de transporte ativo, com gasto de energia, podem ser menos tóxicos sob condições de escassez de carbono (8).

A osmolaridade também parece interferir na variação do nível de resistência ao mercúrio. Encontrou-se uma variação relativa no nível de resistência de todas as linhagens ensaiadas (dados não apresentados), o que também tem sido observado em relação a antibióticos aminoglicosídeos (S.O.P. Costa, Comunicação Pessoal). Estes antibióticos são dotados de carga positiva, como o íon Hg^{2+} , em pH próximo da neutralidade (4).

Muitos estudos mostraram que sais inorgânicos podem suprimir as atividades inibidoras de antibióticos aminoglicosídeos contra várias espécies bacterianas. Tanto cátions divalentes, como monovalentes, podem estar envolvidos. Estes sais podem interferir com a absorção da estreptomicina e outros aminoglicosídeos pelas bactérias (4;

S.O.P. Costa, Comunicação Pessoal).

A osmolaridade parece interferir também com a especiação do mercúrio: na água doce encontra-se este metal na forma de $Hg(OH)^2$, enquanto que em água salgada é encontrado nas formas de $HgCl_3^-$ e $HgCl_4^{2-}$, sendo sua toxicidade maior em água doce (3).

A adição de cloreto de sódio na proporção de 0,5% ao Caldo e ao Agar Nutriente, no presente trabalho, favoreceu a obtenção de níveis de resistência ao mercúrio mais estáveis e uma maior reprodutibilidade dos resultados. Esta é a concentração de cloreto de sódio utilizada no meio de Luria, indicada para se obter maior estabilidade nos resultados com antibióticos aminoglicosídeos (S.O.P. Costa, Comunicação Pessoal).

Portanto, conclui-se que é essencial se levar em consideração os parâmetros pesquisados neste trabalho, quando se pretende determinar concentrações inibitórias mínimas ou níveis de resistência de microrganismos ao mercúrio. Além disso, para se comparar dados da literatura, é necessário avaliar os efeitos das condições de trabalho de modo que estas comparações sejam válidas.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho recebeu suporte financeiro do CNPq/PIG e CAPES.

SUMMARY

Influence of pH, culture medium and inoculum size on mercuric chloride resistance in *Escherichia coli*.

Heavy-metal toxicity is influenced by a number of environmental factors such as binding to environmental constituents, pH and ion interactions, which influence its form and availability to microorganisms. The simultaneous influence of pH, culture medium and inoculum size on mercuric chloride resistance in the indigineous strain *Escherichia coli* BH 100 was investigated. Cultures of *E. coli* BH 100 showing plasmidial mercuric chloride resistance and dilutions were inoculated in different media (Nutrient Agar, Antibiotic Medium, Mueller Hinton Agar and Eosin Methylene Blue Agar) and pH (6,0, 7,0 and 8,0) to which different concentrations of mercuric chloride were added, through the agar dilution plate method. A culture of the plasmidless and streptomycin resistant strain *E. coli* K12 Smr was used as control. The higher mercury concentration which permitted bacterial growth after 24 hours incubation at 37°C was considered as the resistance

level. A great influence of these three parameters on mercuric chloride resistance was observed although influence of culture medium and pH on bacterial growth was not significant; mercuric chloride resistance increased with inoculum size and raise in pH, and was higher in Eosin Methilen Blue Agar and Mueller Hinton Agar than in Antibiotic Medium and Nutrient Agar. Nutrient Agar, pH 7,0, was chosen and used in the research continuation; sodium chloride 0,5% (w/V) was added since the effect of culture medium salt concentration on mercury resistance was also observed. This study concluded that the appreciation of these parameters during the determination of mercury minimal inhibitory concentrations or resistance levels is relevant and essential in the confrontation of data obtained in different conditions.

Key words: *Escherichia coli*, mercuric chloride resistance.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahonkai, I., Pugh, W.J. & Russell, A.D. - Sensitivity to antimicrobial agents of some mercury-sensitive and mercury-resistant strains of gram-negative bacteria. *Curr. Microbiol.*, 11: 1983-1986, 1984.
2. Baier, R.W., Wojnowich, L. & Petrie, L. - Mercury loss from culture media. *Anal. Chem.*, 47:2464, 1975.
3. Barkay, T. - Adaptation of aquatic microbial communities to Hg^{2+} stress. *Appl. Env. Microbiol.*, 53:2725-2732, 1987.
4. Beggs, W.H. - Suppressive actions of inorganic ions on the bioactivity of aminoglycoside antibiotics. *Life Sci.*, 24:663-668, 1979.
5. Berkman, S., Henry, R.J. & Housewright, R.D. - Studies on streptomycin. I. Factors influencing the activity of streptomycin. *J. Bacteriol.*; 53:567-574, 1947.
6. Bier, O. - Bacteriologia e Imunologia. 9^a ed. São Paulo, Melhoramentos. 756 p. 1959.
7. Booth, J.E. & Williams, J.W. - The isolation of a mercuric ion-reducing flavoprotein from *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Gen. Microbiol.*; 130:725-730, 1984.
8. Brynildsen, L., Lundgren, B.V., Allard, B. & Rosswall, T. - Effects of glucose concentrations on cadmium, copper, mercury and zinc toxicity to a *Klebsiella* sp. *Appl. Env. Microbiol.*, 54:1689-1693, 1988.
9. Chartone-Souza, E. - Resistência a drogas e propriedade colicinogênica em *Escherichia coli*. 76 p. Tese de Mestrado, 1975.
10. Guimarães, L.M.V. - Resistência cromossômica e plasmidial ao mercúrio em *Escherichia coli*. 124 p. Tese de Mestrado, 1986.
11. Hayakawa, K. & Fukui, S. Resistance to mercuric chloride in Psudomonas K-62. *Agric. Biol. Chem.*, 39:2171-2179, 1975.
12. Kleckner, N. - Transposable elements in prokaryotes. *Cell*, 11:11-23, 1977.
13. Kuyucak, N. & Volesky, B. - Biosorbents for recovery of metals from industrial solutions. *Biotechnol. Lett.* 10:137-142, 1988.
14. Loulit, J.S. - Investigation of the mating system of *Pseudomonas aeruginosa* strain I. VI. Mercury resistance associated with sex factor (FP). *Genet. Res.*, 16: 179-184, 1970.
15. Medeiros, A.A. Beta-lactamases. *Brit. Med. Bull.*, 40: 18-27, 1984.
16. Ohta, T. & Ueda, S. - Isolation of cadmium - and mercury - sensitive mutants of *Escherichia coli* and some factor influencing their sensitivities. *Agric. Biol. Chem.*, 41:461-466, 1977.
17. Oliveira, F.M. - Transferência e expressão de plasmídios R em *Escherichia coli*. Dissertação de Mestrado, 1980.
18. Picket, A.W. & Dean, A.C.R. - Cadmium and zinc sensitivity and tolerance in *Bacillus subtilis* subsp. *niger* and in *Pseudomonas* sp. *Microbios*, 24:51-64, 1979.
19. Ramlal, P.S., Rudd, J.W., Furutani, A. & Xun, L. - The effect of pH on methyl mercury population and decomposition in lake sediments. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 42:685-692, 1989.
20. Robinson, J.B. & Tuovinen, O.H. - Mechanisms of microbial resistance and detoxification of mercury and organomercury compounds: physiological, biochemical and genetic analysis. *Microbiol. Rev.*, 48:95-124, 1984.
21. Ross, I.S. & Old, K.M. - Thiol Compounds and resistance of *Pyrenophora avenae* to mercury. *Trans. Brit. Myc. Soc.*, 60:301-310, 1973.
22. Sant'Ana, Y.X. & Chartone-Souza, E. - Drug resistance and colicinogeny of *Salmonella typhimurium* strains isolated from sewage-contaminated surface water and humans in Belo Horizonte, Brazil. *Rev. Microbiol.*, 20:41-49, 1989.
23. Schotvel, J.L. - The mercuric and organomercurial detoxifying enzymes from a plasmid-bearing strain of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 253:4341-4349, 1978.
24. Smith, D.H. - R factors mediate resistance to mercury nickel and cobalt. *Science*, 156:1114-1116, 1967.
25. Summers, A.O. - Genetic adaptation involving heavy metals. Current Perspectives in Microbial Ecology. IN Proceedings of the Third International Symposium on Microbial Ecology: 94-104, 1988.
26. Tezuka, T. & Tonomura, K. - Purification and properties of an enzyme catalysing the splitting of carbon-mercury linkages from a mercury resistant *Pseudomonas* K-62 strain. *J. Biochem.*, 80:79-, 1976.
27. Tezuka, T. & Tonomura, K. - Purification and properties of a second enzyme catalysing the splitting of carbon-mercury linkages from a mercury-resistant *Pseudomonas* K-62. *J. Bacteriol.*, 135:138-, 1978.
28. Wang, Y., Moore, M., Levinson, H.S., Silver, S., Walsh, C. & Mahler, I. - Nucleotide sequence of a chromosomal-sal mercury resistance determinants from a *Bacillus* sp. with broad-spectrum mercury resistance. *J. Bacteriol.*, 171:83-92, 1989.

Recebido para publicação em 01/06/90

EMPREGO DA MEMBRANA FILTRANTE PARA ENUMERAÇÃO RÁPIDA DE *ESCHERICHIA COLI* NA CLARA E NO OVO LÍQUIDO

Clarice Queico Fujimura Leite¹

Pedro Magalhães Lacava²

Fumio Yokoya³

RESUMO

Desenvolveu-se um método rápido para identificação e enumeração de *E. coli* no ovo (clara e ovo líquido) através do uso da membrana filtrante. Trataram-se 5,0 ml de clara e 2,5 ml de ovo líquido, contaminados artificialmente com *E. coli*, com protease bacteriana, alcalase, e em seguida submetendo à filtração através da membrana HAWG 47 mm da marca Millipore, sob vácuo de 300 mm de Hg. O ovo líquido após a hidrólise e antes da filtração foi acrescido de solução de hidróxido de sódio e Tween 80. As membranas, após lavagens sucessivas com água destilada esterilizada, foram transferidas para placa contendo filtro absorvente embebido em caldo lauril sulfato, incubadas por 1,5 h a 35°C; transferidas para o meio de ágar m-Endo e incubadas por 18 h a 35°C; onde se desenvolveram as colônias de *E. coli*. A técnica da membrana filtrante foi comparada à técnica da semeadura em profundidade e àquela do Número Mais Provável.

Palavras-chave: *Escherichia coli*; técnica da membrana filtrante, clara de ovo, ovo líquido.

INTRODUÇÃO

O controle microbiológico de alimentos tem, como objetivo principal, fornecer um produto em condições higiênico sanitárias adequadas, livre de contaminantes capazes de causar riscos à saúde do consumidor. Os microrganismos patogênicos frequentemente encontrados nos alimentos, em número variável, podem tornar-se responsáveis por casos de toxioinfecções de origem alimentar. Devido às dificuldades na determinação de patógenos, costuma-se pesquisar grupos de microrganismos conhecidos como indicadores, entre os quais estão os indicadores de contaminação fecal. Muitos são

os trabalhos que discutem a importância da utilização de coliformes fecais e de *E. coli* como indicadores de contaminação fecal (2,4,6,9) e tem sido consenso que a presença de elevado número de coliformes sugere falta de limpeza, manuseio e estocagem impróprios dos alimentos e a eventual presença de microrganismos patogênicos.

Para a enumeração desses contaminantes fecais, utiliza-se a técnica do Número Mais Provável, que é a descrita e aceita pelas Comissões Internacionais pertinentes (1,3,4,11). Resultado positivo, segundo a técnica do Número Mais Provável, consiste na obtenção de microrganismos que fermentam a lactose, com produção de

1. Departamento de Ciências Biológicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - 14.800 - Araraquara - SP.
2. Departamento de Bioquímica e Microbiologia - Instituto de Biociências - UNESP - 13.500 - Rio Claro -SP.
3. Departamento de Ciência de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola - UNICAMP -13.100 - Campinas - SP.

gás 48h de incubação a 35-37°C. A ausência de gás após 48h de incubação (teste negativo, exclui alguns coliformes que fermentam lactose com lentidão (24) e até mesmo algumas cepas de *E. coli* enteropatogênicas não fermentadoras de lactose (15). Dentre as desvantagens da técnica do NMP está, por exemplo, a obtenção de um resultado falso positivo pela introdução de alimentos ricos em sacarose no meio de cultura e, consequentemente, produção de gás por bactérias não fermentadoras de lactose, mas que fermentam sacarose; ou, ainda, resultados falso negativos pela presença de inibidores naturais ou artificiais nos alimentos, que irão limitar o crescimento dos microrganismos, mesmo quando cultivados em meios apropriados (23). Ainda, sendo esse método um teste de número mais provável, ou seja, uma estimativa baseada em fórmulas de probabilidade (24) a exatidão está na dependência do número de tubos usados.

O presente trabalho teve como finalidade desenvolver uma metodologia rápida e prática para enumerar a *E. coli* presente no ovo de galinha (clara e ovo líquido). As amostras, após tratamento prévio adequado, foram submetidas à filtração através da membrana filtrante e cultivadas em meios de enriquecimento, meios seletivos e diferenciadores.

MATERIAIS E MÉTODOS

O ovo de galinha, por ser alimento rico em nutrientes (12) com alto teor de proteínas e de lipídios (8,12,17,19,20), torna sua filtração muito difícil. Foram estudados diferentes métodos, no sentido de reduzir a viscosidade das amostras, discriminados na Tabela 1, possibilitando a passagem adequada desse alimento através da membrana com poros de 0,45 µm.

O emprego da protease bacteriana "Alcalase" (Novo Industri do Brasil) (16) foi o tratamento de eleição, sendo estudadas as cinéticas dessa enzima em função de tempo e concentração para as proteínas da clara e da gema. A atividade da alcalase foi avaliada através da dosagem da tirosina liberada, segundo o método preconizado por Anson (5).

Após tais estudos prévios, foram determinadas como ótimas as concentrações de 0,045 µA de alcalase por grama de clara e 0,09 µA de alcalase por grama de ovo líquido e um tempo de digestão de 45 min. A temperatura de digestão foi fixada em 40°C, segundo as recomendações de Kirkhan e Hartman¹⁴, sem provocar injúria aos microrganis-

TABELA 1 - Tratamentos efetuados para aumentar filtrabilidade do ovo líquido e da clara

- a - adsorventes: alumina e terra diatomácea, na proporção (m/v) de amostra previamente diluída de 100 vezes o seu peso com água destilada
- b - surfactante: Tween 80 a 5%, na proporção (v/v) de 5,0 ml em 10,0 ml de amostra diluída de 100 vezes o seu peso com água destilada.
- c - precipitante: acetato de chumbo, na proporção (m/v) de 1,0 g em 3,0 ml de amostra diluída de 10 vezes o seu peso com água destilada.
- d - associação dos tratamentos a, b e c.
- e - floculante: polietingolico a 20%, na proporção (v/v) de 1,0 ml em 10,0 ml de amostra diluída de 10 vezes o seu peso com água destilada.
- f - variação de pH: acidificação da amostra com ácido clorídrico 0,1 N (aproximadamente 1,0 ml), após 10 min., a mistura foi filtrada através do papel de filtro Watman nº 1 e lavada com água destilada esterilizada.
- g - proteólise: utilização de diversas proteases como bromelina, papaina, pepsina, neutrase, alcalase, em concentrações variáveis, de acordo com a atividade enzimática, em tempo e temperatura de incubação de 40°C durante 45 minutos.

mos presentes. Pretendendo-se a dispersão dos lipídios, as amostras de ovo líquido foram tratadas com solução de hidróxido de sódio e de Tween 80.

Ficou estabelecido o seguinte procedimento para a clara: 5,0 g de amostra contaminada artificialmente com *E. coli* (ATCC - 25922), ressuspensa em solução salina esterilizada, numa concentração final de 1-100 células/g da amostra; incubação por 45 minutos a temperatura de 40°C, em banho-maria acrescido de 0,046 uA/g de alcalase (esterilizada em membrana filtrante) com agitação intermitente; filtração em condição de assepsia através da membrana HAWG 47 mm marca Millipore, sob vácuo de 300 mm de Hg; lavagem da membrana com água destilada esterilizada; pré-enriquecimento da membrana em Caldo Lauril Sulfat (concentração dupla) por 1,5 h a 35°C; transferência da membrana para Ágar Endo e incubação a 35°C por 18 h. Os meios de cultura utilizados foram aqueles sugeridos por Grabow e Preez (10). No caso do ovo líquido, a conduta foi semelhante ao procedimento para a clara, diferindo na quantidade de amostra, que foi de 2,5 g, na concentração de alcalase de 0,09 µA/g, e na adição após agitação intermitente de 2,0 ml de solução de hidróxido de sódio (0,05N) e de 5 ml de solução de Tween 80 a 0,5%. Seguindo-se

posteriormente os passos empregados para a clara.

Paralelamente, foram feitos ensaios de recuperação da *E. coli* através do método de semeadura em profundidade, utilizando-se o Ágar Endo e a técnica do Número Mais Provável, empregando-se Caldo Lauril Sulfato, para comparar os resultados de ambas as técnicas com a da membrana filtrante.

RESULTADOS

Os efeitos do tempo e da concentração enzimática na digestão protéica foram avaliados pela dosagem da tirosina liberada na hidrólise (Figs. 1 e 2). Com relação à concentração de alcalase acima de 0,0456 Unidade Anson/g de amostra, não houve aumento de liberação de tirosina, ocorrendo o mesmo

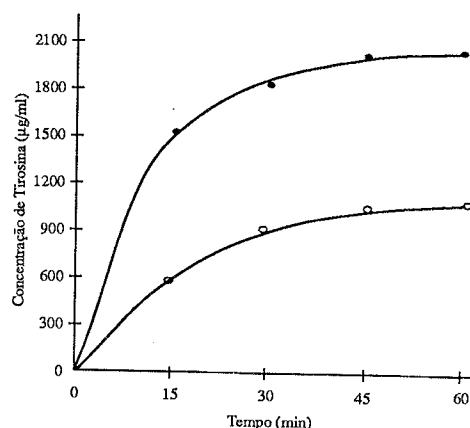


FIGURA 1 - Extensão da proteólise em função do tempo, a 40°C.

- Gema com alcalase, 0,0456 unidade Anson/ml
- Clara com alcalase, 0,0456 unidade Anson/ml

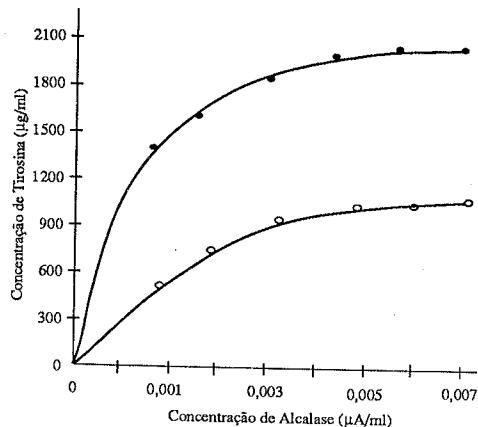


FIGURA 2 - Efeito da concentração de alcalase sobre a extensão da proteólise, a 40°C por 30 min.

- Gema
- Clara

com o tempo de reação maior do que 45 minutos.

Na Tabela 2 estão os resultados da recuperação da *E. coli* da clara e do ovo líquido contaminados artificialmente, através dos métodos de semeadura em profundidade e membrana filtrante. A reta de regressão dos números de microrganismos recuperados da clara pelo método da membrana filtrante, em função dos recuperados pelo método da semeadura, mostra uma equivalência entre os dois procedimentos, fornecendo coeficiente de correlação de 0,95, coeficiente angular de 0,99 e linear de 0,50. A mesma análise de correlação feita na experiência com o ovo líquido mostra um coeficiente de correlação de 0,98, porém um coeficiente angular baixo de 0,39. O decréscimo porcentual na recuperação dos microrganismos do ovo líquido pelo método da membrana filtrante, em relação à recuperação na semeadura, é constante, o que permite que seja proposto um fator multiplicativo de 2,6 para melhorar o resultado obtido com a membrana filtrante.

A Tabela 3 apresenta resultados quanto à recuperação da *E. coli* pela técnica do Número Mais Provável (NMP) e da membrana filtrante. Fazendo a regressão linear dos valores experimentais foram obtidos, para a clara e o ovo líquido respectivamente, coeficientes de correlação de 0,70 e 0,85, coeficientes lineares de 3,7 a 0,21 e coeficientes angulares de 0,48 a 0,58. Para a regressão, os resultados dos dois últimos experimentos da clara

TABELA 2 - Recuperação da *E. coli* inoculada artificialmente pelos métodos da semeadura e do membrana filtrante (MF).

Membrana filtrante	Clara (bactérias recuperadas/g)		Ovo líquido (bactérias recuperadas/g)	
	Semeadura	Membrana filtrante	Semeadura	Membrana filtrante
12	18	9,6	28	
13	11	10	21	
15	18	11	17	
18	17	11	21	
32	30	21	60	
40	45	22	55	
40	30	23	30	
48	52	25	50	
50	45	25	39	
54	53	38	59	
-	300	114	280	

Condições empregadas - quantidade de clara na técnica de MF: 5,0g; quantidade de ovo líquido na técnica de MF: 2,5g; quantidade de clara no método de semeadura: 1,0g e quantidade de ovo líquido no método de semeadura: 1,0g.

TABELA 3 - Recuperação de *E. coli*, inoculada artificialmente, pelos métodos de número mais provável (NMP) e de membrana filtrante (MF).

Clara (bactérias recuperadas/g)				Ovo líquido (bactérias recuperadas/g)			
MF	NMP	LI	LS	MF	NMP	LI	IS
4,0	3,3	1,1	9,3	1	13,0	3,5	30,0
5,1	4,9	1,7	12,6	1	24,0	6,8	73,4
6,0	7,2	2,3	18,4	2	7,9	2,3	18,7
6,0	7,9	2,3	18,7	2	4,9	1,7	12,6
7,0	3,3	1,1	9,3	2	10,9	3,1	25,1
8,0	9,4	2,8	21,9	6,0	4,6	1,6	12,0
9,1	13,0	3,5	30,0	8,0	17,2	4,1	48,4
10,0	9,4	2,8	21,9	19	21,2	5,3	66,9
10,0	7,9	2,3	48,4	40,0	27,8	9,0	84,9
ñ cont.	3,3	1,1	9,3	50,0	92,0	21,0	300,0
80,0	160,9	80,0	-	-	10,9	3,1	25,1
95,0	160,9	80,0	-	ñ cont.	10,9	3,1	25,1

ñ cont. : não contável, quando ocorreu sobreposição das colônias ou delimitação imprecisa das mesmas
: quando não houve crescimento de colônias com característica de *E. coli* sobre a MF.

LI : limite inferior
LS : limite superior

foram excluídos, pois o número de colônias recuperadas na membrana filtrante estava muito além do recomendado (4), prejudicando a contagem e fornecendo resultados mais baixos do que o NMP, porém não abaixo do limite inferior do intervalo.

DISCUSSÃO

Com relação aos resultados expressos nas Tabelas 2 e 3, foi verificado que é possível a filtração de volumes apreciáveis da amostra, da ordem de 5,0 g de clara, através da membrana filtrante, após tratamento adequado, sem contudo reduzir o número de microrganismos variáveis. Outros autores, desenvolvendo trabalhos similares, verificaram a possibilidade de filtrar até 5,0 g de leite em pó desnatado (18) 0,5 g de carne moída (22), 0,7 g de ervilha (22) e 5,0 g de gelatina (7), desmistificando, assim, a crença da impossibilidade do uso da membrana filtrante em alimentos.

Observando ainda as Tabelas mencionadas, verifica-se que a introdução de alcali e detergente no ovo líquido tem efeito prejudicial na recuperação da *E. coli*. Por outro lado, os resultados demonstram que uma proteólise de 45 minutos a 40°C com a alcalase não afeta a viabilidade da *E. coli* presente na clara, fornecendo coeficiente de

correlação de 0,95, coeficiente angular de 0,99 e linear de 0,50 na reta de regressão dos números de microrganismos recuperados da clara pelo método da membrana filtrante em função dos recuperados pela sementeira. O ovo líquido com alto teor de material graxo (20), além da digestão protéica, necessitou de outros tratamentos, como elevação do pH e emprego de detergente; para favorecer a filtração; porém tais procedimentos são prejudiciais às bactérias Gram negativas. Em experimentos prévios, havíamos verificado a menor recuperação da *E. coli* quando mantida em um pH acima de 10, mesmo que somente por 10 minutos.

Quanto ao número de microrganismos recuperáveis na membrana, a Tabela 3 mostra que num material com densidade alta de *E. coli* a contagem é prejudicada, fornecendo resultados mais baixos do que os dos métodos tradicionais. Este fato está de acordo com a recomendação da American Public Health Association (4), a qual diz que o número de coliformes recuperados na membrana não deve ultrapassar o de 80, exatamente por causa da dificuldade de contagem quando a densidade populacional é alta. Para contornar esse inconveniente, Sharpe e Michau (21) propuseram a utilização da "Hidrofobic Grid Membrane Filter", que permite contagens de até 10^3 microrganismos, devido aos inúmeros retículos de cera impressos sobre a membrana. Fazendo a regressão linear dos valores experimentais da Tabela 3, foram obtidos, para a clara e o ovo líquido respectivamente, coeficientes de correlação de 0,70 e 0,83. A baixa correlação entre os resultados obtidos pelo método da membrana filtrante e pelo Número Mais Provável (NMP), acreditamos seja devido ao fato de os valores fornecidos pelo NMP já se tratarem de resultados estatísticos, eles próprios afetados de uma razoável dispersão. Mesmo assim, todos os resultados fornecidos pela técnica da membrana filtrante na clara situaram-se dentro dos intervalos da densidade de população bacteriana (nível de confiança de 95%) obtidos pelo método de NMP.

Desta forma concluímos que a utilização da técnica da membrana filtrante na clara é perfeitamente viável para a identificação da *E. coli*, mesmo em concentrações baixas, da ordem de um microrganismo por grama de clara, utilizando a protease bacteriana "Alcalase" na concentração de 0,045 Unidades Anson/g e submetida a digestão por 45 minutos a 40°C. A contagem das colônias sobre a membrana com características da *E. coli* pode ser realizada após 16 a 18 h de crescimento nos meios seletivos diferenciais (13); a obtenção de colônias isoladas permite a transferência direta dos microrganismos para os meios

apropriados para a realização das provas bioquímicas. A utilização da técnica da membrana filtrante para identificação e a enumeração da *E. coli* no ovo líquido é viável, com limitações em termos de recuperação, sendo necessária a introdução de um fator de correção.

SUMMARY

Membrane filtration technique for rapid enumeration of *Escherichia coli* in egg white and whole liquid egg.

A fast method for identification and enumeration of *E. coli* in whole liquid egg and egg white using membrane filter (MF) technique was developed. Sample were treated with bacterial protease (Alcalase) and filtered through membrane filter 0.45 µm pore size for microbial cell retention. Treatments of whole liquid egg, with sodium hydroxide and Tween 80 were carried out prior to the filtration. Colonies on membrane filter were counted after 18 hr. incubation at 35°C on m-Endo agar. This technique was compared with plate count and MPN techniques. The results indicated that MF techniques were suitable for enumeration and identification of *E. coli* in egg white at a concentration as low as one cell per gram of sample. With whole liquid eggs, the results must be corrected by a factor 2.6.

Key Words: *E. coli*, membrane filter technique; egg white; whole liquid egg.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. American Association of Cereal Chemistry. Washington, 1969 - Method 42-45, p. 1 a 5.
2. American Public Health Association. New York - Recommended methods for the microbiological examination of foods. 2 ed. New York, 1966.
3. American Public Health Association. New York - Standard methods for the examination of water and wastewater. 13 ed. New York, 1971. p. 189-208.
4. American Public Health Association. New York - Standard methods for the examination of water and wastewater. 17 ed. New York, 1989. p. 678-88.
5. Anson, M.L. & Mirsky, A.E. - The estimation of pepsin with Hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, **16**: 59-63, 1932.
6. Buttiaux, R. & Mossel, D.A.A. - The significance of various organisms of faecal origin in foods and drinking water. *J. Appl. Bacteriol.*, **24**: 353, 1961.
7. Chesworth, K.A.C. et alii - An enzymic technique for the microbiological examination of pharmaceutical. *Gelatin. J. Pharm. Pharmac.*, **29**: 60-1, 1977.
8. Food and Agriculture Organization. Roma - *Amino-Acid content of foods and biological data on proteins*. Roma, 1970 (Nutritional Studies nº 24).
9. Geldrich, E.E. 1966. *Sanitary significance of fecal coliforms in the environment*. Washington - Federal Water Pollution Control Administration, 1966 (Publ. WP 20-3).
10. Grabow, W.O.K. & Duprees, M. Comparison of m Endo les, Mac Comkey, and Teepol media for membrane filtration counting of total coliform bacteria in water. *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**: 351-8, 1979.
11. International Commission on Microbiological Specifications for Foods - *Microorganisms in Foods: their significance and methods of enumeration*. 2 ed. Toronto, University of Toronto Press, 1978. p. 8-11; 15-19; 125-137; 160-171.
12. International Commission on Microbiological Specification for Foods - *Microbiol. ecology of foods*. New York, Academic Press, 1980. V.2, p. 521-524.
13. Klaber, P.W. & Clark, H.F. - The use of differential media with the membrane filter. *Health Nat. Health*, New York, **42**: 390-392, 1952.
14. Kirkhan, N.K. & Hartman, P.A. - Membrane filter method for the detection and enumeration of *Salmonella* in egg albumen. *Poult. Sci.*, **41**: 1082-1088, 1962.
15. Mehlmann, I.J.; et alii. Methodology for enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, **58**: 283-5, 1975.
16. Novo Industri A/S. Dinamarca - Alcalase, Bags vaerd, Dinamarca. 1977.
17. Parkinson, T.L. - The chemical composition of egg. *J. Sci. Food Agric.*, **17**: 101-111, 1966.
18. Peterkin, P.I. and Sharpe, A.N. - Membrane filtration of dairy products for microbiological - analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**: 1138-43, 1980.
19. Reasoner, D.J. et alii - Rapid seven-hour fecal coliform test. *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**: 229-36, 1979.
20. Romanoff, A.L. & Romanoff, A. ed *The avian Egg* 2 ed New York, John Wiley and Sons. 1963, p. 311-539.
21. Sharpe, A.N. and Michaud, G.L. - Hydrophobic grid membrane filters: new approach to microbiological enumeration. *Appl. Microbiol.*, **28**: 223-225, 1974.
22. Sharpe, A.N. et alii - Membrane filtration of food suspensions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**: 21-35, 1979.
23. Sharpe, A.N. - Improved detection of coliforms and *Escherichia coli* in foods by a membrane filter method. *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**: 431-35, 1979.
24. Yokoya, F. - *Métodos e Técnicas em Microbiologia de Alimentos*. Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1978. p. 189-208.

Recebido para publicação em 04/10/90

ISOLAMENTO DE *SALMONELLA* EM DIFERENTES MEIOS SELETIVOS DE ENRIQUECIMENTO, TEMPOS E TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO

Dariela Flores Calderon*
Sirdéia Maura Perrone Furlanetto*

RESUMO

A pesquisa visou estudar a eficácia de meios seletivos de enriquecimento, tempos e temperaturas de incubação no isolamento de salmonelas. Partindo-se de amostras de carne de suíno naturalmente contaminadas, foram utilizados três meios seletivos de enriquecimento, selenito cistina (SC), tetratônato (TT) adicionado de novo biocina e o meio de Rappaport modificado (R1O) a 35°C e 43°C, todos mantidos em estufa por 24 e 48 horas. Das 30 amostras analisadas, 3 (10%) foram positivas tendo sido isolados os sorotipos *S. derby*, *S. agona* e *S. oranienburg*. O caldo TT incubado a 43°C por 48 horas permitiu maior grau de positividade.

Palavras-chave: meios de enriquecimento para *Salmonella*; *Salmonella*; *Salmonella* em carne suína.

INTRODUÇÃO

A procura de uma metodologia ideal para o isolamento de salmonelas a partir de alimentos, tem sido uma constante entre os pesquisadores que militam na área de Microbiologia de Alimentos.

Vários autores (1, 6, 9, 11, 14, 20) têm sugerido a utilização de diferentes meios seletivos de enriquecimento combinados a uma série de temperaturas e tempos de incubação. Dependendo do tipo de alimento e de suas condições de preparo e estocagem, determina-se qual a melhor técnica a ser utilizada.

Com a finalidade de poder contribuir com alguns dados a respeito da eficácia de meios de enriquecimento, tempos e temperaturas de incubação ideais à recuperação de salmonelas a partir de alimentos, propusemo-nos a comparar a eficácia dos caldos selenito-cistina (SC) incubados a 35°C, tetratônato-novobiocina (TT) e meio de Rappaport modificado (R1O) incubados à

temperaturas de 35°C e 43°C, todos mantidos em estufa por 24 horas e 48 horas.

Para esta pesquisa, elegemos como alimento a ser analisado a carne de suíno que, segundo a literatura compilada, apresenta uma positividade para *Salmonella* compreendida entre 4,8% e 87,5% (5, 14, 21, 22).

MATERIAL E MÉTODOS

Na comparação da eficácia entre três meios de enriquecimento para salmonelas, foram utilizadas 30 amostras de carne suína adquiridas em açougues do Município de São Paulo. As amostras foram levadas ao laboratório, em caixas de material isotérmico, e a análise bacteriológica iniciada imediatamente.

Cada amostra de carne suína foi dividida em cinco porções de 25 gramas que foram colocadas respectivamente em frasco contendo 225 ml de caldo SC (Merck, art. 7709), dois frascos de caldo

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

TT (Merck, art. 5285) (8) e dois frascos contendo meio R10 (19). O caldo SC foi incubado à temperatura de 35°C, dois frascos contendo caldo TT e R10 foram incubados a 35°C, outros dois frascos contendo os caldos TT e R10 foram incubados à temperatura de 43°C. Os meios de enriquecimento foram incubados por 24 horas e 48 horas.

Após incubação e a partir dos caldos de enriquecimento foram inoculadas placas de ágar *Salmonella-Shigella* e ágar verde brilhante, as quais foram incubadas a temperatura de 35°C durante 24 horas.

Após a incubação selecionavam-se de cada placa algumas colônias não fermentadas da lactose, as quais foram semeadas em ágar tríplice-açúcar-ferro e incubadas por 24 horas à 37°C. As culturas que revelaram um comportamento bioquímico semelhante ao de *Salmonella*, foram submetidas à série de provas bioquímicas de identificação a saber: produção de desaminase de fenilalanina, urease, descarboxilase da lisina, fermentação de carboidratos, utilização de malonato e citrato, prova de motilidade, produção de indol e reação de VM-VP.

Após as provas bioquímicas, as cepas que se apresentavam com características das de *Salmonella*, foram submetidas às provas de soro-aglutinação em placa de Huddleson para抗ígenos somáticos "O" e flagelares "H". As cepas, revelando-se positivas nas provas de soro-aglutinação, foram enviadas à Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, onde foi realizada a identificação dos sorotipos.

DISCUSSÃO

Das 30 amostras de carne suína examinadas 3 (10%) revelaram-se positivas para bactérias do gê-

nro *Salmonella*. A *S. derby* mostrou-se presente em 2 (6,6%) das amostras e a *S. agona* e *S. oranienburg* em 1 (3,3%). Deve-se ressaltar que em uma das amostras, foram isolados os sorotipos *S. derby* e *S. oranienburg*. A positividade para salmonelas por nós obtida foi semelhante ao observado por outros autores (2,14), que evidenciaram, em carcaças de suínos, positividade para salmonelas da ordem de 10% e 10,25% respectivamente. Por outro lado, foi superior aos observados por alguns pesquisadores (16, 18, 22), que evidenciaram positividade para esta bactéria da ordem de 4,5% a 8%, ao analisarem o mesmo tipo de alimento.

Pesquisando-se dados existentes na literatura, verifica-se que vários autores (4, 5, 10, 12, 13) ao analisarem carne de suíno obtiveram resultados para a pesquisa de *Salmonella* superiores, aos por nós encontrados, sendo que a porcentagem de positividade variou de 13,3% a 87,5%.

Para a pesquisa de bactérias do gênero *Salmonella* utilizamos como meios seletivos de enriquecimento, o caldo SC incubado à temperatura de 35°C e os caldos TT + novobiocina e R10 incubados as temperaturas de 35°C e 43°C. Utilizamos o caldo SC incubado somente a temperatura de 35°C, uma vez que, segundo Gomes & Furlanetto (7), a incubação do caldo SC a temperatura de 35°C e 43°C por 24 horas ou 48 horas, parece não influir nos níveis de recuperação de salmonetas.

Van Schothorst & Renaud (19), coordenando pesquisa realizada em vários laboratórios, concluíram pela recomendação da utilização da temperatura de 43°C para a incubação dos caldos R10 e TT e a incubação a 37°C para o caldo SC.

No presente estudo, analisando-se a Tabela 1 quanto aos resultados obtidos com relação aos caldos seletivos de enriquecimento e temperaturas de incubação verifica-se que a partir dos caldos R10

TABELA 1 - Efeito da temperatura e tempo de incubação no isolamento de salmonetas a partir de 30 amostras de carne suína.

Amostra	Meios de Enriquecimento							
	SC*		TT**				R10***	
	35°C	48 h	35°C	24 h	48 h	43°C	24 h	48 h
1	-		<i>S. agona</i>	-	-	<i>S. agona</i>	-	-
2	-		-	-	-	<i>S. derby</i>	<i>S. derby</i>	-
3	-		-	-	-	<i>S. derby</i>	<i>S. derby</i>	-
Total	-	1 (33,3%)	-	-	-	2 (66,7%)	3 (100,0%)	-

* SC = caldo selenito-cistina (Merck, art. 7709)

** TT = caldo tetracionato + novobiocina (Merck, art. 5285) (8)

*** R10 = meio de Rapaport modificado (19)

incubados a 35°C e 43°C por 24 e 48 horas, não se obteve positividade para o isolamento de salmonelas, o que está em discordância com Van Schorst & Renaud (19) que sugerem a superioridade deste meio quando comparado com o caldo TT.

A partir do caldo SC incubado a 35°C por 48 horas, foi isolada uma cepa de *S. agona* (33,3%), das amostras positivas, enquanto que a temperatura de 35°C por 24 horas, não se obteve positividade. Com relação ao caldo seletivo de enriquecimento TT + novo biocina não se obteve isolamento da bactéria à temperatura de 35°C, quer por um período de incubação de 24 horas, quer por 48 horas.

Analizando-se os resultados obtidos com o caldo TT + novobiocina incubado à temperatura de 43°C por 24 horas (Tabela 1), verifica-se que de 2 amostras foi possível o isolamento da bactéria, porém foi à temperatura de 43°C por um período de incubação de 48 horas que as 3 amostras se revelaram positivas. Pode-se verificar, que de uma das amostras foram isolados dois sorotipos diferentes de *Salmonella*, a *S. derby* e *S. oranienburg*. Vale a pena assinalar que considerando-se essa mesma amostra (Tabela 1), foram isoladas salmonelas somente a partir do caldo seletivo de enriquecimento de TT + novobiocina. Apenas a *S. derby* foi isolada à temperatura de 43°C após 24 horas de incubação, enquanto que a *S. oranienburg* só o foi após 48 horas.

Em estudos semelhantes, Gomes & Furlanetto (7) obtiveram maior positividade para salmonelas, a partir de fígado de bovino, para amostras semeadas em caldo TT + novobiocina incubado à temperatura de 43°C por 48 horas. O mesmo foi observado por Fernández e cols. (4) com relação ao caldo TT incubado a 43°C, estudando a frequência de salmonelas em carnes cruas de suíno, bovino e de frango.

Por outro lado, Swaminathan e cols. (17) empregando somente a temperatura de incubação a 37°C, verificaram que as percentagens de positividade para *Salmonella*, em carne e aves cruas, eram iguais tanto para o caldo TT quanto para o SC.

Diante disto recomendamos, a exemplo de alguns autores (1,3,10,11,15), o emprego de duas temperaturas de incubação 35°C-37°C e 43°C bem como o emprego de, pelo menos, dois caldos seletivos para se obter um maior isolamento de *Salmonella* a partir de alimentos.

Acreditamos que a maior positividade no isolamento de salmonelas não está na dependência de apenas um fator isolado, mas de vários fatores que interagem mutuamente. A interação do meio seletivo de enriquecimento, temperatura e tempo de incubação seriam determinantes, fundamentais, para melhor isolamento da bactéria.

SUMMARY

Dynamics of *Salmonella* isolation with tetrathionate-novobiocin selenite cystine enrichment broth and modified Rappaport's medium.

Enhanced growth of salmonellae in tetrathionate (TT) with novobiocin enrichment broth was obtained when compared to selenite cystine (SC) and modified Rappaport's medium (R10). SC was incubated at 35°C whereas TT and R10 were incubated at 35°C and 43°C. All media were incubated for 24 and 48 hours. For this experiment, we utilized 30 samples of fresh acquired in various markets at the city of São Paulo, Brazil. Three (10%) samples were positive for *Salmonella* serotypes as *S. agona*, *S. derby* and *S. oranienburg*. Results suggest that TT enrichment at 43°C for 24 and 48 hours showed more positive results than 35°C and superior to that obtained with SC broth enrichment. None isolation was obtained with R10 medium.

Key Words: Enrichment broth for *Salmonella*; *Salmonella*, *Salmonella* in fresh pork.

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrews, W. H. Resuscitation of injured *Salmonella* spp and coliforms from foods. *J. Food Prot.*, 49: 62-75, 1986.
- Childers, A.B.; Keahey, E.E.; Vicent, P.G. Sources of salmonellae contamination of meat following approved livestock slaughtering procedures. II. *J. Milk Food Technol.*, 36: 635-638, 1973.
- D'Aoust, J.Y. Effective enrichment-plating conditions for detection of *Salmonella* in foods. *J. Food Prot.*, 47: 588-590, 1984.
- Fernández, E.E.; Saldaña, L.J.; Mirfis, H.C. Incidencia de *Salmonella* en carnes crudas. Influencia del enriquecimiento en la recuperación del microorganismo. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, 25: 263-269, 1983.
- Fukushima, H.; Hoshina, K.; Nakamura, R.; Ito, Y. Raw beef, pork and chicken in Japan contaminated with *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp., *Yersinia enterocolitica* and *Clostridium perfringens*. A comparative Study. *Zbl. Bakt. Hyg.*, 184: 60-70, 1987.
- Georgala, D.C. & Boothroyd, M. A system for detecting salmonellae in meat and meat products. *J. Appl. Bacteriol.*, 28: 206-212, 1965.
- Gomes, M.F.F. & Furlanetto, S.M.P. Salmonelas em

- amostras de fígado bovino e avaliação da eficiência de meios de enriquecimento seletivo, tempo e temperatura de incubação no seu isolamento. *Rev. Microbiol.*, 16: 211-221, 1985.
8. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Their significance and methods of enumeration, 2nd ed. Toronto, University of Toronto Press, 1978, 434p.
 9. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganismos de los alimentos, 2 ed. Zaragoza, Acerbia, 1983. v.1, 431p.
 10. Lammerding, A.; Garcia, M.; Mann, E.; Robinson, Y. Prevalence of *Salmonella* and thermophilic *Campylobacter* in fresh pork, beef, veal and poultry in Canada. *J. Food Prot.*, 51: 47-52, 1988.
 11. Madden, R.; Hough, B.; Gillespie, C. Occurrence of *Salmonella* in porcine liver in Northern Ireland. *J. Food Prot.*, 49: 893-894, 1986.
 12. Morgan, I.; Krautil, F.; Craven, J. Bacterial populations on dressed pig carcasses. *Epidemiol. Infect.*, 98: 15-24, 1987.
 13. Nakanishi, H.; Murase, M.; Nukina, M.; Takizawa, K.; Asakawa, Y.; Sakazaki, R. Present aspects of *Salmonella* contamination of meat in Japan. In: CONTROL of the microbial contamination of foods and feeds in international trade: microbial standards and specifications, 1982. p. 121-123. apud *Food Sci. Technol.*, 16: 12S, 2381, 1984.
 14. Sharma, V.; Singh, S.; Taku, A. *Salmonella* from commercial pork preparations: isolation, drug-resistance and enterotoxicity. *Int. J. Food Microbiol.*, 5: 57-62, 1987.
 15. Sinell, H.; Klingbeil, H.; Benner, M. Microflora of edible offal with particular reference to *Salmonella*. *J. Food Prot.*, 47: 481-484, 1984.
 16. Schmidt, U. Occurrence and behaviour of salmonellae in minced pork. *Fleischwirtschaft*, 68: 43-46, 1988 apud *Food Sci. Technol.*, 20: 6S-76, 1988.
 17. Swaminathan, B.; Link, M.; Ayres, J. Incidence of salmonellae in raw meat and poultry samples in retail stores. *J. Food Prot.*, 41: 518-520, 1978.
 18. Turnbull, P.C. & Rose, P. *Campylobacter jejuni* and *Salmonella* in raw red meats. *J. Hyg.*, 88: 29-37, 1983.
 19. van Schoorl, M. & Renaud, A.M. Dynamics of *Salmonella* isolation with modified Rappaport's medium (R10). *J. Appl. Bacteriol.*, 54: 209-215, 1983.
 20. Vassiliadis, P.; Kalapothaki, V.; Trichopoulos, D.; Mavrommatti, C.; Serie, C. Improved isolation of *Salmonellae* from naturally contaminated meat products by using Rappaport-Vassiliadis enrichment broth. *Appl. Environ. Microbiol.*, 42: 615-618, 1981.
 21. Weissman, M.A. & Carpenter, J.A. Incidence of *Salmonella* in meat and products. *Appl. Microbiol.*, 17: 899-902, 1969.
 22. Zimmermann, T. & Schulze, K. *Salmonella* in minced pork. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 37:79, 1986 apud *Food Sci. Technol.*, 20: abstract 2S-90, 163, 1988.

Recebido para publicação em 20/12/90.

CRESCIMENTO DE *CLOSTRIDIUM BOTULINUM* EM MEIOS DE CULTURA DE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*, EM DIFERENTES ATMOSFERAS ANAERÓBIAS E TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO

Antônio de Melo Serrano¹

Valéria Christina Amstalden Junqueira²

RESUMO

O crescimento e a produção de toxina de *Clostridium botulinum* tipos A, B e E em meios de cultura recomendados para o isolamento de *Clostridium perfringens* (ágar triptose-sulfato-cicloserina e ágar sulfato-polimixina-sulfadiazina) foram examinados neste trabalho. As temperaturas de incubação de 35°C e 45°C e três diferentes atmosferas anaeróbias (mistura de gás nitrogênio e dióxido de carbono na proporção de 9:1; gás hidrogênio e dispositivo de anaerobiose Gaspak) também foram avaliadas.

Os resultados demonstraram que pode haver crescimento e produção de toxina de *C. botulinum* em algumas das condições testadas.

Palavras-chave: *Clostridium perfringens*; *Clostridium botulinum*; Toxina.

INTRODUÇÃO

No Brasil, os laboratórios oficiais ou privados que analisam alimentos, espalhados por todo o país, realizam constantemente pesquisas de clostrídios-sulfato-redutores, já que os alimentos admitem limites desses microrganismos, fixados pela Portaria nº 1, de 28 de janeiro de 1987, da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária (DINAL), do Ministério da Saúde (10).

A citada Portaria estabelece que "no que se refere a metodologia para clostrídios-sulfato-redutores, adota-se o descrito para *Clostridium perfringens* quanto aos meios de cultura e métodos de semeadura" contido no "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods", elaborado pela American Public Health Association e editado por Speck (13). Estabelece ainda que "a caracterização de clostrídios-sulfato-redutores é feita pela incubação a 46°C, por 24 horas, em anaerobiose".

Apesar dessas determinações, o que se observa é que os técnicos laboratoristas admitem e praticam modificações nesses métodos, nascidas de sua experiência particular ou impostas pelas carências dos laboratórios.

O pesquisador, quando delibera trabalhar com *C. perfringens* ou clostrídios-sulfato-redutores, adotando quer a metodologia recomendada, quer a modificada por ele, ao fazer enriquecimento em meios não seletivos, transferências de meios líquidos, isolamentos e contagens em placas (até mesmo seletivas), descartes dos meios e outras operações, não se lembra que pode estar ocorrendo o risco de deparar-se com a presença de *Clostridium botulinum* nesses meios e até mesmo de correr o risco de contaminação pela perigosa toxina deste microrganismo.

A diferenciação entre as colônias de *C. perfringens* e *C. botulinum* não é imediata. O meio de ágar triptose-sulfato-cicloserina (TSC), reco-

1. Faculdade de Engenharia de Alimentos Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Caixa Postal 6121
13081 - Campinas - SP.

2. Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL, Av. Brasil, 2880, Caixa Posta 139
13073 - Campinas - SP.

mendado em Speck (13) para *C. perfringens*, já vem sendo usado pelos laboratórios (embora haja dificuldade de aquisição da cicloserina); o meio de ágar sulfito-polimixina-sulfafiazina (SPS), de Angelotti (1), era muito usado no passado e hoje ainda é empregado em muitos laboratórios. A coloração negra das colônias nestes dois meios de sulfito ocorre regularmente quando se trata de *C. perfringens* ou de *C. botulinum*. Porém a primeira destas bactérias pode não dar tal coloração (6, 11) e fato similar pode ocorrer, quando a colônia é de *C. botulinum* (nossa observação). A reação de lecitinase que usualmente ocorre com o *C. perfringens* em meio que contém gema de ovo (como é o caso do TSC) e é negativa nos tipos A, B e E de *C. botulinum*, pode não aparecer no primeiro microrganismo (13) pelo que as duas espécies podem não se diferenciar através desta reação. A reação da lipase, própria do *C. botulinum*, pode ser confundida com a de lecitinase por um técnico menos familiarizado com estas reações.

A conclusão a que se chega é que não há distinção segura entre as duas espécies de clostrídios, quando se usam como características iniciais de diferenciação estes parâmetros.

A temperatura de 46°C recomendada para clostrídios-sulfito-redutores na citada Portaria nem sempre é usada nos laboratórios. É comum os técnicos usarem a temperatura de 35°C, como se recomenda em Speck (13), porque não têm disponibilidade de incubadora regulada à temperatura de 46°C. Algumas incubadoras têm grandes variações de temperaturas ao longo do dia e ainda mesmo entre os diversos locais do seu interior. A melhor temperatura de incubação de *C. perfringens* é 45°C (9, 12), e esta temperatura ou 46°C, mencionada na citada legislação, ou mesmo 48°C (2), também permitem o crescimento de algumas estirpes de *C. botulinum*.

Quanto às atmosferas de incubação, parecemos ser mais comum o uso de Gaspak (H_2 e CO_2 produzido depois do jarro de anaerobiose ser fechado e remoção do oxigênio cataliticamente). As atmosferas mais econômicas, resultantes da exaustão dos jarros, seguidos da injeção de hidrogênio (4), parecem-nos virem a ser mais usados no futuro. Estes dois tipos de incubação são recomendados em Speck (13).

Na presente pesquisa, procuramos verificar, se, adotada alguma variável das metodologias de isolamento de *C. perfringens*, pode ocorrer o crescimento de *C. botulinum* e haver produção da toxina desta bactéria.

MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi constituída de dois experimentos: inoculação em camundongos de ágaras contendo colônias de *C. botulinum* provenientes da semeadura de meios de enriquecimento (experimento I) e inoculação em camundongos de ágaras contendo colônias provenientes da semeadura de células lavadas (experimento II).

Experimento I - Diluições decimais em água peptonada estéril de cada cultura de *Clostridium botulinum* tipo A (ATCC 25763), B proteolítico (ATCC 7949) e E (ATCC 9564) (mantidas em meio de tioglicolato fluido por 24 horas de incubação, após duas transferências nas mesmas circunstâncias e com aproximadamente 10^7 microrganismos por ml), foram semeados em triplicata, em placas de Petri contendo ágar triptose-sulfato-cicloserina (TSC) segundo método descrito em Speck (13) e também em ágar sulfito-polimixina-sulfadiazina (SPS) de acordo com o método de Hall (5).

As placas foram incubadas a 35°C durante 24 horas em 3 atmosferas anaeróbias diferentes: mistura de nitrogênio (gás nitrogênio U, com pureza de 99,995%) e CO_2 (CO_2 comercial com oxigênio residual variável de remessa para remessa, mas nunca muito baixo) nas proporções de 9:1; hidrogênio (gás hidrogênio, com pureza de 99,999%); dispositivo de anaerobiose Gaspak.

O mesmo procedimento foi usado em uma segunda experiência semelhante, porém com incubação à temperatura de 45°C.

De forma análoga foram semeadas, nos meios acima, culturas de *C. perfringens*, utilizadas como controle.

Após 24 horas de incubação a 35°C e a 45°C, as placas foram examinadas quanto ao crescimento dos microrganismos e a seguir os ágaras de cada placa de Petri com indícios de crescimento de *C. botulinum* foram pesados e homogeneizados em homogeneizador de pistões ("Stomaker"), com igual quantidade de tampão fosfato-gelatina em pH 6,6. Os homogeneizados foram centrifugados por duas vezes a 12.000 x g, durante 20 minutos, à temperatura de 4°C.

Para evidenciar se houve produção de toxina, os sobrenadantes obtidos pela centrifugação foram injetados intraperitonealmente em pares de camundongos, conforme a metodologia descrita pelo "Centers for Disease Control" - CDC (3).

No caso de haver apenas uma morte no par de inoculados (1/2), mais dois camundongos foram injetados e o resultado foi considerado positivo

quando pelo menos dois camundongos morriam dos quatro inoculados ($\geq 2/4$).

A pesquisa incluiu 3 repetições.

Experimento II - Cada uma das culturas de *C. botulinum* utilizadas no experimento I, foram ativas-das e esporuladas pelo método de Hauschild *et alii* (7). A seguir, as culturas esporuladas foram transferidas para tubos de centrifuga rosqueados, estéreis e centrifugadas a 10.000 x g, durante 10 minutos, à temperatura de 4°C. Os sedimentos foram suspensos em água destilada estéril e centrifugados. Após mais duas resuspensões e novas centrifugações, as células de cada tipo da bactéria foram estocadas a 4°C em água destilada estéril. Para confirmar a inexistência de toxina de *C. botulinum* nestas suspensões, foram injetados dois camundongos com a parte líquida da última centrifugação.

Para a contagem de *C. botulinum* viável nas suspensões em estoque, usou-se o método de Hauschild & Hilsheimer (8). Em continuação, foram semeadas em placas de ágar TSC e em ágar SPS, em triplicata, aproximadamente 10^2 células/ml das suspensões de cada tipo de *C. botulinum*, seguindo-se o procedimento descrito no experimento I, para incubação e inoculação em camundongos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. À temperatura de incubação de 35°C (Quadro 1), no meio de ágar TSC, nos tipos A, B e E de *C. botulinum* sempre houve crescimento do *C. botulinum*, quer no experimento I, quer no II. Porém, observou-se no laboratório, nas placas de Petri contendo aquele meio, que a atmosfera de incubação de $N_2 + CO_2$ (de potencial de óxido-redução mais alto que os das atmosferas de H_2 e Gaspak) era a que dificultava mais o crescimento do *C. botulinum*: as colônias eram difusas, indefinidas, sem coloração preta, sob um brilho típico de reação de lipase, enquanto que eram mais comumente negras se provindas da atmosfera de H_2 do que quando de Gaspak.

A produção de toxina do tipo A de *C. botulinum*, nas placas de ágar TSC (Quadro 1), sempre ocorreu (o par de camundongos injetados sempre morria com sintomas de botulismo). No tipo B, só não se detectou toxina em ágar TSC quando a atmosfera tinha sido $N_2 + CO_2$, no experimento II. É de admitir que no caso citado, em que não se denunciou a presença de toxina, esta existisse em pequena quantidade e viesse a aumentar com incubação mais longa que a usada, de 24 horas, já que houve crescimento de células na placa. O tipo B de *C. botulinum* nos casos deste experi-

QUADRO 1 - Crescimento e produção de toxina de *Clostridium botulinum* em dois meios próprios para *C. perfringens* inoculados com culturas provenientes de meio de tioglicolato fluido (experimento I) e com células lavadas (experimento II), incubados em diferentes atmosferas anaeróbias, à temperatura de 35°C.

Símbolos:	H_2	= incubação com hidrogênio;
	$N_2 + CO_2$	= incubação com nitrogênio e dióxido de carbono;
	GP	= incubação com Gaspak;
	TSC	= ágar triptose - sulfito - cicloserina;
	SPS	= ágar sulfito - polimixina - sulfodiazina;
+	+	= crescimento em pelo menos uma das repetições;
-	-	= Não crescimento;
(*)		= número de camundongos mortos/ número de camundongos inoculados.

Tipos de *C. botulinum*

Atmosfera de incubação	Experimento	Tipos de <i>C. botulinum</i>					
		A		B		E	
		TSC	SPS	TSC	SPS	TSC	SPS
$N_2 + CO_2$	I	+ (2/2*)	+ (2/2)	+ (2/2)	+ (2/2)	+ (0/2)	+ (0/2)
	II	+ (2/2)	-	+ (0/2)	-	+ (2/2)	+ (0/2)
H_2	I	+ (2/2)	+ (2/2)	+ (2/2)	+ (2/2)	+ (0/2)	+ (0/2)
	II	+ (2/2)	-	+ (2/4)	-	+ (2/2)	+ (0/2)
GP	I	+ (2/2)	+ (2/2)	+ (2/2)	+ (2/2)	+ (0/2)	+ (0/2)
	II	+ (2/2)	-	+ (3/4)	-	+ (2/2)	+ (0/2)

mento II e ágar TSC (Quadro 1), nas primeiras inoculações do par de camundongos, só um morria com os sintomas (pelo que se tinha de inocular novo par), fato que se pode justificar por haver pouca toxina nos ágaras. A produção de toxina do tipo E ocorreu também em ágaras de TSC, no experimento II.

Concluindo sobre o meio de ágar TSC a 35°C, pode-se dizer que houve crescimento de *C. botulinum* e produção de sua toxina na maioria das condições da pesquisa.

2. Quanto ao meio de ágar SPS, os tipos A e B cresceram nas placas de Petri no caso do experimento I, enquanto que o tipo E cresceu nos dois tipos de experimentos, I e II (Quadro 1). Observando-se as placas, distinguiam-se colônias, no tipo E, de limites definidos, brancas, às vezes mesmo negras, enquanto que eram indefinidas, como se houvesse uma turvação branca no ágar, no caso dos outros dois tipos, A e B, fatos que evidenciavam um melhor crescimento celular do tipo E em ágar SPS.

A existência de toxina, nas placas de ágar SPS, foi detectada às vezes nos tipos A e B, mas nunca se detectou no tipo E em quantidades suficientes para matar camundongos, embora houvesse crescimento de células, como se disse (Quadro 1). O meio de SPS parece então ser mais inibidor para produção de toxina que o de TSC.

QUADRO 2 - Crescimento e produção de toxina de *Clostridium botulinum* em dois meios próprios para *C. perfringens* inoculados com culturas provenientes de meio de tioglicolato fluido (experimento I) e com células lavadas (experimento II), incubados em diferentes atmosferas anaeróbias, à temperatura de 45°C.

Símbolos:	H_2	= incubação com hidrogênio;
	$N_2 + CO_2$	= incubação com nitrogênio e dióxido de carbono;
	GP	= incubação com Gaspak;
	TSC	= ágar triptose - sulfito - cicloserina;
	SPS	= ágar sulfito - polimixina - sulfodiazina;
	+	= crescimento em pelo menos uma das repetições;
	-	= Não crescimento;
	(*)	= número de camundongos mortos/ número de camundongos inoculados.

Concluindo sobre o meio de ágar SPS, incubado a 35°C, se dirá que pode haver também crescimento de *C. botulinum* nesse meio.

3. Nas incubações à temperatura de 45°C (Quadro 2), o meio ágar TSC permitiu o crescimento de *C. botulinum* tipo A em quaisquer incubações e experimentos, mas com os tipos B e E só se verificou nas atmosferas de potencial de óxido redução mais baixo (H_2 e GP) e não se manifestou com a atmosfera de $N_2 + CO_2$, imprópria a um microrganismo exigente em condições de anaerobiose, como o *C. botulinum*. O exame das placas de Petri manifestou sempre um crescimento difícil, com colônias difusas, indefinidas e manchas brilhantes da reação de lipase.

A toxina foi detectada no meio de ágar TSC só em duas situações (Quadro 2); nas outras situações, porque houve crescimento, talvez houvesse pouca toxina.

Conclui-se sobre o meio de ágar TSC à incubação a 45°C, nas condições da pesquisa, que pode haver crescimento de *C. botulinum* nesse meio, principalmente do tipo A, e pode haver produção de toxina.

4. O meio de SPS, nunca permitiu o crescimento do *C. botulinum*, quando a incubação foi de 45°C.

5. Como conclusão final, deve-se alertar aos técnicos que é possível haver crescimento e produção de toxina de *C. botulinum* em ágar TSC e

Tipos de *C. botulinum*

Atmosfera de incubação	Experimento	Tipos de <i>C. botulinum</i>					
		A		B		C	
		TSC	SPS	TSC	SPS	TSC	SPS
$N_2 + CO_2$	I	+(2/2)	-	-	-	-	-
	II	+(0/2)	-	-	-	-	-
H_2	I	+(0/2)	-	+(0/2)	-	+(0/2)	-
	II	+(2/2)	-	-	-	-	-
GP	I	+(0/2)	-	+(0/2)	-	+(0/2)	-
	II	+(0/2)	-	-	-	-	-

ágar SPS, à temperatura de incubação de 35°C. À temperatura de 45°C também é possível haver crescimento e produção de toxina em ágar TSC.

O meio de SPS, em desuso atualmente no Brasil, indubitavelmente pior que o ágar TSC para isolamento de *C. perfringens*, é mais inibidor para *C. botulinum*.

Deve-se admitir, porém, que pode haver ainda condições mais favoráveis ao crescimento de *C. botulinum*, se usadas culturas diferentes, incubações mais prolongadas, etc.

Torna-se, por isto, necessário alertar os técnicos que pesquisam *C. perfringens* e clostrídios-sulfito-redutores, que precisam admitir a possibilidade de também terem *C. botulinum* e mesmo a sua toxina nos meios em que pesquisam *C. perfringens*, pelo que necessitam tomar cuidados para não se contaminarem, principalmente desinfetando superfícies com soluções alcalinas e não pipetando com a boca.

AGRADECIMENTOS

À Dirce Yorica Kabuki e Maria Raquel Manhani pelo apoio técnico na realização deste trabalho.

SUMMARY

Growth and toxin production of *Clostridium botulinum* in media and conditions recommended for isolation of *Clostridium perfringens*.

The growth and toxin production of *Clostridium botulinum* types A (ATCC 25763), B (ATCC 7949) and E (ATCC 9564) in two culture media recommended for the isolation of *Clostridium perfringens* (tryptose-sulfite-cycloserine agar and sulfite-polymyxin-sulfadiazine agar) were examined. Temperatures of 35-45°C with three different anaerobic incubation atmospheres (mixture of 90% nitrogen and 10% carbon dioxide gases; gas hydrogen and Gaspak system) were also evaluated.

The results showed that growth of *C. botulinum* and toxin production could occur in both culture media under the incubation temperature of 35°C, mainly with hydrogen and Gaspak anaerobic atmospheres. At 45°C incubation temperature,

growth and toxin production were observed only in tryptose-sulfite-cycloserine agar, especially with type A *Clostridium botulinum*.

Key Words: *Clostridium perfringens*; *Clostridium botulinum*; Toxin.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Angelotti, R.; Hall, H.E.; Foter, V.J. & Lewis, K. Quantitation of *Clostridium perfringens* in foods. *Appl. Microbiol.*, 10: 193-199, 1962.
- Bonventre, P.F. & Kempe, L.L. Physiology of toxin production by *Clostridium botulinum* types A and B. III. Effect of pH and temperature during incubation on growth, autolysis, and toxin production. *Appl. Microbiol.*, 7: 374-377, 1959.
- Centers for Disease Control. Botulism in the United States, 1899-1977. Handbook for Epidemiologists, Clinicians and Laboratory Workers, Atlanta, Georgia, U.S.A., 41p., 1979.
- Futter, B. J. & Richardson, G. Anaerobic jars in the quantitative recovery of clostridia. In: Shapton, D.A. & Board, R.G., ed. Isolation of Anaerobes. Academic Press, London, p. 81-91, 1971.
- Hall, H.E. Collaborative study of a quantitative method for *Clostridium perfringens* in foods. *J. A.O.A.C.*, 51: 1338-1341, 1968.
- Harmon, E.R.; Kautter, D.A. & Peeler, S.T. Improved medium for enumeration of *Clostridium perfringens*. *Appl. Microbiol.*, 22: 688-692, 1971.
- Hauschild, A.H.W.; Aris, B.J. & Hilsheimer, R. *Clostridium botulinum* in marinated products. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 8(2): 84-87, 1975.
- Hauschild, A.H.W. & Hilsheimer, R. Enumeration of *Clostridium botulinum* spores in meats by a pour-plate procedure. *Can. J. Microbiol.*, 23: 829-832, 1977.
- Holdeman, L.V.; Cato, E.P. & Moore, W.E.C., eds. Anaerobe laboratory manual. Virginia Polytechnic Institute and State University. 4th ed. Backsburg, Virginia, U.S.A., 19.
- Ministério da Saúde. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. Padrões Microbiológicos. Portaria nº 1 de 28 de janeiro de 1987.
- Sahidi, S.A. & Ferguson, A.R. New quantitative, qualitative and confirmatory media for rapid analysis of food for *Clostridium perfringens*. *Appl. Microbiol.*, 21: 500-506, 1971.
- Sneath, P.H.A.; Mair, N.S.; Sharpe, M.E. & Holt, S.G., eds. Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore, Williams & Wilkins, v. 2, 1986.
- Speck, M.L., ed. Compendium of methods for microbiological examination of foods. American Public Health Association, Washington, D.C., U.S.A., 2nd ed., 914p., 1984.

Recebido para publicação em 15/01/90

VARIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DAS SALMOURAS DURANTE SUA UTILIZAÇÃO NA SALGA DE QUEIJOS TIPO MINAS "FRESCAL".

Luiz Augusto do Amaral¹
Antonio Nader Filho¹
Sebastião Timo Iaria²

RESUMO

Foram estudadas 40 amostras de salmoura empregadas na salga de queijos tipo Minas "frescal" em uma Indústria de Lacticínios do Estado de São Paulo, com o objetivo de conhecer a variação das características físico-químicas e microbiológicas, durante o período de sua utilização. Os valores médios do pH, da concentração de cloreto de sódio e de proteínas, desde o preparo até o 21º dia de utilização, variaram de 7,55 a 4,73, 15,0% a 9,1% e de zero a 3,756% respectivamente. Por outro lado, os valores médios das contagens de microrganismos mesófilos e do N. M. P. de bactérias coliformes totais e de origem fecal, variaram de $2,1 \times 10^2/\text{ml}$ a $2,9 \times 10^{11}/\text{ml}$, zero a $7,8 \times 10^{12}/100\text{ml}$, e de zero a $7,8 \times 10^{12}/100\text{ml}$ respectivamente. Além disso, os valores médios das contagens de valores e leveduras e de *Staphylococcus aureus* variaram entre $1,3 \times 10^2/\text{ml}$ e $2,4 \times 10^6$ e de zero a $2,3 \times 10^3/\text{ml}$, respectivamente. Tais achados sugerem a existência de condições higiênicas insatisfatórias durante o preparo e utilização das salmouras, de modo a representar uma importante fonte de contaminação para os queijos. Em decorrência deste fato, existe a possibilidade do comprometimento da qualidade deste produto, de modo a representar um risco potencial para a saúde da população consumidora.

Palavras-chave: queijo de Minas, salmouras, características físico-químicas e microbiológicas.

INTRODUÇÃO

A utilização do sal na fabricação de queijos constitui-se numa prática bastante comum, um vez que este produto é capaz de proporcionar melhor sabor, além de completar a dessoragem e de aumentar o tempo de conservação dos diferentes tipos de queijos (16).

Dentre as várias maneiras de se proceder a salga dos queijos, destaca-se a imersão do produto em salmoura, cujo período de tempo varia em função do tipo de queijo (3). No caso específico

do queijo Minas frescal, este período situa-se em torno de 5 horas (17).

A qualidade microbiológica das salmouras adquire fundamental importância, uma vez que esta solução pode constituir-se em fonte de contaminação para os queijos. Especial atenção deve ser dispensada às características microbiológicas da água e do sal utilizado no preparo das salmouras. A esse respeito, Santiago (15) e Silva et alii (18) verificaram a ocorrência de bactérias aeróbias ou facultativas viáveis, estafilococos, bacilos anaeróbios, bolores, leveduras e bactérias do gênero *Clostri-*

1. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP. Campus de Jaboticabal, Rodovia Carlos Tonnani Km 5 - 14870. Jaboticabal - SP, Brasil.
2. Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP - São Paulo.

dium em amostras de sal de origem marinha.

A reutilização das salmouras na indústria de queijos representa, também, motivo de preocupação. Sabe-se que este procedimento determina alterações na composição físico química das salmouras, alterações estas que propiciam maior sobrevivência e/ou proliferação de microrganismos (4).

Mansour & Alais (13) investigando a qualidade microbiológica das salmouras durante a sua reutilização, verificaram a ocorrência de um rápido aumento do número de bactérias aeróbias ou facultativas viáveis, cujas contagens passavam de 10^5 para 10^7 , bem como a elevação gradual do número de leveduras.

O Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal (14), não faz referências aos tipos e números de microrganismos que poderiam ser tolerados nas salmouras utilizadas na indústria de alimentos. O artigo 785 do referido Regulamento, determina apenas a "proibição do uso de salmouras turvas, sujas, alcalinas, com cheiro amoniacal, fermentadas ou inadequadas por qualquer razão".

Tendo em vista o exposto e considerando a ausência de informações sobre a qualidade das salmouras utilizadas nas indústrias de queijos situadas em nosso meio, idealizou-se o presente trabalho com o objetivo de conhecer as características físico-químicas e microbiológicas salmouras durante a sua utilização na salga de queijo Minas "frescal".

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 5 (cinco) partidas de salmoura utilizada no processo de salga por imersão de queijos tipo Minas "frescal", em uma indústria de lacticínios situada no Estado de São Paulo, subordinada à fiscalização do Serviço de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura.

Colheita e transporte das amostras de salmouras - Para cada uma das 5 partidas estudadas, foram colhidas amostras de salmoura logo após o seu preparo, dia zero, assim como no 3º, 6º, 9º, 12º, 15º, 18º e 21º dias de utilização, de modo a totalizar 40 amostras.

As referidas colheitas foram efetuadas diretamente dos tanques de salga, após a homogeneização das salmouras, sendo utilizados frascos esterilizados com capacidade de 500 ml. Em seguida, as amostras foram colocadas em caixa de material isotérmico contendo cubos de gelo e transportadas

para o laboratório, onde, imediatamente após a sua chegada, foram realizadas as análises físico-químicas e microbiológicas.

Análises físico-químicas - As amostras de salmouras foram submetidas às determinações do valor do pH, através da utilização de potenciômetro (pH METER HM 7A), assim como as determinações de proteínas solúveis (9) e das concentrações de cloreto de sódio, utilizando-se areômetro Baumé.

Análises microbiológicas - Para a realização das análises microbiológicas, tomou-se 1 ml da amostra da salmoura considerada e transferiu-se para um tubo de ensaio contendo 9 ml de água peptonada a 0,1% estéril. A seguir, preparou-se diluições decimais consecutivas até 10^{-15} .

Assim sendo, a contagem de *Staphylococcus aureus* foi efetuada a partir de diluições de até a 10^{-3} , a contagem de microrganismos mesófilos aeróbios ou facultativos viáveis e de bolores e leveduras a partir de diluições de até 10^{-6} e a determinação do número mais provável de bactérias coliformes totais e de origem fecal a partir de diluições de até 10^{-15} (1).

Contagem de microrganismos mesófilos aeróbios ou facultativos viáveis (1) - As contagens de microrganismos mesófilos aeróbios ou facultativos viáveis foram realizadas em ágar padrão para contagem, após a incubação a 35°C por 48 horas.

Determinação do número mais provável de bactérias coliformes totais (1) - Para execução desta prova, foi utilizado o caldo lauril sulfato com tubos de Durham e incubação a 35°C por 24 - 48 horas. Nas provas confirmatórias foi empregado o caldo lactose-bile-verde brilhante a 2% com tubos de Durham e incubação a 35°C por 24 - 48 horas.

Determinação do número mais provável de bactérias coliformes de origem fecal (1) - Nesta determinação, foi utilizado o caldo lauril sulfato com tubos de Durham e incubação por 24 - 48 horas. Nas provas confirmatórias foi empregado o caldo E. C. com tubos de Durham e incubação em banho-maria a 44,5°C por 24 ± 2 horas.

Contagem de bolores e leveduras (1) - As contagens dos bolores e leveduras foram realizadas em ágar malte adicionado de solução de antibióticos com clortetraciclina e cloranfenicol e incubação a 25°C por 5 dias.

Contagem de *Staphylococcus aureus* (1) - Estas contagens foram realizadas em ágar Baird-Parker e incubação a 35°C por 48 horas. As provas confirmatórias foram realizadas através da produção de catalase (2), fermentação e oxidação da glicose (1), produção de Dnase (8), coagulase livre (10) e termonuclease (11).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra a distribuição das médias aritméticas dos valores obtidos nas análises físico-químicas das 5 partidas de salmouras empregadas na salga de queijo tipo Minas "frescal", de acordo com os dias de utilização. Verificou-se que as médias aritméticas dos valores de pH apresentaram uma queda mais acentuada no 3º dia de utilização. Lacrampe et alii (12) obtiveram resultados semelhantes, tendo atribuído este fato ao aporte inicial de ácido láctico liberado do soro dos queijos durante o processo de salga. Por outro lado, a gradativa redução dos valores de pH verificada até o 21º dia de utilização, pode ser atribuída a capacidade tamponante da caseína incorporada à salmoura (6).

Os dados constantes da Tabela 1 evidenciaram, ainda, que as médias aritméticas dos valores das concentrações de cloreto de sódio, apresentaram uma diminuição de 39,3% ao longo dos 21 dias de utilização. Casalis et alii (4) obtiveram resultados semelhantes, tendo atribuído este fato à penetração do sal no interior dos queijos e à diluição da salmoura pelo soro liberado destes produtos durante o processo de salga.

A Tabela 1 amostra, também, que as médias aritméticas dos valores das concentrações de proteínas solúveis, apresentaram um aumento gradativo no decorrer da utilização das salmouras.

TABELA 1 - Médias aritméticas das análises físico-químicas de salmouras utilizadas na salga de queijos Minas frescal, segundo os dias de utilização.

Dias de utilização	Parâmetros físico-químicos		
	pH	NaCl%	Proteínas mg/ml
0	7,55	15,0	---
3	5,58	14,1	0,545
6	5,44	12,5	1,230
9	5,13	12,1	1,681
12	4,95	11,0	2,229
15	4,94	10,6	2,605
18	4,89	9,6	3,329
21	4,73	9,1	3,756

Resultados semelhantes foram obtidos por Casalis et alii (4), os quais foram atribuídos à presença de proteínas no soro liberado dos queijos e/ou a fragmentos de queijo desprendidos por ocasião das manipulações a que são submetidos durante o processo de salga.

A Tabela 2 evidencia a distribuição das médias geométricas das contagens de microrganismos das 5 partidas de salmouras empregadas na salga de queijo tipo Minas "frescal", de acordo com os dias de utilização. Verifica-se que as médias geométricas das contagens de microrganismos mesófilos variaram de $2,1 \times 10^2$ a $2,9 \times 10^{11}$ desde o dia zero até o 21º dia de utilização, respectivamente. Acredita-se que este aumento não deva ser atribuído à multiplicação bacteriana, uma vez que durante a utilização das salmouras, os valores de temperaturas e pH afastam-se cada vez mais daqueles considerados ideais para a referida multiplicação. Segundo Santos (16), o aumento de microrganismos mesófilos durante a utilização das salmouras decorre da transferência dos microrganismos dos queijos para salmoura. A presença destes microrganismos nos queijos pode ser justificada pela má qualidade da matéria-prima utilizada no seu preparo e/ou pelas falhas higiênicas ocorridas durante o seu processamento. Deve-se assinalar, ainda, que os microrganismos mesófilos existentes no fermento lácteo empregado na fabricação dos queijos, podem ser transferidos para as salmouras (17).

Os valores das médias geométricas do número mais provável (NMP) de bactérias coliformes totais e de origem fecal constantes da Tabela 2, variaram de zero a $7,8 \times 10^{12}$ desde o dia zero até o 21º dia de utilização, respectivamente. A contaminação por bactérias coliformes totais foi,

TABELA 2 - Médias geométricas das análises microbiológicas das salmouras utilizadas na salga de queijos tipo Minas frescal segundo os dias de utilização.

Dias de utilização	Mesófilos (UFC/ml)	Coliformes totais (NMP/100ml)	Coliformes de origem fecal (NMP/100ml)	Bolores e <i>S. aureus</i> leveduras (UFC/ml)
0	$2,1 \times 10^2$	< 3	< 3	$1,2 \times 10^2$
3	$2,5 \times 10^7$	$1,2 \times 10^6$	$8,2 \times 10^5$	$4,0 \times 10^4$
6	$6,8 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$	$1,6 \times 10^5$
9	$4,9 \times 10^9$	$1,5 \times 10^{10}$	$1,4 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^5$
12	$5,2 \times 10^9$	$1,3 \times 10^{12}$	$8,6 \times 10^{11}$	$2,4 \times 10^6$
15	$9,1 \times 10^9$	$1,2 \times 10^{12}$	$5,7 \times 10^{10}$	$2,1 \times 10^6$
18	$9,8 \times 10^9$	$1,9 \times 10^{12}$	$1,2 \times 10^{12}$	$1,5 \times 10^5$
21	$2,9 \times 10^{11}$	$7,8 \times 10^{12}$	$7,8 \times 10^{12}$	$7,4 \times 10^5$

também, constatada por Viard & Deveau (19) e Centelegue *et alii* (5), enquanto que a contaminação por bactérias coliformes de origem fecal foi observada por Dempster & Codi (7). Acredita-se que o aumento gradativo do NMP de bactérias coliformes totais e de origem fecal ao longo do período de utilização das salmouras possa ser atribuído à transferência destes microrganismos dos queijos para as salmouras (16), bem como à contaminação decorrente da constante manipulação dos queijos submersos.

A Tabela 2 evidencia, ainda, a contaminação das salmouras por bolores e leveduras, cujas contagens situaram-se entre $1,2 \times 10^2$ e $2,4 \times 10^6$. De acordo com Santiago (15), a presença destes microrganismos nas salmouras antes mesmo de sua utilização, pode estar relacionada ao sal contaminado pelos referidos microrganismos. Acredita-se, também, que os equipamentos mal higienizados e o próprio meio ambiente possam contribuir para a contaminação das salmouras.

A Tabela 2 mostra, também, que as médias geométricas das contagens de *Staphylococcus aureus* variaram entre zero e $2,3 \times 10^3$ /ml. A existência destas bactérias nas salmouras pode ser atribuída à contaminação decorrente da constante manipulação do queijos submersos e/ou pela transferência destes microrganismos dos queijos para a salmoura. Este achado é preocupante, um vez que estes queijos podem representar um risco potencial de intoxicação alimentar estafilocócica para a população consumidora destes produtos.

Em conclusão podemos afirmar que os valores médios do pH, da concentração de cloreto de sódio e da concentração de proteínas solúveis, obtidos nas análises das salmouras empregadas na salga de queijo tipo Minas "frescal", desde o dia zero até o 21º dia de utilização, variaram de 7,55 a 4,73, 15,0 a 9,1% e de zero a 3,756%, respectivamente.

Os valores médios das contagens de microrganismos mesófilos aeróbios ou facultativos viáveis e do NMP de bactérias coliformes totais e de origem fecal, obtidos nas análises das salmouras empregadas na salga de queijo tipo Minas "frescal", desde o dia zero até o 21º dia de utilização, variaram de $2,1 \times 10^2$ /ml a $2,9 \times 10^{11}$ /ml, zero a $7,8 \times 10^{12}$ /ml, respectivamente.

As médias geométricas das contagens de bolores e leveduras e de *Staphylococcus aureus* efetuadas nas amostras de salmoura empregadas na salga de queijo tipo Minas "frescal", ao longo do 21 dias de utilização, variaram de $1,2 \times 10^2$ /ml a $2,4 \times$

10^6 /ml e de zero a $2,3 \times 10^3$ /ml, respectivamente.

Tais achados sugerem a existência de condições higiênicas insatisfatórias durante o preparo e a utilização das salmouras empregadas na salga de queijos tipo Minas "frescal", de modo a representar uma importante fonte de contaminação para este produto. Em decorrência deste fato, existe a possibilidade do comprometimento da qualidade do queijo, de modo a representar um risco potencial para a saúde da população consumidora deste produto.

Acredita-se que sejam necessárias novas investigações desta natureza em nosso meio, com a finalidade de trazer subsídios que permitam o aprimoramento dos padrões físico-químicos e microbiológicos estabelecidos para as salmouras utilizadas na salga de queijos.

SUMMARY

Variation of the physical, chemical and microbiological characteristics of brines during their utilization for salting Minas cheese.

Forty brine samples used for salting Minas cheese in a Dairy Industry in the State of São Paulo were analysed aiming at to know the variation of the physical, chemical and microbiological characteristics observed during their utilization period. The pH, sodium chloride and protein concentration mean values, since the preparation up to the utilization, varied from 7,55 to 4,73, from 15,0% to 9,1% and from zero to 3,756%, respectively. The mean values of the mesophytic microrganisms counts and of the total and fecal coliforms MPN varied from $2,1 \times 10^2$ /ml to $2,9 \times 10^{11}$ /ml, zero to $7,8 \times 10^{12}$ /100ml, and from zero to $7,8 \times 10^{12}$ /100 ml respectively. Moreover, the mean values of mould and yeast and *Staphylococcus aureus* counts varied between $1,2 \times 10^2$ /ml and $2,4 \times 10^6$ /ml and from zero to $2,3 \times 10^3$ /ml, respectively.

The results suggest that the hygienic conditions during the brine preparation and utilization are not satisfactory so that they may represent an important contamination source for the cheeses. Due to this fact the product quality may be prejudiced so that it may represent a potential hazard for the health of the consuming population.

Key Words: Minas cheese, brine, physical-chemical and microbiological characteristics.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. American Public Health Association. Committee on microbiological methods for foods. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, American Public Health Association, 1976.
2. Baird-Parker, A. C. Methods for classifying staphylococci and micrococci. In: Gibbs, B. M. & Skinger, F. A., Identification methods for microbiologists. London, Academic Press, 1966. p. 59-64.
3. Behmer, M. L. A. Tecnologia do leite. 7^a ed. São Paulo, Nobel, 1977. 320 p.
4. Casalis, J.; Luquet, F. M. & Rossier, F. Sur le traitement des saumures de fromagerie par les rayons ultraviolets. *Le lait*, 483-84:134-145, 1969.
5. Centeleghé, J. L.; Millière, J. B.; Weber, F. (1971). apud Viard, M.; Deveau, J. Epuration chimique et sterilization microbiologique para traitement thermique des saumures utilisées dans l'industrie et in particulier dans l'industrie fromage. *Le lait*, (511-512):21-27, 1972.
6. Clark, D. A.; Thompson, J. E. & Rokahr, J. E. The buffering capacity of bovine milk proteins. *Dairy Sci. Abstr.*, 45:690, 1983.
7. Dempster, J. F.; Reid, S. N. & Cody, O. Sources of contamination of cooked, ready-to-eat cured and uncured meats. *J. Hyg.*, 71:815-823, 1973.
8. Di Salvo, G. W. Desoxyribonuclease and coagulase activity of micrococci. *Med. Techn Bull.*, 9:191-196, 1958.
9. Hartree, E. F. Determination of protein: a modification of a Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, 48:422-427, 1972.
10. International Commission on Microbiological Specification for Foods (ICMSF). Microorganisms in food. I-Their significance and methods of enumeration. 2^a ed. Toronto, University Press, 1978. 434 p.
11. Lachica, R. V. R.; Genigeorgis, C.; Hoeprich, P. D. Metachromatic agar diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. *Appl. Microbiol.*, 21:585-587, 1971.
12. Lacrampe, J. L.; Hardy, J.; Ramet, J. P.; Weber, F. Contribution à l'étude de l'évolution chimique et du traitement des saumures de fromagerie. *Le Lait*, (503-504):158-175, 1971.
13. Mansour, A. & Alais, C. Etude di salage et de l'affinage du fromage en saumure III - Aspect bacteriologique, *Le Lait*, (523-524):137-145, 1973.
14. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Decreto nº 30.691 de 29 de março de 1952, alterado pelo Decreto nº 1255 de 25 de junho de 1962, Brasília, Divisão de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Ministério da Agricultura, 1980. 166 p.
15. Santiago, O. 1976 apud Oliveira, L. A. T. Análise microbiológica do sal empregado na elaboração do charque. Niterói, Universidade Federal Fluminense, 1977. 37 p. (Dissertação de Mestrado).
16. Santos, E. C. Controle da flora estafilocócica em queijos Minas durante o processamento industrial. *Arq. Esc. Vet. UFMG*, 33:199-205, 1981.
17. Shegdon, A.; Retti, C.; Souza, G. P. Queijo Minas. *Rev. Inst. Lact. Cândido Tostes*, 34:37-40, 1979.
18. Silva, N. M. P.; Hernandez, D.; Pereira, L. A.; Alves, F. C. Estudo microbiológico do sal (cloreto de sódio) de origem marinha. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 74:9-22, 1976.
19. Viard, M. & Deveau, J. Epuration chimique et stérilisation microbiologique para traitement thermique des saumures utilisées dans l'industrie alimentaire et en particular dans l'industrie fromagère. *Le lait*, (511-512):21-27, 1972.

Recebido para publicação em 1/11/90.

AÇÃO ANTIFÚNGICA DO PROPIONATO DE CÁLCIO CONTRA AMOSTRAS DE *ASPERGILLUS* (GRUPO *FLAVUS*) ISOLADOS DE INGREDIENTES E RAÇÕES AVÍCOLAS EM SANTA CATARINA.

Laurimar Fiorentin
Waldomiro Barioni Júnior

RESUMO

Nove amostras de fungos do grupo *Aspergillus flavus*, isolados de componentes e rações avícolas em Santa Catarina, foram testadas quanto a sua sensibilidade ao propionato de cálcio. Os fungos foram cultivados em ágar contendo extrato de coco-da-bahia (33,3%) e o antifúngico em concentração de 6,4 até 26114,4 ug/ml. *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999, foi utilizado como organismo de referência para a comparação do diâmetro das colônias ao quinto dia de cultivo a 28°C. O propionato de cálcio foi ativado contra todas as amostras estudadas, sendo que as concentrações ótimas para obtenção de efeito maior com menor adição do produto estiveram entre 0,65 (6500 ug/ml) e 1,31% (13100 ug/ml).

INTRODUÇÃO

A inibição do crescimento fúngico em ingredientes e rações avícolas é imprescindível para a garantia de que estes não venham a se contaminar com micotoxinas. Entre os fungos produtores de toxinas, as espécies do gênero *Aspergillus*, notadamente *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* requerem atenção não só por serem muito frequentes, em especial no milho, mas por produzirem aflatoxinas. Além disso, podem alterar os níveis nutricionais dos ingredientes e rações onde crescem de forma exacerbada (15,16).

Vários métodos são utilizados no controle do crescimento fúngico nesses alimentos. O controle natural, por restrição da água livre por meio da secagem, é o método ideal. Entretanto, tal método não oferece garantia quando as rações são manejadas nas granjas em condições precárias, porque há o perigo de se reumedeçerem com o armazena-

mento prolongado. Como alternativa, surgiram métodos que utilizam a adição de substâncias químicas que garantem a inibição do crescimento fúngico se aqueles alimentos se reumedeçerem até níveis de risco.

Entre essas substâncias figura o propionato de cálcio, que é de larga utilização em rações avícolas por não ser corrosivo aos equipamentos como o ácido propiônico, bem como ser menos volátil e, portanto, mais seguro para o manuseio além de conservar os níveis aplicados (10).

No Brasil, o propionato de cálcio também é largamente utilizado em rações, especialmente avícolas, e sua aplicação segue os moldes da Europa e Estados Unidos, ou seja, adição de uma concentração estabelecida durante a formulação da ração. Este trabalho tem como objetivo a obtenção de elementos indicativos de sensibilidade de fungos do grupo *A. flavus* isolados no Brasil, ao propionato de cálcio.

MATERIAL E MÉTODOS

Para os testes de sensibilidade ao propianato de cálcio foram utilizadas 10 amostras do grupo *A. flavus*, produtoras de aflatoxinas. Com exceção da amostra referencial *A. parasiticus* NRRL-2999, os fungos (Tabela 1) foram classificados taxonomicamente com base na metodologia descrita por Christensen (6).

Todas as amostras foram conservadas em solo autoclavado (8) para evitar repiques sucessivos em meio sintéticos. As amostras foram recuperadas em ágar glicosado de Sabouraud (5), semeados em placas de petri contendo meio diferencial para *Aspergillus* (ADM) (4) e incubadas a 28°C por 48 horas.

O teste de sensibilidade ao propionato de cálcio foi realizado de acordo com a técnica preconizada por Aguiar et al.(2). Fragmentos de um milímetro quadrado foram retirados das colônias mantidas em ADM e incubadas em ágar contendo extrato de coco-da-bahia(33,3%) (10) acrescido de propionato de cálcio em doses crescentes variáveis desde 6,4 até 26114,4 ug/ml. Este procedimento foi sempre feito com 10 colônias de cada fungo estudado, para cada concentração. Um grupo de colônias foi utilizado como controle mediante sementeira em meio isento de propionato de cálcio. Após inoculação todas as placas foram incubadas a 28°C por 5 dias, efetuando-se em seguida, a medição do diâmetro das colônias em milímetros.

Na análise estatística dos resultados as concentrações de propionato de cálcio, inicialmente em logarítmico de base 10, foram transformados

TABELA 1 - Amostras de *Aspergillus* do grupo *flavus* avaliada.

Espécie	Amostra	Origem
<i>A. parasiticus</i>	NRRL-2999	Amendoim - EUA.
<i>A. flavus</i> var <i>columnaris</i>	SC-L21	Ração Avícola-Concórdia - SC.
<i>A. flavus</i> var <i>columnaris</i>	STA-RAT-1	Ração Avícola-Itapiranga - SC.
<i>A. oryzae</i> var. <i>effusces</i>	STA-FM	Farelo de milho-Itapiranga - SC.
<i>A. parasiticus</i> Speare	CNPSA-298/84	Milho-Concórdia-SC.
<i>A. parasiticus</i> Speare	STA-FS	Farelo de soja - Itapiranga - SC.
<i>A. parasiticus</i> Speare	STA-RAT	Farelo de soja - Chapecó - SC.
<i>A. parasiticus</i> Speare	STA-RAT-2	Ração Avícola-Itapiranga - SC.
<i>A. parasiticus</i> Speare	STA-RAT	Ração Avícola - Itapiranga - SC.
<i>A. toxicarius</i> Murakami	STA-RAT	Ração Avícola - Xanxerê - SC.

em logarítmico natural com o objetivo de linearizar a função matemática dos diâmetros obtidos das colônias. Após a transformação, os dados foram distribuídos em gráficos representativos do diâmetro médio das colônias e do log da concentração de propionato de cálcio, para identificar o ajuste matemático necessário ao fenômeno.

O comportamento das representações gráficas foi compatível com a função de Gompertz (3), que foi então utilizada para ajuste de cada curva através do método interativo de GAUSS-NEWTON (9). O comportamento gráfico dos resultados de cada fungo foi ajustado mediante regressão linear utilizando-se procedimento NLIN do SAS - Statistical Analysis System - (14) e o modelo:

$$Y: BO * EXP (-B1 * EXP (B2 * X)) ei$$

onde:

Y = Diâmetro médio das 10 colônias.

X = log da concentração de propionato de cálcio.

$BO, B1, B2 > 0$ = Parâmetros estimados para cada modelo não linear, respectivo a cada fungo, através do método de GAUSS-NEWTON

$ei = Y$ observado - Y ajustado.

RESULTADO E DISCUSSÃO

As 10 amostras de *Aspergillus* apresentaram diminuição no tamanho das colônias quando cul-

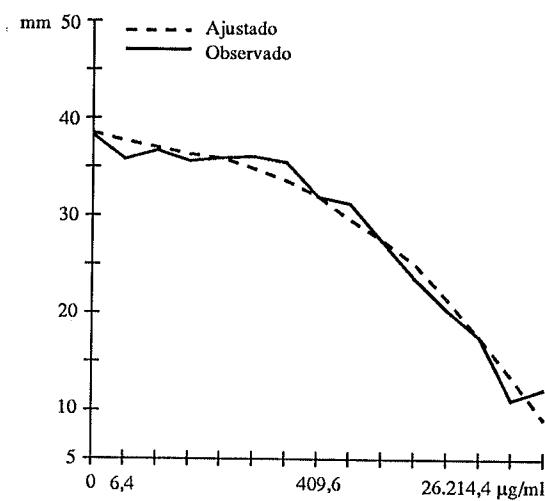


FIGURA 1 - Diâmetro médio das colônias da amostra *A. parasiticus* Speare CNPSA - 298/84 submetidas a crescimento em meio com variáveis concentrações de cálcio.

vadas em meios contendo doses crescentes de propionato de cálcio. Nas condições estabelecidas, as amostras isoladas tiveram comportamento semelhante àquele da amostra padrão *A. parasiticus* NRRL 2999, onde o diâmetro da colônia diminui com o aumento da concentração do antifúngico, desenhando uma curva sigmoidal.

Nas primeiras concentrações, a diminuição do diâmetro foi muito suave, vindo em seguida uma resposta de eficiência máxima e um terceiro segmento onde a diminuição do diâmetro retomou o comportamento inicial (Figura 1). Os diâmetros observados bem como aquele ajustado pelo modelo matemático, para cada fungo avaliado, encontram-se nas Tabelas 2 a 11. Esses resultados apresentam um comportamento semelhante à amostra padrão, quando submetidas ao crescimento nas condições estabelecidas.

O comportamento sigmoidal da curva, encontrada para cada fungo, teoricamente indica a possibilidade de um controle total do fungo, porque esta tocará o eixo horizontal com tendência ao infinito. Para exemplificar, a concentração de inibição total calculada para *A. parasiticus* NRRL-2999 foi de mais de 34 g/ml.; o que é um dado biologicamente impossível de ocorrer, uma vez que não se pode dissolver 34 gramas de propionato de cálcio em 1 mililitro. Porém, esta mesma curva demonstra que há um ponto ótimo para se estabelecer

TABELA 2 - Diâmetro médio em milímetros das 10 colônias do fungo *A. parasiticus* NRRL-2999 quando cultivado em ágar com extrato de coco-da-bahia em doses crescentes de propionato de cálcio.

Diâmetro em milímetros	
Média	
Observada	Ajustada
39,75	39,24
36,35	38,31
37,25	37,93
37,60	37,41
37,40	36,70
36,45	35,73
34,35	34,42
32,85	32,68
32,75	30,40
27,65	27,49
22,50	23,89
18,60	19,65
14,70	14,97
9,80	10,25
7,90	6,04

TABELA 3 - Diâmetro médio em milímetros das 10 colônias do fungo *A. parasiticus* Speare CNPSA 298/84 quando cultivado em ágar com extrato de coco-da-bahia em doses crescentes de propionato de cálcio.

Diâmetro em milímetros	
Média	
Observada	Ajustada
38,25	38,36
35,70	37,19
36,55	36,78
35,35	36,23
35,65	35,52
36,15	34,92
35,35	33,38
31,75	31,84
31,30	29,89
27,20	27,47
23,10	24,54
20,55	21,11
16,85	17,27
11,20	13,21
12,20	9,23

TABELA 4 - Diâmetro médio em milímetros das 10 colônias do fungo *A. parasiticus* Speare SA-FS quando cultivado em ágar com extrato de coco-da-bahia em doses crescentes de propionato de cálcio.

Diâmetro em milímetros	
Média	
Observada	Ajustada
43,05	40,33
41,60	40,27
41,80	40,23
40,45	40,16
39,30	40,05
38,65	39,86
37,55	39,56
38,05	39,07
34,40	38,26
38,20	36,97
34,75	34,93
33,50	31,80
29,05	27,24
19,50	21,09
13,65	13,82

TABELA 5 - Diâmetro médio em milímetros das 10 colônias do fungo *A. toxicarius* Marakami SI-RAI quando cultivado em ágar com extrato de coco-da-bahia em doses crescentes de propionato de cálcio.

Diâmetro em milímetros	
Média	
Observada	Ajustada
44,55	43,11
41,15	41,63
41,65	41,15
39,90	40,54
38,50	39,75
37,75	38,75
38,70	37,48
35,05	35,90
34,15	33,93
30,30	35,53
30,25	28,66
28,25	25,31
20,45	25,52
15,50	17,43
13,75	13,25

TABELA 7 - Diâmetro médio em milímetros das 10 colônias do fungo *A. flavus* STA-RAT-1 quando cultivado em ágar com extrato de coco-da-bahia em doses crescentes de propionato de cálcio.

Diâmetro em milímetros	
Média	
Observada	Ajustada
44,45	40,40
40,90	40,40
41,15	40,40
40,10	40,40
40,65	40,39
40,15	40,37
41,10	40,33
39,35	40,23
38,95	40,01
37,05	39,49
36,30	38,32
35,50	35,75
28,85	30,46
24,35	21,05
6,65	8,90

TABELA 6 - Diâmetro médio em milímetros das 10 colônias do fungo *A. flavus* SC-L21 quando cultivado em ágar com extrato de coco-da-bahia em doses crescentes de propionato de cálcio.

Diâmetro em milímetros	
Média	
Observada	Ajustada
38,40	37,86
37,20	37,84
39,15	37,82
39,25	37,78
37,75	37,71
34,95	37,60
35,85	37,39
35,70	37,01
38,60	36,36
34,60	35,21
34,90	33,24
29,80	29,98
26,75	24,95
13,70	17,91
12,35	9,91

TABELA 8 - Diâmetro médio em milímetros das 10 colônias do fungo *A. oryzae* STA-FM quando cultivado em ágar com extrato de coco-da-bahia em doses crescentes de propionato de cálcio.

Diâmetro em milímetros	
Média	
Observada	Ajustada
42,85	42,25
42,60	42,16
42,80	42,10
40,45	42,01
41,70	41,87
42,00	41,65
41,65	41,31
40,10	40,77
39,70	39,95
38,30	38,68
37,45	36,77
33,95	33,94
29,80	29,94
24,90	24,56
17,75	17,99

TABELA 9 - Diâmetro médio em milímetros das 10 colônias do fungo *A. parasiticus* Spare STA-RAI quando cultivado em ágar com extrato de coco-da-bahia em doses crescentes de propionato de cálcio.

Diâmetro em milímetros	
Média	
Observada	Ajustada
43,90	42,83
42,80	42,62
42,55	42,50
41,65	42,32
41,50	42,06
41,80	41,65
41,65	41,04
39,70	40,13
36,85	38,77
37,30	36,79
34,55	33,95
30,75	30,05
26,80	24,94
15,05	18,76
13,75	12,15

TABELA 11 - Diâmetro médio em milímetros das 10 colônias do fungo *A. parasiticus* Speare STA-RAT-2 quando cultivado em ágar com extrato de coco-da-bahia em doses crescentes de propionato de cálcio.

Diâmetro em milímetros	
Média	
Observada	Ajustada
42,10	49,17
40,15	39,87
39,10	39,73
40,55	39,23
38,05	38,80
38,40	38,17
34,45	37,26
37,28	34,45
36,00	33,65
34,22	33,80
31,77	33,10
28,49	34,40
24,29	26,70
19,24	16,33
13,68	13,59

TABELA 10 - Diâmetro médio em milímetros das 10 colônias do fungo *A. parasiticus* Speare STA-FS quando cultivado em ágar com extrato de coco-da-bahia em doses crescentes de propionato de cálcio.

Diâmetro em milímetros	
Média	
Observada	Ajustada
37,15	34,91
33,80	34,24
34,65	33,96
33,80	33,57
33,50	33,04
30,70	32,30
29,75	31,29
28,90	29,92
25,40	28,10
26,85	25,73
24,25	22,73
21,10	19,10
15,70	14,96
10,80	10,61
3,85	6,55

uma concentração que proporcione maior inibição com menor adição de propionato de cálcio. Esta concentração encontra-se no final da queda da curva, antes que ela assuma o comportamento de acompanhar o eixo horizontal com inclinação mínima, e varia entre 6553,6 ug/ml e 13107,2 ug/ml, o que corresponde a 0,6 e 1,3%, respectivamente (Tabelas 2 a 11). Doses menores que 0,5% de propionato de cálcio ou ácido propiônico tem sido relatados como ineficazes no controle de fungos contaminantes de rações, (7,10) e na alteração do número de unidades formadoras de colônias de fungos do duodeno, ceco e papo de galinhas (11).

Concentrações iguais ou maiores que 0,5% já são relatadas como eficientes. Paster (11) estudando reações contaminadas com *Aspergillus* após a adição de 0,5% de propionato de cálcio, verificou que não eram detectados aflatoxinas até pelo menos, 12 dias após a adição de fungos, indicando que não houve atividade de *Aspergillus* produtores dessa toxina. Concentrações de 0,5% são tidas como médias para uso em rações (1).

Os fungos testados neste trabalho, comportaram-se com um padrão de sensibilidade que permite esta inibição com a concentração de 0,5% (Tabelas 2 a 11), porém que necessitam algum

incremento na dose (0,6 até 1,3%) para que a inibição atinja níveis de maior segurança.

Concluindo podemos afirmar que as nove amostras testadas possuem comportamento semelhante àquele da amostra padrão *A. parasiticus* NRRL 2999, sendo que o ponto ótimo da adição de menores doses de propionato de cálcio para a obtenção de maior inibição situa-se entre 0,6 e 1,3%.

SUMMARY

Antifungal activity of calcium propionate against *Aspergillus* strains (*flavus* group) isolated from poultry feeds and ingredients in Santa Catarina State.

Nine samples of the *Aspergillus flavus* group isolated from ingredients and poultry feed in Santa Catarina state were tested for their sensitivity to calcium propionate. The fungi were cultivated in agar medium with coconut extract (33.3%) and the antifungal drug levels from 6.4 to 26144.4 ug/ml. The tested isolates were compared to *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 standard sample, for colony diameter evaluations after a five-day culture at 28°C. All samples showed sensitivity to calcium propionate, and the drug levels which gave maximal inhibition with minimal drug addition ranged from 0.65 (6500 ug/ml) to 1.31% (13100 ug/ml).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ácido propiônico en algunos inhibidores de hongos. *Avic. Prof.*, Athens, 5: 134, 1988.
2. Aguiar, L.A.B.; Lin, M. T. & Bastos, S.T.G. Método rápido para determinar os efeitos compostos químicos so-

bre a produção de aflatoxinas e o desenvolvimento de *Aspergillus spp.* *Fitopacal. Bras.*; 7: 239-45, 1982.

3. Batschlet, E. Introdução à matemática para biocientistas. São Paulo, Universidade São Paulo, 1978.
4. Bothast, R.J. & Fennell, J.I. A medium for rapid identification and enumeration of *Aspergillus flavus* and related organisms. *Mycologia*, 66: 365-9, 1974.
5. Camuñez, J.E. *Las micoses o fungosis en medicina y veterinaria*. Barcelona, Jins 1970. 395p.
6. Christensen, M. A synoptic key and evaluation of species in the *Aspergillus flavus* group. *Mycologia*, 72: 1056-84, 1981.
7. Dixon, R.C. & Hamilton, P.B. Effect of feed ingredients on the antifungal activity of propionic acid. *Poult. Sci.*; 60: 2407-11, 1981.
8. Fiorentin, L. Isolamento, identificação taxonômica e aflatoxigenicidade de amostras de fungos do grupo *Aspergillus flavus* de ingredientes e rações para aves no Estado de Santa Catarina - Brasil. Pelotas, Universidade Federal de Pelotas, 1988. 73p. (Tese, Mestrado).
9. Hartley, H.O. The modified Grauss-Newton method for the fitting of non-linear regression function by least squares. *Technometrics*, 3: 269-80, 1961.
10. Lin, M.T. & Dianese, J.C. A coconut-agar medium for rapid detection of afatoxin production by *Aspergillus spp.* *Phytopathology*, 66: 1466-9, 1976.
11. Paster, N. A commercial scale study of the efficiency of propionic acid calcium propionate as fungistats in poultry feed. *Poult. Sci.*, 58: 572-6, 1979.
12. Paster, N.; Barton, J. & Perelman, A. Studies of the fungistatic activity of antifungal compounds in mash and pelleted feeds. *Poult. Sci.*, 64: 1673-7, 1985.
13. Romoser, G.L.; Difate, V.G.; Shaver, K.J.; Chen, T.C.; Dilworth, B.C.; Day, E.J.; Arafa, A.F.; Miles, R.D. & Harms, H. Fungistatic compounds in broiler production. 3. Effect on intestinal microflora. *Poult. Sci.*, 58: 1456-61, 1979.
14. SAS USER'S GUIDE: 5. ed. Cary, USA, SAS Institute Inc, 1985.
15. Smith, J.E. Mycotoxins and poultry management. *World's Poult. Sci. J.*, 38: 201-11, 1982.
16. Veltman Junior, J.R. Reducing the effects of mycotoxins through nutrition. *Poult. Dig.*, 43: 190-4, 1984.

Recebido para publicação em 01/06/90

ANTAGONISMO DE ESPÉCIES DE *TRICHODERMA* CONTRA *SCLEROTINIA MINOR* AND *S. SCLEROTIORUM* IN VITRO

Itamar Soares de Melo*

RESUMO

Trinta e três isolados de *Trichoderma* spp. foram avaliados em cultura a fim de selecionar os mais eficientes contra *Sclerotinia minor* e *S. Sclerotiorum*, agentes casuais da podridão em alface (*Lactuca sativa L.*). Os testes iniciais foram feitos em culturas pareadas para observação do antagonismo e taxa de crescimento de *Trichoderma* sobre os patógenos. Numa escala de notas de 1 a 5, com relação ao antagonismo, selecionaram-se os seis melhores isolados com nota = 1. Noventa porcento dos isolados de *Trichoderma* obtiveram nota 1 quando se confrontou os mesmos com *S. minor* e setenta porcento para *S. Sclerotiorum*. Com relação à atividade dos metabólitos tóxicos em meio líquido ficou comprovado que, mesmo aqueles selecionados como antagônicos, alguns não inibiram a germinação dos escleródios. Por outro lado, *T. viride* (2b) inibiu totalmente a germinação dos escleródios de ambos os patógenos, mesmo diluindo o filtrado em 10 e 100 vezes.

Palavras-chave: antagonismo fúngico. *Trichoderma*, *Sclerotinia*.

INTRODUÇÃO

A podridão esclerotinia da alface causada pelos fungos *Sclerotinia minor* e *S. sclerotiorum* é uma das mais destrutivas doenças em todo o mundo. No Brasil, *S. minor* tem sido relatado como o mais sério patógeno, infectando raízes de plantas de alface diretamente através dos escleródios que germinam eruptivamente (1) e, um único escleródio pode infectar e matar uma planta (9). Tanto *S. minor* como *S. sclerotiorum* pode infectar plantas de alface através da germinação hifal dos escleródios. Em outras culturas *S. sclerotiorum* infecta tecidos senescentes pelos ascósporos.

O número de escleródios de *S. minor* está altamente correlacionado com a incidência da doença (1), porém, a incidência da podridão de alface causada pelo *S. sclerotiorum* não.

Na região de Mogi das Cruzes, SP, a incidência desta doença tem levado os alfacultores à

rotação com outras olerícolas e, a aplicação de químico é a única maneira, em alguns casos, de controlar a doença. Visando desta maneira, o controle biológico destes patógenos, procedeu-se o isolamento do fungo antagônico *Trichoderma* spp. em meio seletivo de rizosfera de plantas de alface, coletadas em áreas infectadas pelos patógenos. Outros isolados deste antagônico, provenientes de solo, também foram incluídos no ensaio.

Muitos pesquisadores têm alertado para o envolvimento do fungo *Trichoderma* spp. no declínio de fungos formadores de escleródios, como *S. Sclerotiorum*, *S. minor*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia tuliparum* (4, 7, 8, 11). Parasitismo de *T. harzianum* sobre escleródios de *S. rolfsii* foi usado com bastante sucesso no controle biológico em condições de campo (3). *T. harzianum*, isolado do solo, excretou B-(1, 3)-glucanase e quitinase quando desenvolvido sobre micélio e parede celular de *S. rolfsii* e *R. solani*.

* CNPDA/EMBRAPA, Cx. Postal 69 - 13820 Jaguariúna, SP, Brasil

MATERIAIS E MÉTODOS

Antagonismo de *Trichoderma* spp. contra *S. minor* e *S. sclerotiorum* in vitro - Trinta e três isolados selvagens de *Trichoderma* spp. de solo, rizosfera e escleródios de *S. minor* foram avaliados em culturas pareadas em meio de batata-dextrose-ágar (BDA). Discos de cultura com abundante crescimento dos fungos *S. minor* e *S. sclerotiorum* foram transferidos para a periferia de placas de Petri contendo BDA e incubados a 26°C por dois dias; quando foram transferidos, desta feita, discos de cultura com crescimento de *Trichoderma* spp., colocados no lado oposto da placa, à cerca de 1 cm das bordas. As culturas foram incubadas a 26°C e, após 8 dias, avaliadas por uma escala de notas que variou de 1 a 5 (3), onde 1 = *Trichoderma* vence completamente o patógeno e cobre a superfície de toda placa e 5 = o patógeno vence *Trichoderma* e ocupa toda a placa. Para aqueles tratamentos que receberam notas 1 e 2, os escleródios foram desinfetados superficialmente e plaqueados em ágar-água para observação da germinação dos mesmos.

Efeito de metabólito de *Trichoderma* spp. sobre a viabilidade de escleródios de *S. minor* e *S. sclerotiorum* - Escleródios de *S. minor* e *S. sclerotiorum* foram produzidos em meio de aveia-água

Produção de metabólitos tóxicos - Seis isolados selecionados de *Trichoderma* foram desenvolvidos em meio líquido (BD) sob agitação. Uma suspensão de esporos (1×10^6 conídios/ml de cada micoparasita) foi preparada em água esterilizada e alíquotas de 2 ml foram distribuídas em erlemeyers de 500 ml, contendo 100 ml de BD. Após 8 dias de incubação, a cultura foi filtrada, primeiro em filtro buckner com três camadas de papel de filtro e depois em filtro milipore, e o metabólito tóxico obtido foi distribuído em vidros de penicilina, onde procederam-se as diluições com água esterilizada para 1:1, 1:10 e 1:100. O tratamento testemunha constou de BD obedecendo as respectivas diluições.

Os escleródios dos fitopatógenos foram embedidos no metabólito inibitório por 12 horas e em seguida lavados em água esterilizada, secos em papel de filtro e colocados em BDA ou ágar-água para observação de germinação dos mesmos, à temperatura de 26°C. Após 3-5 dias o número de escleródios germinados foram contados sob um microscópio esteroscópico. O número de escleródios por placa variou de 12 a 20 para *S. minor* e de 8 a 12 para *S. sclerotiorum* e 4 placas cada tratamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Noventa por cento dos isolados de *Trichoderma* spp. avaliados mostraram-se antagônicos ao *S. minor* e cerca de setenta por cento ao *S. sclerotiorum*. Destes, o isolado "2b" de *T. viride* mostrou-se completamente eficiente como micoparasita dos escleródios formados que, quando desinfetados e lavados com água esterilizada, foram totalmente inviáveis quanto à germinação em ágar-água. Esta linhagem foi isolada da rizosfera de alface em áreas de Mogi das Cruzes não infestadas pelos patógenos. Em testes posteriores, esta linhagem foi antagônica aos fungos *Rhizoctonia solani* e *Verticillium dahliae*.

A Figura 1 sumariza os resultados obtidos. Houve diferença na capacidade de antagonismo e taxa de crescimento dos diferentes isolados de *Trichoderma* spp. *S. minor* foi mais sensível ao antagonismo do que *S. sclerotiorum* e, portanto, foram selecionados seis isolados para comprovação de seu antagonismo em testes com metabólitos tóxicos, assim discriminados e classificados ao nível de espécie: *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. viride* (16 e 2b), *T. koningii* (32), e *T. pseudokoniginii* (21 - P).

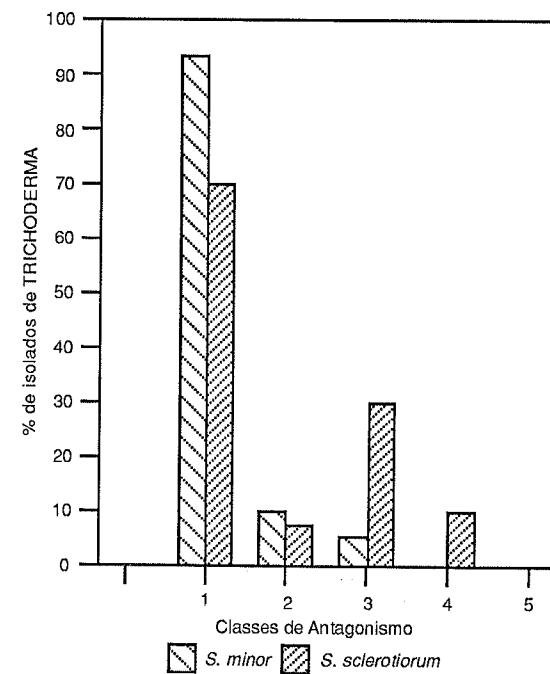


FIGURA 1 - Reações de antagonismo de *Trichoderma* spp. contra *S. minor* e *S. sclerotiorum* "in vitro".

BELL *et al.* (1982) utilizando-se do mesmo procedimento de avaliação, testaram o antagonismo de espécies de *Trichoderma* contra seis fitopatógenos. A avaliação feita por escalas de notas, apesar de não ser eficiente para selecionar antagonistas, é mais prática quando se trabalha com muitos isolados e/ou linhagens mutantes. Foram selecionados como sendo mais eficientes os isolados de *Trichoderma* que receberam notas 1 e 2, ou seja, aqueles com maior velocidade de crescimento e com halo de inibição típico, observado no reverso da placa. A comprovação antagônica destes isolados foi confirmada com a produção de metabólitos inibitórios em meio líquido.

Testes *in vitro* com metabólitos inibitórios - Escleródios de *S. minor* e *S. sclerotiorum* não germinaram quando submetidos ao filtrado de cultura de *T. viride* (2b) crescido em BD por 8 dias. De modo geral, *S. minor* foi mais sensível aos metabólitos tóxicos produzidos por *Trichoderma* spp. do que *S. sclerotiorum* (Tabelas 1 e 2). Constatou-se que a diluição de 1:1 foi mais eficiente em inibir a germinação dos escleródios de ambos os patógenos. O metabólito bruto, sem diluição, não foi testado o que, com certeza, seria mais potente. A extração e caracterização do antibiótico devem ser analisadas. Estas etapas serão posteriormente desenvolvidas juntamente com obtenção de novos biótipos antagônicos mais eficientes e resistentes a fungicidas.

No presente trabalho, faz-se necessário observar o tempo requerido para matar ou retardar a germinação dos escleródios, pois estes constituem a principal fonte de inóculo no solo. Também, a atividade máxima do metabólito deve ser testada em diferentes tempos de crescimento para cada linhagem. No entanto, pelos resultados apresentados, observamos que houve isolados suficientes e o tempo de crescimento em meio líquido de 8 dias foi de certo modo, adequado para que alguns isolados mostrassem atividade inibitória.

Os escleródios foram considerados mortos depois de 10 dias, quando lavados em água destilada esterilizada e incubados a 26°C.

É evidente que *Trichoderma* spp. produz metabólitos que matam escleródios de muitos fungos. Estas substâncias antibióticas podem ser voláteis (5, 6, 10). A capacidade para produzir tais substâncias varia entre isolados da mesma espécie, bem como entre isolados de diferentes espécies.

T. koningii produz antibiótico que inibe o crescimento *in vitro* de *Gaeumannomyces graminis* var. *triucci* e vários outros patógenos do solo. A inibição é causada pelo composto 6-n-

TABELA 1 - Efeito de filtrado de cultura de *Trichoderma* spp. na germinação de *Scherotinia minor* (% de germinação).

Tratamentos	Diluições do filtrado			Média
	1:1	1:10	1:100*	
Controle-BD	100,00	100,00	100,00	100,00
<i>T. viride</i> -16	100,00	100,00	100,00	100,00
<i>T. viride</i> -2b	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>T. koningii</i> -32	0,00	16,00	62,00	26,00
<i>T. pseudokoningii</i> -21P	0,00	20,00	45,00	21,66
<i>T. hamatum</i>	4,50	5,50	5,00	3,16
<i>T. harzianum</i>	2,00	3,00	11,00	5,33

* Diluição do filtrado em água destilada esterilizada.

TABELA 2 - Efeito de filtrado de cultura de *Trichoderma* spp. na germinação de escleróticos de *Sclerotinia sclerotiorum*. % de germinação.

Tratamentos	Diluições do filtrado			Média
	1:1	1:10	1:100*	
Controle-BD	100,00	100,00	100,00	100,00
<i>T. viride</i> -16	100,00	100,00	100,00	100,00
<i>T. viride</i> -2b	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>T. koningii</i> -32	22,00	37,50	100,00	33,16
<i>T. pseudokoningii</i> -21P	0,00	50,00	100,00	50,00
<i>T. hamatum</i>	0,00	0,00	8,00	2,66
<i>T. harzianum</i>	100,00	100,00	100,00	100,00

* Diluição do filtrado em água destilada esterilizada.

pentil-2H-pivano (11). Também, segundo SIMON (1988), *T. harzianum* produz o mesmo composto e tem controlado o tombamento de plântulas de alface causado por *Rhizoctonia solani* (11).

SUMMARY

Antagonism of *Trichoderma* species against *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum* *in vitro*

Thirty three *Trichoderma* isolates were tested *in vitro* in order to select the more efficient ones against *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum*, causal agents of drop in lettuce (*Lactuca sativa L.*). The mycoparasitic competence of *Trichoderma* spp. was assessed by pairing with both pathogens in solid culture medium.

It were selected six *Trichoderma* isolates with

relation to antagonism. It was noted that 90% of the *Trichoderma* isolates were rated as 01 for *S. minor* and 70% for *S. sclerotiorum*, where 1 = *Trichoderma* overgrows on the pathogens and sporulates plentifully.

The culture filtrate of *T. viride* (2b) was toxic to both *S. minor* and *S. sclerotiorum*. Sclerotia did not germinate after a rinse in sterile distilled water and incubation on PDA or water-agar for 10 days. Other isolates did not inhibit the sclerotia germination.

Key Words: Fungal antagonism, *Trichoderma*, *Sclerotinia*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adams, P.B. & Tate, C.J. Factors affecting lettuce drop caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Dis. Rep.*, 59: 140-143, 1975.
2. Adams, P.B. & Tate, C.J. Mycelial germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* on soil. *Plant Dis. Res.*, 60: 515-518, 1976.
3. Bell,D.K.; Markhabell,D.K. & Well, C.R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 72: 379-382, 1982.
4. Davet, P. Activite antagoniste et sensibilite aux pesticides de quelques champignons associez aux sclerotes du *Sclerotinia minor* Jagger. *Annals of Phytopathology*, 11: 53-60, 1979.
5. Dennis, C. & Webster, J. Antagonistic properties of species of groups of *Trichoderma*. I — Production of nonvolatile antibiotics. *Trans.Br. Myc. Soc.*, 57: 25-39, 1971a.
6. Dennis, C. & Webster, J. Antagonistic properties of species of groups of *Trichoderma*. II — Production of volatile antibiotics. *Trans. Br. Myc. Soc.*, 57: 41-48, 1971b.
7. Gladders, P. & Smith, J.C. Interactions between *Rhizoctonia tuliparum* sclerotia and soil microorganisms. *Trans. Br. Myc. Soc.*, 74: 579-586, 1980.
8. Huang, H.R. Control of *Sclerotinia* wilt of sunflower by hyperparasites. *Can. J. Plant. Pathol.*, 7: 26-32, 1980.
9. Imolehin, E.D. & Grogan, R.G. Factors affecting survival of sclerotia and effects of inoculum density, relative position, and distance of sclerotia from the host on infection of lettuce by *Sclerotinia minor*. *Phytopathology*, 70: 1162-1162-1167, 1980.
10. Rai, B.; Singh, V.N. & Singh, D.B. *Trichoderma viride* as a mycoparasite of *Aspergillus* spp. *Plant. and Soil*, 57: 131-5, 1980.
11. Simon, A.; Dunlop, K.W.; Ghisalberti, E.L. & Sivasithamparam, K. -*Trichoderma koningii* produces a pyrone compound with antibiotic properties. *Soil Biol. Biochem.* 20: 263-264, 1988.

Recebido para publicação em 21/11/89.

TREHALOSE DIMYCOLATE AS THE MAJOR TOXIC LIPID FROM *RHODOCOCCUS BRONCHIALIS* GROWN ON GLYCEROL

Thuioshi Ioneda*
Rogério Ubirajara Gameiro

SUMMARY

Diethyl ether soluble lipids (DESL) from chloroform/methanol extract of *Rhodococcus bronchialis* accounted to 15.7 percent of the total weight. Intraperitoneal inoculation into Swiss female mice of 250 µg DESL or 10 mg killed cells of *R. bronchialis* in paraffin oil caused drastic toxic effects with animals losing weight and dying. In contrast, animals inoculated with paraffin oil did not show any of these effects. On the other hand, the body weight of animals did not undergo any significant reduction at 48 hr after intraperitoneal inoculation into mice of 2 mg of the chloroform/methanol extracted cells. The body weight remained unchanged following the inoculation of four subsequent doses of 2 mg of chloroform/methanol extracted cells at every 48 hr. After the 14th day of experiment there was an increase of mean body weight. In order to isolate the toxic factor, the lipid extract was fractionated by column chromatography on silicic acid/silica gel into three fractions: 1) neutral lipids and fatty acid (NFA); 2) glycolipids (GL) and phospholipids (PL). From these three fractions, only GL carried toxic properties. A further purification of GL gave a major glycolipid GL1 accounting to 95 percent of that fraction. The purified glycolipid that represented about 1.4 percent of the total weight, migrated on thin layer chromatography like 6,6'-di-C₄₀-mycoloyl trehalose. The infrared spectrum exhibited a series of characteristic absorptions at 994, 1022, 1052, 1095, 1109, 1148 and 1117 cm⁻¹. Moreover, the aqueous phase released from GL1 after alkaline hydrolysis contained only a component identified as trehalose. In addition, the methyl ester derivative of the fatty acid moiety of GL1 corresponded to approximately C₆₀-mycolic acids as revealed by mass spectrometry. By using female Swiss mice weighing 22.8 ± 1.7 g, the fifty percent of the lethal dose (LD₅₀) of GL1 was 33 µg. It is believed that the major trehalose lipid is trehalose di-C₆₀-mycolate. In turn, this glycolipid responds for the major toxic properties of DESL and cells of *R. bronchialis*.

Key Words: *Rhodococcus bronchialis*, toxic lipid, trehalose dimycolate, glycolipid.

1. Instituto de Química C. Postal 20780 - 05508 - São Paulo - SP

* Corresponding author

INTRODUCTION

Amongst lipid constituents of *Mycobacterium tuberculosis*, a remarkable fraction is represented by the so called "cord factor" (4), identified as 6,6'-dimycoloyl trehalose (16). This glycolipid has important toxic properties. A toxicity response to dose is seen following intraperitoneal injection into mice of this lipid dissolved in paraffin oil with animals losing weight and dying. Similar types of compounds, considered lower homologs, have been found in *Brevibacterium* (15), *Corynebacterium* (12), *Nocardia* (19), and *Rhodococcus* (11). These lipids are also known as "cord factor" or trehalose dimycolates (TDM) or dimycoloyl trehalose (DMT). The fatty acid moieties of DMT from the first two genera possess high molecular weight branched- β -hydroxylated fatty acids centered in approximately C₃₂, known as corynomycolic acids (17). In case of *Nocardia*, the trehalose molecule is esterified with approximately C₅₀-mycolic acids (nocardic or nocardomycolic acids) (5). In genus *Rhodococcus* two groups of representatives are considered: those containing approximately C₄₀-mycolic acids (short chain nocardomycolic acids) (11), as *R. rhodochrous* and *R. lentifragmentus* (2), and those containing approximately C₆₀-mycolic acids (long chain nocardomycolic acids), as *R. bronchialis* (2) and *R. sputi* (26). Microorganisms belonging to genus *Rhodococcus* have been described in many clinical cases. For example, in pulmonary diseases (23,24), in immunodepressed patients (3,9), in patient after surgery (6), in case of necrotizing tenosynovitis (25). These reports suggest obviously that organisms of genus *Rhodococcus* deserve more investigations. The rationale for the present studies on *R. bronchialis* was based in the following points: a) this organism was isolated from a patient with pulmonary disease (23); b) isolation and identification of trehalose dimycolate from that organism in the autor's laboratory was previously described (19); c) trehalose dimycolate from *M. tuberculosis* is endowed with toxic properties (4). It was therefore thought that in case of *R. bronchialis* investigations on composition and toxicity of lipids should be instructive.

In this communication we report that: 1) intraperitoneal inoculation into mice of a suspension of killed cells of *R. bronchialis* in paraffin oil causes toxic effects with animals losing weight and dying; 2) solvent extracts the factor that causes toxic effects; 3) the toxic effects are related to approximately C₆₀-mycolic acid containing trehalose di-

nycolate; 4) that compound constitutes the major component of the glycolipid fraction and has LD₅₀ of 33 µg using female Swiss mice.

MATERIAL AND METHODS

All reagents were of analytical grade and solvents were distilled before use. The standard lipids used were: palmitic acid and triolein (Sigma Chemical Co., MO, USA); methyl palmitate (Polyscience Corporation, Dempster, Evanston, IL., USA); C₄₀-nocardomycolic acid and 6,6'-di-C₄₀-mycoloyl trehalose (DMT) were from *R. rhodochrous* (11) and methyl C₄₀-mycolate was prepared as described (11). Monocorynomycoloyl glycerol was from *C. pseudotuberculosis* (14). Corynomycolic acid was isolated from *C. diphtheriae* (12).

Column chromatography was carried out by using a mixture of silica gel H (E. Merck, Darmstadt, F.R.G.) and silicic acid (Carlo Erba, Milano, Italy). Aluminium oxide (E. Merck) was also used. Thin layer chromatography (TLC) was carried out on glass plates coated in the laboratory with silica gel H. The following developing solvents were used: A) n-hexane/diethyl ether/acetone/acetic acid (70/30/11/1, by vol.); B) chloroform/acetone/methanol/water (50/60/2.5/3, by vol.). Paper chromatography was carried out on Whatman No. 1 paper using the solvent C:toluene/pyridine/butanol/water (5/3/3/4, by vol., upper phase). Lipids on TLC plates were revealed under an atmosphere of iodine vapours. Glycolipids were detected by using anthrone/sulfuric acid spray reagent (21) and phospholipids were visualized with molybdenum-blue spray reagent (27). Substances on paper chromatogram were revealed with silver nitrate/sodium hydroxide dip reagent (22).

Alkaline hydrolysis was carried out as previously described (21). Fatty acids were methylated with an ethereal solution of diazomethane (28).

Infrared (IR) spectrum was recorded on a Perkin Elmer FT 1750 IR spectrophotometer with the lipid on a KBr disk as solvent free film. Refractive indices were determined on an Abbe refractometer. Mass spectrometry was carried out on a Hewlett Packard model 5988 mass spectrograph (Santa Clara, CA, USA). The sample was deposited directly on the insertion probe and mass spectrum was recorded using electron impact mode at 70eV. *R. bronchialis* was a generous gift of Dr. M. Tsukamura (Chubu Chest Hospital, Obu, Japan); it was kept in solid Ogawa medium (9), and was transferred into 125 ml Erlenmeyer flasks contain-

ing 20 mL of a liquid medium with the following composition: 1% peptone (Oxoid Ltd, Hants, England), 0.5% yeast extract (Oxoid), 0.5% sodium acetate, 1% glycerol and 0.1% sodium chloride. After 4 days at 37°C under static conditions, the cells suspension was vigorously shaken and 2 mL of that suspension were transferred into 1 L Erlenmeyer flask containing 200 mL of the same liquid medium. Incubation was carried out statically at 37°C for 7 days. Formaldehyde was added into the cells culture to a final 1% and the mixture was shaken vigorously. After two days, 2 mL of this suspension was taken and inoculated into Erlenmeyer flask containing 200 mL of the medium; this flask was incubated for sterilization control.

Cells of five flasks were collected by centrifugation at 2000 g on a Beckman J2-21 refrigerated centrifuge (Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, USA). Supernatant was discarded and the cell paste was washed three times with distilled water. Cells were dried by keeping the cell paste under reduced pressure in a dissecator until constant weight. This preparation was kept in a freezer until use.

Diethyl ether soluble lipids (DESL) were prepared as follows: the cell paste was extracted with a mixture of chloroform/methanol (1/1, by vol.) in a proportion of one volume of wet cells/four volumes of solvents. Extraction was carried out for 30 min while stirring with magnetic stirrer.

The solvent phase was then separated by centrifugation at 2000 g and the supernatant was collected; the residue was re-extracted four times by using the same procedure. Supernatants were pooled and filtered through a sintered glass filter and concentrated under reduced pressure on a rotary evaporator. The concentrate was re-extracted three times with diethyl ether; the pooled extracts was dried on an anhydrous sodium sulfate, filtered and finally concentrated. Chloroform/methanol (1:1, by vol) extracted cells were refluxed with chloroform/methanol (3:1, by vol) for 30 min; after cooling the mixture was filtered through a sintered glass filter; the material retained on the filter was re-extracted two times using the same procedure. Finally the cell residue on the filter was treated three times with acetone. The residue was scrapped off into a pre-weighted flask and kept under vacuum in a dissecator until constant weight. This solvent extracted cells were maintained in a freezer until use.

DESL were fractionated by column chromatography as follows: 250 mg dissolved in 2 mL chloroform were loaded onto a column (16 x 2 cm) of silicic acid equilibrated in chloroform. Elu-

tion was performed with 210 mL (5 x 42 mL) each of the following solvents: chloroform, 3% (V/V) ethanol in chloroform, acetone and methanol. Solvents were evaporated and the remaining materials were analysed by TLC using solvents A and B. The eluates corresponding to chloroform contained neutral lipids and fatty acids (NFA).

Fractions eluted with 3% (V/V) ethanol in chloroform and acetone contained a major glycolipid component which behaved like DMT. These fractions were pooled as glycolipid fraction (GL). The methanol eluates contained phospholipids and the pooled material was indicated as phospholipid fraction (PL).

Monomycoloyl glycerol (MMGly), from *R. bronchialis* was prepared as follows: each of 20 x 20 cm chromatoplate coated with silica gel H and activated for 20 min at 110°C was loaded with approximately 40 mg DESL. The plate was developed in solvent A without a previous chamber saturation. The band of MMGly was located by exposing the chromatoplate to iodine vapours and by comparing the migration rate to that of standard used. Iodine was sublimated in a hood, then the band was scraped off; lipid was eluted with chloroform/methanol (3:1, by vol) and concentrated. This material was dissolved in benzene and loaded onto a column (1.5 cm x 0.5 cm) of aluminum oxide. Elution was performed with benzene, chloroform and 10% (V/V) acetone in chloroform. Analytical TLC of eluates using solvent A showed that MMGly was eluted with 10% (V/V) acetone in chloroform. GL fraction (135 mg) was repurified by column chromatography on silica gel H (6 cm x 1.7 cm) equilibrated with chloroform. Elution was performed with 70 mL (5 x 14 mL) each of the following solvents: chloroform, 20, 30, 40, 50, 60, 70% (V/V) acetone in chloroform and acetone. These fractions were analyzed by TLC in solvent B. Materials eluted with 40-50% (V/V) acetone in chloroform contained only one component corresponding to DMT; these eluates were pooled. The concentrate had 130 mg of glycolipid GL1. Identification of this lipid was carried out by determining its physicochemical characteristics, and by characterizing the products released after alkaline hydrolysis.

Cells and solvent extracted cells were suspended in paraffin oil (20 mg/mL) by adding 6 mL of the solvent into a screw capped tube containing 120 mg of the corresponding material. These suspensions were autoclaved for 15 minutes. Solutions (500 µg/mL) of DESL, NFA, GL, PL and GL1 were prepared by adding 6 mL of paraffin oil of the corresponding lipid solution in chloroform.

The control tube contained 6 mL of paraffin oil and 0.5 mL of chloroform. Chloroform was evaporated under a stream of nitrogen at 60°C, then screw capped and kept at this temperature for 30 min. For LD₅₀ evaluation, GL1 solutions in paraffin oil containing 12.5 µg/mL, 25 µg/mL, and 50 µg/mL were used. Calculation of LD₅₀ was done by the method of Reed and Munch as described in reference (8).

Female Swiss mice weighing 22.8 ± 1.7 g were used. Ten animals of each group were maintained in plastic cage; pelleted commercial food was used. Each animal was inoculated intraperitoneally with 0.1 mL paraffin oil (control group) or 0.1 mL of the corresponding material in paraffin oil every 48 hr in a total of five injections. Body weight and survival were recorded every 48 hr for 30 days.

RESULTS

Inoculation into female Swiss mice of a suspension of 2 mg in paraffin oil of killed cells of *Rhodococcus bronchialis* caused a decrease (17.8%) of the mean body weight (23.7 ± 1.3 g at the initial time to 19.5 ± 1.6 g at the 48th hr, P <

0.05). In addition, signal of diarrhea and bristling fur were observed. This group showed a low activity. Four subsequent inoculations of the same amount of whole cells every 48 hr did not increase the loss of the mean body weight (19.5 ± 1.6 g at the 48th hr to 19.4 ± 2.0 g at the 192 hr, p>0.05). Manifestations of wasting symptoms persisted, and animals with intense cachexia died. A mortality of 10 and 30% was found at the fourth and eighth day of experiment, respectively (Fig. 1). Moreover, there was no surviving animal at the 26th day.

In contrast, the control group had the mean body weight increased by 57.2% during the time course of experiment (21.5 ± 1.6 g at the initial time to 33.8 ± 2.4 g at the 30th day; P < 0.05). In addition, this group had 100% surviving animals. On the other hand, inoculation into mice of five doses of 2 mg each of the solvent extracted cells of *R. bronchialis* (2mg/0.1 ml paraffin oil) caused no change of the mean body weight (22.6 ± 1.8 g at the initial time to 24.8 ± 4.0 g at the 14th day, P > 0.05). At the 14th day on this group experienced an increase in the mean body weight (26.7 ± 3.4 g at the 14th day to 31.6 ± 2 g at the 30th day, P < 0.05). In addition, only 20% of mortality were recorded. These findings indicated that solvents ex-

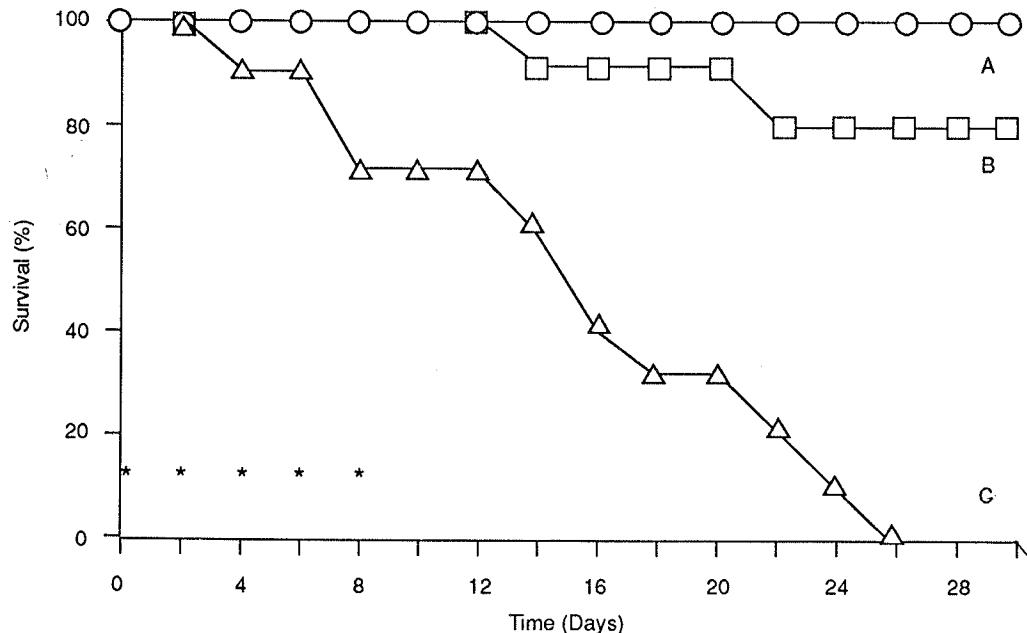


FIGURE 1 — Survival of female Swiss mice inoculated with killed whole cells and of the solvent extracted cells of *Rhodococcus bronchialis*. As indicated by asterisks, ten mice in each group were inoculated intraperitoneally every 48 hr either with 0.1 mL paraffin oil (control group, A) or 0.1 mL solvent extracted cells (B, 20 mg/mL) or 0.1 mL killed whole cells (C, 20 mg/mL).

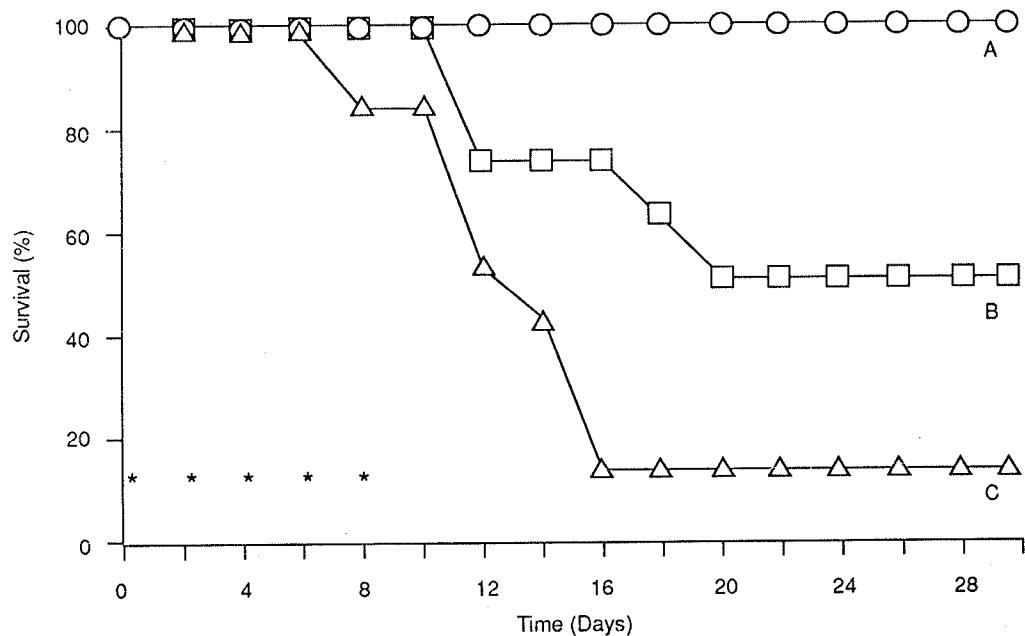


FIGURE 2 — Survival of female Swiss mice inoculated with diethyl ether soluble lipids (DESL) from *Rhodococcus bronchialis* and their fractions separated by column chromatography on silicic acid/silica gel H. The fractions were: neutral lipids and fatty acids (NFA); glycolipids (GL) and phospholipids (PL). As indicated by asterisks, ten mice in each group were inoculated intraperitoneally every 48 hr either with 0.1 mL paraffin oil (control group, A) or 0.1 mL lipid solution in paraffin oil (500 µg/mL) of lipid fractions: NFA, A; PL, A; DESL, B and GL, C, respectively.

tracted the majority of the toxic factor. In an attempt to isolate that factor, DESL was fractionated by column chromatography, and the lipid fractions as well as DESL were inoculated into mice. DESL accounting to $15.7 \pm 1.0\%$ ($n = 3$) of the total weight gave three main fractions: 1) neutral lipids and fatty acids (NFA); 2) glycolipid fraction (GL); and 3) phospholipids (PL). These fractions represented $62.5 \pm 0.7\%$; $8.8 \pm 1.4\%$ and $28.7 \pm 0.6\%$, respectively ($n = 3$).

As shown in Fig. 2, 50% mortality were recorded in DESL treated group while 100% survival was found in NFA and PL treated animals. Intense toxic effects were noted in GL treated group. This observation suggested obviously that the toxic factor was concentrated in GL fraction. Analytical TLC of the fractions revealed that: 1) NFA contained triacylglycerol, non-hydroxylated fatty acids, mycolic acids and monomycoloylglycerol; 2) GL contained a major glycolipid exhibiting on TLC a behaviour (R_F 0.64, solvent B) similar to that of 6,6'-di-C₄₀-mycoloyl trehalose (R_F 0.53), and 3) PL contained only phospholipids (R_F 0.0). Fractions NFA and PL were not further studied.

From NFA, mono-C₆₀-mycoloyl glycerol (MMGly) (20) was purified for inoculation experiment. Repurification of GL by column chromatography gave 95% of the glycolipid GL1. This material showed a characteristic infrared spectrum (Fig. 3, A). The fingerprint region between 1000 cm⁻¹ and 1300 cm⁻¹ showed a series of absorptions typical to those of trehalose dimycolate.

The component of the aqueous phase released from GL1 after alkaline hydrolysis was identified as trehalose by paper chromatography in solvent C. Moreover, the product of acid hydrolysis of the aqueous phase was glucose in solvent C. In turn, methyl ester derivative of the organic phase after methylation with diazomethane showed a behaviour on TLC (R_F 0.80) similar to that of methyl corynomycolate, R_F 0.71 in solvent A. The IR spectrum (Fig. 3, B) showed an absorption at 3530 cm⁻¹ corresponding to the hydroxyl group; stretching vibrations of methylene and methyl groups were seen between 2800 cm⁻¹ and 2900 cm⁻¹. The ester carbonyl group was represented by an absorption at 1720 cm⁻¹. Absorptions at 1463 cm⁻¹ and 1375 cm⁻¹ were corresponding to C-CH₂ and C-CH₃, re-

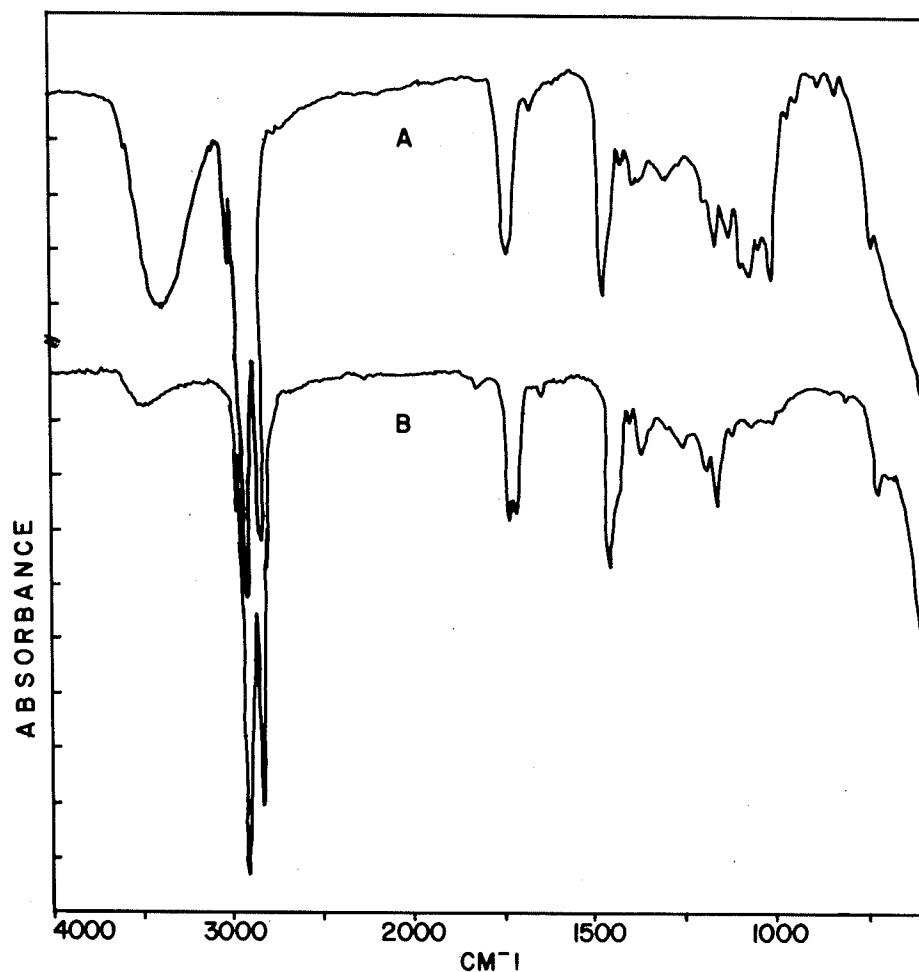


FIGURE 3 — Infrared spectra of glycolipid GL1 (A) purified from *Rhodococcus bronchialis*, and the methyl ester derivative (B) of the fatty acid moiety released from GL1 after alkaline hydrolysis. IR spectra were recorded on a Perkin Elmer model 1750 FT IR spectrophotometer with the lipid on a KBr disk as solvent free film.

spectively. The absorption observed at 720 cm^{-1} represented the rocking vibration of the hydrocarbon chain methylene groups. The region between 1000 cm^{-1} and 1300 cm^{-1} showed a characteristic pattern with a most intense absorption at 1166 cm^{-1} . GL1 and the methyl ester derivative of the corresponding fatty acid moiety after alkaline hydrolysis had refractive indices $n_D^{26} = 1.4857$ and $n_D^{26} = 1.4694$, respectively. According to the McLafferty fragmentation process of methyl mycolate (Fig. 4, structure I), the mass spectrum showed peaks representing the α -subunit (fatty acid methyl ester, structure II) and β -subunit (meroaldehyde, structure III).

The mass spectrum (Fig. 5) showed a peak at m/z 653 corresponding to the molecular ion (M^+) of the meroaldehyde subunit after a loss of 29

mass units of the aldehyde group ($M^+ - \text{CHO}$); that peak indicated that the carbon chain length of the fragment was $C_{48:3}$. In turn, the peak representing the α -subunit was found at m/z 298 (M^+), attributed to methyl octadecanoate, $C_{18:0}$. This finding showed that the α -hydrocarbon side chain R_1 corresponded to $C_{16}\text{ H}_{33}$. In addition, a peak at m/z 327 observed was due to the rupture of methyl mycolate (Fig. 6, structure I) through the area a between $C_\beta - C_\gamma$; that rupture originated the structure IV with R_1 representing $C_{16}\text{ H}_{33}$. This spectrum corresponded to underivatized mycolic acid in $C_{66:3}$ with the R_1 -saturated hydrocarbon chain in C_{16} .

These results indicated that the glycolipid GL1 isolated from *R. bronchialis* was trehalose lipid

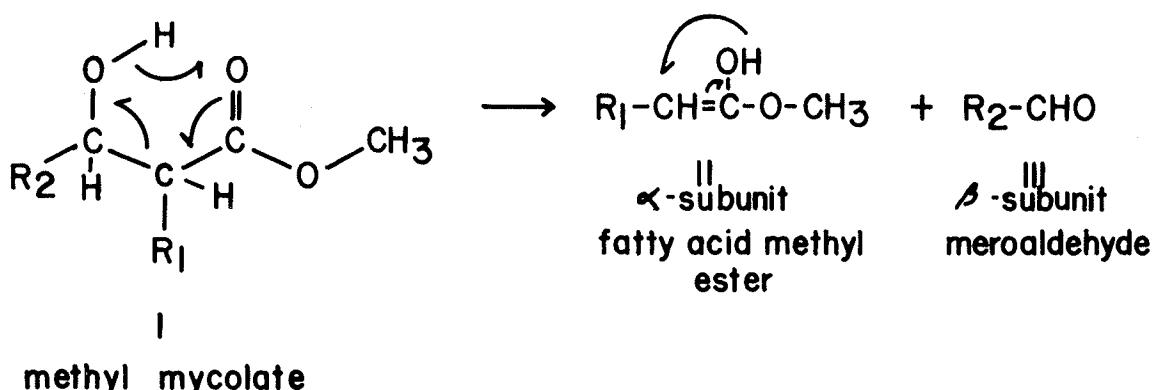


FIGURE 4 — Fragmentation of methyl mycolate, according to the McLafferty rearrangement on mass spectrograph under electron impact mode.

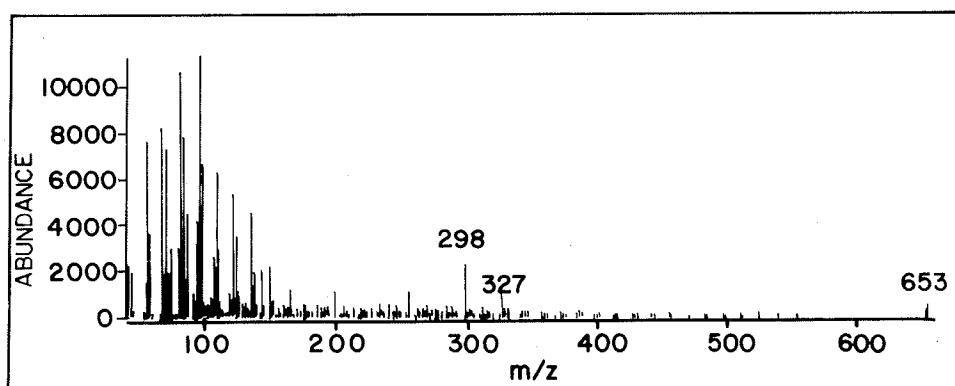


FIGURE 5 — Mass spectrum of the methyl ester derivative of the fatty acid moiety released from glycolipid GL1 of *Rhodococcus bronchialis* after alkaline hydrolysis, recorded on a Hewlett Packard model 5988 A mass spectrograph. The sample was deposited directly on the insertion probe, and recording was done at 70 eV.

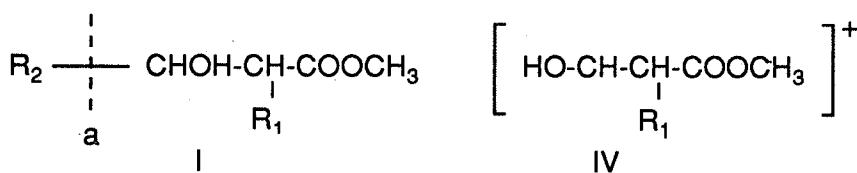


FIGURE 6 — Fragmentation of methyl mycolate through area a between $C_\beta - C_\gamma$ on a mass spectrograph under electron impact mode.

with the major constituent mycolic acids centered in $C_{6:3}$. In turn, when 50 µg of GL1 in paraffin oil was inoculated into mice intraperitoneally, toxic effects were observed. The mean body weight decreased drastically (22.9 ± 1.4 g, at the initial time to 18.7 ± 2.4 g, at the 2nd day of inoculation, $P < 0.05$); this decrease was corresponding to a loss by 18.3% of the initial weight. Subsequent inoculations of 50 µg in 0.1 mL paraffin oil every 48 hr in a

total of 150 µg did not further affect the mean body weight ($P > 0.05$). However, signals and wasting symptoms worsened with mice dying. At the 20th day, no surviving animal was found (Fig. 7). In contrast, inoculation into mice of MMGly did not cause the effects promoted by injecting GL1.

Determination of LD₅₀ of GL 1 using female Swiss mice weighing 22.8 ± 1.7 g gave a value of 33 µg.

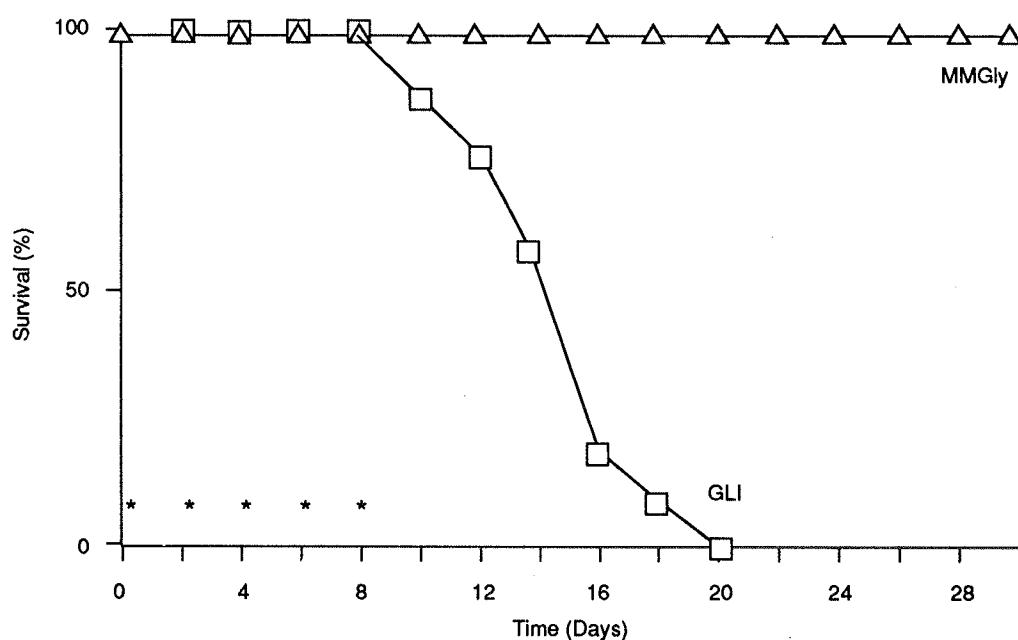


FIGURE 7 — Survival of female Swiss mice inoculated with monomycoloylglycerol MMGly and glycolipid GL1 isolated from *Rhodococcus bronchialis*. As indicated by asterisks, ten mice in each group were inoculated intraperitoneally every 48 hr with 0.1 mL lipid solution in paraffin oil (500 µg/mL).

DISCUSSION

A relationship between a lipid component and the development of toxic properties in mice by inoculating lipid extract from *Mycobacterium tuberculosis* was reported by Bloch (4). These properties were: loss of body weight, diarrhea and cachexia with animals dying. By using *Rhodococcus bronchialis*, a microorganism producer of approximately C₆₀-mycolic acid, extraction of a major toxic factor with properties similar to those described for "cord factor" from *M. tuberculosis* (4,16) was achieved. Moreover, the solvent extracted cells of *R. bronchialis* did not develop toxicity in a degree such as found in animals treated with unextracted cells. These findings suggested unambiguously that component bearing toxic properties was removed from cells by using solvents. Furthermore, fractionation by column chromatography of DESL on silicic acid/silica gel led to the separation of that material into three main fractions: 1) neutral lipids and fatty acids (NFA); 2) glycolipids (GL) and 3) phospholipids (PL). Moreover, it was found that NFA and PL were devoid

of toxic effects when inoculated into mice intraperitoneally while GL was the only fraction from DESL that caused the loss of the mean body weight with animals becoming cachetic and dying.

In turn, intraperitoneal inoculation into mice of GL1, identified as trehalose dimycolate with the trehalose molecule esterified essentially with C_{66:3}-mycolic acids, promoted toxic effects similar to those caused by inoculating the corresponding unextracted cells.

It is believed that trehalose lipid is involved in the mechanism of nocardial pathogenesis. It is worth mentioning that from two clinical nocardia isolates, trehalose dimycolates were found as the main toxic components (13). On the other hand, *R. rhodochrous*, a producer of approximately C₄₀-mycolic acids (11) grown on galactose or glucose was able to produce glycolipid fractions; and in those materials, trehalose dimycolate (7) and glucose monomycolate (21) were the prominent lipids, respectively. Moreover, inoculation of the corresponding lipid extracts caused the appearance of toxic effects with animals losing weight and dying (1). These observations strongly suggest that

there is an envolvement of glycolipids on the complex process of pathogenesis caused by many mycolic acid producing organisms. Furthermore, the occurrence of trehalose dimycolates according to genus and to the chain length of the constituent mycolic acids (10) establishes a challenging question about the role of the structural characteristic of the fatty acid moieties of those lipids on the biological properties of these particular glycolipids.

Investigations are needed in order to understand the dynamics of the interaction between trehalose dimycolates of invasive organisms and the host tissues. Regarding this particular situation, a possible influence of other lipid components from the causative agents such as acylglycerols, free fatty acids and phospholipids may not be disregarded.

RESUMO

Dimicolato de Trealose: principal constituinte lipídico tóxico de *Rhodococcus bronchialis*

Os lipídeos solúveis em éter dietílico do material extraído com clorofórmio/metanol de *Rhodococcus bronchialis* compreendem aproximadamente 15,7 por cento do seu peso total. A inoculação intraperitoneal de 250 µg do extrato lipídico ou de 10 mg de células mortas de *R. bronchialis* em camundongas Swiss, usando-se parafina líquida como veículo, causou drásticos efeitos tóxicos, com animais perdendo peso e morrendo. Ao contrário, animais inoculados com parafina líquida não exibiram esses efeitos. Por outro lado, o peso corpóreo dos animais não sofreu nenhuma diminuição significativa em 48 hr, após a inoculação intraperitoneal de 2 mg de células extraídas com clorofórmio/metanol. O peso corpóreo manteve-se inalterado após a inoculação subsequente de quatro doses de 2 mg de células com clorofórmio/metanol a cada 48 hr. Depois do 14º dia do início do experimento, ocorreu aumento do peso médio corpóreo. Com o intuito de isolar o fator tóxico, o extrato lipídico foi fracionado por cromatografia em coluna de ácido sílico/silica gel em três frações: 1) lipídeos neutros e ácidos graxos; 2) glicolipídeos e 3) fosfolipídeos. Das três frações, apenas a de glicolipídeos manifestou propriedades tóxicas. A purificação ulterior do material forneceu um componente glicolipídico principal GL1, representando 95 por cento da fração. O glicolipídeo purificado correspondeu a cerca de 1,4 por cento da massa total e migrou semelhantemente ao 6,6'-di-C₄₀-micolato de

trealose em cromatografia em camada delgada. O seu espectro infravermelho exibiu uma série de picos de absorção característicos em 994, 1022, 1052, 1095, 1109, 1148 e 1117 cm⁻¹. Ademais, a trealose foi o único componente encontrado na fase aquosa proveniente da hidrólise alcalina do glicolipídeo. A espectrometria de massa do éster metílico da fração de ácidos graxos do glicolipídeo revelou a presença de ácidos micólicos de aproximadamente 60 átomos de carbono. Utilizando-se camundongas Swiss, pesando 22,8 ± 1,7 g, a dose letal de GL1 para 50 por cento dos animais (DL₅₀) foi de 33 microgramas. O di-C₆₀-micolato de trealose constitui-se no principal lipídeo derivado da trealose. Por sua vez, esse glicolipídeo respondeu pelas principais propriedades tóxicas do extrato lipídico e das células de *R. bronchialis*.

Palavras-chave: *Rhodococcus bronchialis*, lipídeo tóxico, dimicolato de trealose, glicolipídeo.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from FAPESP, FINEP and CNPq. We wish to acknowledge Miss M. Ishige and Mr. A. K. Matayoshi for recording the mass and infrared spectra, respectively at the Analytical Unit in the Instituto de Química, and Miss L. Ribeiro for typing the manuscript. T. I. is recipient of fellowship from BID/USP exchange program.

REFERENCES

1. Almeida, E. T. & Ioneda, T. - Composition and toxicity of lipids from *Rhodococcus rhodochrous* grown on medium containing galactose, or manose. *Biochim. Biophys. Acta*, **1005**: 45-50, 1989.
2. Alshamaony, L. M., Goodfellow, M., Minnikin, D. E & Mordarska, H. - Free mycolic acids as criteria in the classification of *Gordona* and *Rhodochrous* complex. *J. Gen. Microbiol.*, **92**: 183-187, 1976.
3. Altura-Werber, E., O'Hare, D. & Luria, D. B. - Infections caused by *Mycobacterium rhodochrous* and scotochromogens. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **97**: 694-698, 1968.
4. Bloch, H. - Studies on the virulence of tubercle bacilli. Isolation and biological properties of a constituent of virulent organism. *J. Exp. Med.*, **91**: 197-218, 1950.
5. Bordet, C. & Michel, G. - Structure et biogenèse des lipides à haut poids moléculaire de *Nocardia asteroides*. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **51**: 527-548, 1969.
6. Boughton, W. H. & Atkin, J. F. - Ventricular peritoneal shunt infection caused by a member of the *Rhodochrous* complex. *J. Clin. Microbiol.*, **11**: 533-534, 1980.
7. Breda, M. & Ioneda, T. - Production of glycolipids by *Rhodococcus rhodochrous* grown on galactose. *Rev. Mi-*

- crobiol.*, 19: 202-206, 1988.
8. Davis, B. D., Dulbecco, R., Eisen, N. H., Ginsberg, H. S. & Wood Jr, W. B. - *Microbiology*, 2nd Edition. Harper and Row Publishers, Inc., San Francisco, 1971.
 9. Haburchak, D. R., Jeffery, B., Higbee, J. W. & Everett, D. - *Infections caused by Rhodochrous*. *Am. J. Med.*, 65: 298-302, 1978.
 10. Ioneda, T. - Lipids of actinomycetes: their structures and biosyntheses. p. 239-249. In: Ortiz-Ortiz, L., Bojalil, L. F. & Yakoleff, V. (eds.). Academic Press, London, 1984.
 11. Ioneda, T., Lederer, E. & Rozanis, J. - Sur la structure des diesters de trehalose ("cord factor") produits par *Nocardia asteroides* et *Nocardia rhodochrous*. *Chem. Phys. Lipids*, 4: 375-392, 1970.
 12. Ioneda, T., Lenz, M. & Pudles, J. - Chemical constitution of glycolipid from *Corynebacterium diphtheriae* PW8. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 13: 110-114, 1963.
 13. Ioneda, T., Niigaki, N. T., Almeida, E. T. & Levy, C. E. - Occurrence of trehalose mycolate as the major lipidic component carrying toxic property in clinical nocardia isolates. *Rev. Microbiol.*, 20: 345-348, 1989.
 14. Ioneda, T. & Silva, C. L. - Purification of 1-monoacylglycerol containing α -branched- β -hydroxylated fatty acids from lipids of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Chem. Phys. Lipids*, 25: 85-91, 1979.
 15. Laneelle, M. A. & Asselineau, J. - Glycolipids of *Brevibacterium vitarumen*. *Biochim. Biophys. Acta*, 486: 205-208, 1977.
 16. Noll, H., Bloch, H., Asselineau, J. & Lederer, E. - Chemical structure of the cord factor of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochim. Biophys. Acta*, 20: 299-309, 1956.
 17. Pudles, J. & Lederer, E. - Sur l'isolement et la constitution chimique de l'acide corynomycolénique et de deux cétones des lipides du bacille diphthérique. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 36: 759-777, 1954.
 18. Severo, L. C., Petrillo, V. F. & Coutinho, L. M. B. - Actinomycetoma caused by *Rhodococcus* spp. *Mycopathologia*, 98: 129-131, 1987.
 19. Silva, C. L., Gesztesi, J. L. & Ioneda, T. - Trehalose mycolates from *Nocardia asteroides*, *Nocardia farcinica*, *Gordona lentifragmenta* and *Gordona bronchialis*. *Chem. Phys. Lipids*, 24: 17-25, 1979.
 20. Silva, C. L. & Ioneda, T. - Purification and characterization of mononocardomycoloyl glycerol from *Nocardia rhodochrous*. *Chem. Phys. Lipids*, 20: 217-223, 1977.
 21. Teixeira, M. C. Z., Ioneda, T. & Asselineau, J. - Glycolipids from *Nocardia rhodochrous* grown on glucose. *Chem. Phys. Lipids*, 37: 155-164, 1985.
 22. Trevelyan, W. E., Procter, D. P. & Harrison, J. S. - Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature*, 166: 444-445, 1950.
 23. Tsukamura, M. - Proposal of a new genus, *Gordona*, for slightly acid fast organisms occurring in sputa of patients with pulmonary disease and in soil. *J. Gen Microbiol.*, 68: 15-26, 1971.
 24. Tsukamura, M. - A further numerical taxonomic study of the *rhodochrous* group. *Jpn. J. Microbiol.*, 18: 37-44, 1974.
 25. Tsukamura, M., Hikosaka, K., Nishimura, K. & Hara, S. - Severe progressive subcutaneous abcesses and necrotizing tenosynovitis caused by *Rhodococcus aurantiacus*. *J. Clin. Microbiol.*, 26: 201-205, 1988.
 26. Tsukamura, M. & Yano, I. - *Rhodococcus sputi* sp. nov., nom. rev., and *Rhodococcus aurantiacus* sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 35: 364-368, 1985.
 27. Vaskovsky, V. E. & Kostetsky, E. Y. - Modified spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms. *J. Lipid Res.*, 90: 396-396, 1968.
 28. Vogel, A. I. - A textbook of practical organic chemistry. Longman, London, 1950.

Received for publication in 17/12/90

MYCOFLORA AND AFLATOXIGENIC SPECIES OF ASPERGILLUS spp ISOLATED FROM RICE

Rogéria Maria Alves de Almeida
Walderez Gambale
Benedito Corrêa
Claudete Rodrigues Paula
Iremar Gonçalves de Azevedo

SUMMARY

The mycoflora and aflatoxigenic species of the *Aspergillus* genus were research, in ninety samples of milled rice from different regions of Brazil. *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Rhodotorula* were isolated beside non sporulated fungi. From the *Aspergillus* genus, *A. parasiticus* was the most frequent, isolated from samples with moisture content between 14 and 17%. All the cultures were toxicogenic with B1, B2, G1 and G2 aflatoxins production. *A. flavus* was the second species most frequent, isolated in samples with moisture of 14 to 16%. From this species, 22% were toxicogenic with the production of B1 or B1 and G1 aflatoxin.

Key Words: milled rice, mycoflora, mycotoxins, aflatoxins, aflatoxigenic species of *Aspergillus*

INTRODUCTION

The study of the mycoflora, particularly of the aflatoxins producers are of fundamental importance since the natural occurrence of this micotoxin in basic food represents a serious risk to human and animal health, and cause enormous financial losses.

Researchers of various countries studied the environmental conditions which cause the development of fungi in rice and observed that the most frequent, belong to genera *Aspergillus* and *Penicillium*, classified as storage fungi (3, 4, 7, 8, 10). In relation to the fungi producers of toxins, the studies are very advanced and currently the most efficient method to stop the production of aflatoxin is the storage of the cereal in storage silos with temperature, humidity and ventilation strictly controlled(10).

The climatic conditions of Brazil together

with the harvest technics and deficient storage are suitable factors for the development of this toxicogenic fungi and consequently the contamination of food by aflatoxin. In spite of this, the measures to avoid this contamination is deficient and the papers referring to these studies are restricted to the detection of mycotoxins in foods.

Considering these aspects, the objectives were to identify the mycoflora in milled rice and the occurrence of aflatoxigenic species of the *Aspergillus* genus.

MATERIAL AND METHODS

Samples analysed - Ninety samples of milled rice negative to aflatoxins were used. The samples came from Rio Grande do Sul (63); São Paulo

(18) and Paraná (9), all states of south of Brasil, in the period from January 1987 to January 1988.

Moisture content (mc) - Moisture content determinations were made by Elotest instrument model 777.

Isolation and identification of the fungi (Bustamatti *et alii*, 1984) - From each sample, 10 grams of the product previously grained was diluted in 90 ml of sterilized distilled water (dilution of 10^{-1}). From this were prepared decimal dilutions and successive until 10^{-4} using the same diluent. One ml of each dilution was deposited in Petri dish and then pour 15 ml of sabouraud-dextrose agar (DIFCO) acidified, melted and cooled to nearly 45°C, followed by an homogenization. After the agar solidification, the Petri dishes were incubated at 25°C for 5 days. The identificaton of the fungi was performed through the usual techniques (2, 5, 12).

Screening for aflatoxins - For screening of *Aspergillus* spp isolates, 250 ml of 2% yeast extract plus 20% sucrose (Yes Medium, (9) in a 1l Roux Flask was inoculated with spores, incubated at room temperature for 10 days, and extracted with three 25 ml portions of chloroform (CHCl_3) on a giratory shaker. The pooled extracts were filtered and evaporated to dryness on a flash evaporator; the residue was cooled and resuspended in 5 ml of CHCl_3 . The aflatoxins standards (B1, B2, G1, G2) used were obtained from Sigma Chemical Company, U. S. A.

Thin-layer chromatograms (TLC) were developed in benzene: ethylacetate: ethanol (60:38:2).

TLC results indicated that analysis could be performed easily and accurately without further purification.

With the positive qualitate analysis the following confirmatory tests were performed: development of the ethilic ether in the chromatographic plaque, aspersion of sulphuric acid solution (50%) on the spots to observe the change in the blue fluorescence (aflatoxin B1) to yellow, and two-dimensional TLC spotting pattern.

RESULTS

The following fungi genera were isolated in decrescent order of frequence: *Aspergillus* (42.2%), *Penicillium* (35.3%), *Cladosporium* (18.8%), *Rhizopus* (6.6%), *Rhodotorula* (4.4%) and non sporulated fungi (26.6%).

Seven species of the *Aspergillus* genus were isolated: *A. parasiticus* (17.7%), *A. flavus*

(10.0%), *A. candidus* (10.0%), *A. chevalieri* (6.6%), *A. amstelodami* (1.1%), *A. ruber* (1.1%) and *A. sydowi* (1.1%).

In regard to the frequency of the *Aspergillus* species with the moisture content (mc) of the rice samples (Table 1), it was observed that the *A. parasiticus* (*A. flavus* group) predominated in rice grains with mc of 14% to 17%, followed by *A. flavus* (*A. flavus* group), present in rice grains with mc which varies from 13% to 17%, *A. chevalieri*, *A. amstelodami* and *A. ruber* (*A. glaucus* group) isolated with mc of 16% to 17% and *A. ruber* (*A. glaucus* group) isolated with mc of 15% to 16%.

TABLE 1 - Absolute (AF) and relative (%) frequency of *A. parasiticus*, *A. Flavus*, *A. candidus*, *A. chevalieri*, *A. amstelodami*, *A. ruber* and *A. sydowi* isolated from 90 samples of milled rice from various regions fo Brazil, in relation to the moisture content of these samples.

Fungi	Moisture content in the rice samples (%)				Total
	13-14	14-15	15-16	16-17	
<i>A. parasiticus</i>					
AF	-	2	5	9	16
%	-	12.5	31.25	56.25	100
<i>A. flavus</i>					
AF	-	4	5	-	9
%	-	4.4	55.6	-	100
<i>A. candidus</i>					
AF	1	1	1	2	2
%	11.1	11.1	22.2	55.6	100
<i>A. chevalieri</i>					
AF	-	-	-	6	6
%	-	-	-	100	100
<i>A. amstelodami</i>					
AF	-	-	-	1	1
%	-	-	-	100	100
<i>A. ruber</i>					
AF	-	-	-	1	1
%	-	-	-	100	100
<i>A. sydowi</i>					
AF	-	-	1	-	1
%	-	-	100	-	100

(-) Absence of fungi

The species of the genera *Penicillium*, *Cladosporium*, *Rhizopous*, *Rhodotorula* and not sporulated fungi were found in samples of rice with mc of 13% to 17%.

The totality of the culturries of *A. parasiticus* were toxicogenic, with the production of B1, B2, G1, G2 aflatoxins. From the *A. flavus* culture, 22% were producers of B1 or B1 and G1 aflatoxin, none other species of *Aspergillus* isolated produced aflatoxins.

DISCUSSION

Christensen and Kaufman (1965) and Wogan (1965) classified the fungi which contaminate the

cereal grains in two groups: field fungi and storage fungi. The field fungi invade the grains or seeds before the harvest, or after it is cut, but before the peeling of the grains. The most frequent field fungi found in rice belong to the genera *Alternaria*, *Cladosporium*, *Helminthosporium* and *Fusarium*, requiring moisture levels in the grains of approximately 22% to 25%. The storage fungi are mainly species of the genera *Aspergillus* e *Penicillium* which predominate in grains with mc between 13% and 18%.

The high prevalence of the genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Cladosporium* in our experiment agreed with other authors (3, 7, 8, 10), except for the genus *Cladosporium* classified by Christensen & Kaufman (1965) and Wogan (1965) as field fungi.

From the *Aspergillus* genus, the species *A. parasiticus*, *A. flavus*, *A. candidus* and *A. chevalieri* were the most frequent, since the two first are potential producers of aflatoxin (12). Other isolated species are involved with deterioration process of the stored grains.

According to Christensen & Kaufman (1965), the species from the *Aspergillus* genus which predominate in the stored cereal grains were *A. amstelodami*, *A. chevalieri*, *A. repens* and *A. ruber*, which are present in grains with 15% moisture and *A. flavus* isolated in grains with mc between 17% and 18%. Nevertheless these results differ from the values of mc of the grains of some fungi isolated (table 1) provenient from the use of different mc measure instruments used, climatic conditions and the types of substrate used.

In relation to the production of aflatoxin by the species form the genus *Aspergillus*, the results obtained are in agreement with the ones obtained by other authors (1,11) according to whom all strains of *A. flavus* have this capacity.

Our results suggest that the fungi from the genera *Aspergillus* and *Penicillium*, isolated with greater frequency, were obtained during the period of storage and its mycelia, and even after the milling, they continued inside the grains. This possibility has already been mentioned by other authors (7,10).

These facts lead us to conclude that these species are part the mycoflora of milled rice and that in favourable environmental conditions, they can grow and produce aflatoxin, becoming inadequate for consume. We suggest that a more effective control of the moisture levels and temperature should be performed during the storage process in order to avoid the proliferation of fungi producers of mycotoxins.

RESUMO

Pesquisou-se a microbiota fúngica e espécies afatoxigênicas em noventa amostras de arroz be-

neficiado provenientes de várias regiões do Brasil. Foram isolados 5 gêneros fúngicos: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Rhodotorula*, além de fungos não esporulados. Do gênero *Aspergillus*, a espécie *A. parasiticus* foi a mais frequente, isolada de amostras com umidade entre 14 e 17%. Todas as suas culturas foram toxigênicas com produção de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂. *A. flavus* foi a segunda espécie mais frequente, isolada de amostras com umidade entre 14 e 16%. Desta espécie, 22% foram toxigênicas com produção de aflatoxinas B₁ ou B₁ e G₁.

Palavras-chave: arroz beneficiado, microbiologia fúngica, aflatoxinas, fungos toxigênicos.

REFERENCES

- ASEVEDO, I.G. Estudo da microbiologia fúngica e influência da temperatura e umidade na produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* Link, 1809, em amostras de milho provenientes de silos. São Paulo, 1988. 86p. (Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).
- BANET, H.L.; HUNTER, B.B. Illustrated genera of imperfect fungi. 3 ed. Minneapolis, Burgess, 1972, 241 p.
- BOLLER, R.A. & SCHROEDER, H.W. Influence of relative humidity on production of aflatoxin in rice by *Aspergillus parasiticus*. *Phytopathology*, 64:17-21, 1974a.
- BOLLER, R.A. & SCHROEDER, H.W. Influence of temperature on production of aflatoxin in rice by *Aspergillus parasiticus*. *Phytopathology*, 64:283-6, 1974b.
- BOTHAST, R.J. & FENNEL, D.I. A medium for rapid identification and enumeration of *Aspergillus flavus* and related organisms. *Mycologia*, 66:365-9, 1974.
- BUSTA, F.F.; PETERSON, E.H. & ADAMS, D.M. Colony count method in: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Ed. Marven L. Speck. American Public Health Association, 1984. 914p.
- CHRISTENSEN, C.M. Influence of moisture content, temperature and time of storage upon invasion of rough rice by storage fungi. *Phytopathology*, 59:145-8, 1969.
- CHRISTENSEN, C.M. & KAUFMAN, H.H. Deteriorations of stored grains by fungi. *Ann. Rev. Phytopatol.*, 3:69-84, 1965.
- DAVIS, N.D.; DIENER U.L.; ELDRIDGE, D.W. Production of aflatoxins B1 and G1 by *Aspergillus flavus* in a semi-synthetic medium. *Appl. Microbiol.*, 14:378-80, 1966.
- DEL PRADO, F.A. & CHRISTENSEN, C.M. Grain storage studies 12. The fungus flora of stored rice seed. *Cereal Chem.*, 29:456-62, 1952.
- DETROX, R.W.; LILLEHOJ, E.B.; CIEGLER, A. Aflatoxin and related compounds. In: Microbial Toxins. Ed. A. Ciegler, S. Kadis, S.J. AJL. New York, Academic Press, 1971. v. 6, p.3-178.
- RAPER, K.B. & FENNEL, D.I. The genus *Aspergillus*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1965. 686 p.
- WOGAN, G.N. (ED). Mycotoxins in foodsffuffs. Cambridge, the M.I.T. Press, 1965. 291p.

Received for publication in 9/07/90

PRODUÇÃO DE BIOMASSA PROTEICA DE *TRICHODERMA REESEI* E *RHIZOPUS OLIGOSPORUS* EM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Josefina Bressan Resende Monteiro¹

Daison Olzany Silva²

Célia Alencar de Moraes²

RESUMO

A utilização do bagaço de cana-de-açúcar como substrato para o crescimento misto de *Trichoderma reesei* e *Rhizopus oligosporus*, microrganismos de reconhecida ausência de patogenicidade, pareceu particularmente adequado. A produção de biomassa foi conduzida em fermentador piloto, em duas etapas: produção de inóculo vegetativo e fermentação propriamente dita. Cultura de *T. reesei* BF 1207, com 62 horas de crescimento, foi inoculada no fermentador de produção no tempo zero, contendo 600 litros de meio Czapecck-Dox modificado. O inóculo vegetativo de *R. oligosporus*, com 40 horas de cultivo, foi transferido para o fermentador de produção com 40 horas de funcionamento. A biomassa fúngica obtida apresentou um teor protéico de 7,7% cujo aminoácido limitante é o triptofano, seguido pelos sulfurados, sendo os demais encontrados em níveis compatíveis com a proteína de referência da FAO. Em relação à proteína do ovo, a proteína da biomassa apresentou um índice de aminoácidos essenciais igual a 56,6, sugerindo ser a mesma de baixo valor nutritivo. O teor de ácidos nucléicos totais de 1,4% revelou uma reduzida taxa de crescimento dos microrganismos. A fração de nitrogênio de ácidos nucléicos, expressa como porcentagem de nitrogênio total foi igual a 16,3%. Esse valor é decorrente de um baixo conteúdo em nitrogênio protéico e não de grandes teores em nitrogênio de ácidos nucléicos.

Palavras-chave: biomassa proteica, bagaço de cana de açúcar, *Trichoderma reesei*, *Rhizopus oligosporus*.

INTRODUÇÃO

Os organismos internacionais de assistência aos países subdesenvolvidos são unâimes em suas preocupações quanto ao problema de carência de alimentos básicos de origem animal e vegetal, principalmente fontes de proteína.

A população infantil no Brasil está estimada em cerca de 25 milhões. Uma parcela considerável

desse contingente é acometida de desnutrição, com suas trágicas consequências. A taxa de mortalidade nos primeiros anos de vida é bastante alta e a maioria das crianças que sobrevivem tem seu desenvolvimento físico e intelectual comprometidos (6).

Na tentativa de solucionar a carência de alimentos, especialmente de proteínas de alto valor biológico, vários processos não convencionais têm sido desenvolvidos, dentre os quais a produção de

1. Departamento de Nutrição e Saúde. Universidade Federal de Viçosa - 36570 - Viçosa - MG.

2. Departamento de Biologia Geral. Universidade Federal de Viçosa - 36570 - Viçosa - MG. Endereço para pedido de separatas.

proteínas a partir de microrganismos, sendo esta denominada *Single Cell Protein* (SCP) ou proteína de unicelulares (5, 11, 18). A partir dos microrganismos podem se obter os aminoácidos essenciais, através da síntese controlada das proteínas, e ainda os demais nutrientes lipídios, carboidratos, vitaminas e sais minerais. A biomassa produzida pode ser incorporada em concentrados para animais e em formulações de alimento humano (17, 14).

No Brasil, um dos subprodutos da agroindústria alcooleira é o bagaço de cana-de-açúcar, onde nas destilarias a sua utilização racional está em torno de 50%. O excedente pode ser uma opção de substrato celulósico para a produção de proteína a partir de *Trichoderma reesei* e *Rhizopus oligosporus*.

Apesar de serem inúmeros os microrganismos que hidrolisam a celulose, o *T. reesei* foi empregado neste trabalho por apresentar características promissoras devido ao seu complexo celulase ser bastante estável, sendo excretado no meio, com adequada mistura de enzimas, em grandes quantidades (12, 19, 1). Enquanto que o *R. oligosporus* foi utilizado por sua capacidade de crescer em glicose, por ser um fungo testado na alimentação humana e por apresentar em sua massa fúngica proteína com bom perfil de aminoácidos essenciais, muitas vezes comparáveis à proteína de referência da FAO (14, 8, 13, 26).

O objetivo deste trabalho foi estudar a viabilidade do bagaço de cana-de-açúcar como substrato para o desenvolvimento de *T. reesei* e *R. oligosporus* através da quantificação dos componentes químicos da biomassa, dando ênfase aos ácidos nucléicos, proteínas e aminoácidos.

MATERIAL E MÉTODOS

A produção de biomassa foi conduzida em fermentador piloto em duas etapas, sendo a produção de inóculo e o processo fermentativo propriamente dito.

Os parâmetros tempo, temperatura, pH, aeração, agitação, composição do meio e pré-tratamentos foram determinados em experimentos preliminares.

Produção de Inóculo - O inóculo foi obtido por germinação dos esporos de *Trichoderma reesei* BF 1207 e *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710, em fermentador com capacidade de 100 litros, provido de linhas de injeção de vapor para esterilização *in situ* e de controle de agitação, pressão, temperatura, espuma e aeração.

Para a germinação dos esporos de *T. reesei*

BF 1207 foi utilizado o meio Czapec-Dox modificado em 0,5% de bagaço de cana pré-tratado por moagem a 60 "mesh" em substituição a sacarose, NaNO₃ 0,2%, K₂HPO₄, 0,1%, MgSO₄/7H₂O 0,05%, KCl 0,05%, FeSO₄ 0,001% e ainda extrato de levadura a 0,1%. O fermentador foi carregado com 70 litros de meio, esterilizado a 120°C. A suspensão de esporos foi preparada em 400 ml de solução fisiológica contendo 0,1% de Tween 80, a partir de cinco tubos de meio Potato Dextrose Agar (PDA). Após a inoculação, a temperatura, a agitação e a aeração foram controladas a 30°C, 200 rpm e 0,5 vvm, respectivamente. O pH inicial foi de 5,5 e não foi controlado durante o processo. Após 62 horas de cultivo, o inóculo em fase vegetativa foi transferido para o fermentador piloto para o início da fermentação propriamente dita.

A germinação de esporos de *R. oligosporus* NRRL 2710 foi conduzida nas mesmas condições utilizadas para o *T. reesei* BF 1207, excetuando-se o bagaço de cana, que foi substituído por glicose a 0,5% e a redução do tempo de cultivo para 40 horas.

Processo Fermentativo - Foi utilizado para o processo fermentativo propriamente dito, um fermentador piloto com capacidade de 1000 litros, carregado com 600 litros de meio nas mesmas condições empregadas para a produção de inóculo de *T. reesei* BF 1207. A acidificação do meio (pH 4,0) foi necessária como forma de controlar o crescimento de contaminações bacterianas. Efetuada a esterilização do meio a 120°C, por 30 minutos, e resfriamento a 30°C, o fermentador recebeu o inóculo em fase vegetativa de *T. reesei* BF 1207 no tempo zero e o de *R. oligosporus* NRRL 2710, após 40 horas de fermentação.

Após 100 horas de fermentação, o sobrenadante foi descartado por decantação, e o resíduo constituído de bagaço de cana não digerido e micélio foi separado utilizando tamis 140 "mesh". Em seguida o material foi lavado com água destilada eliminando desta maneira resíduos do meio de fermentação, desidratado a 70°C, por 36 horas, e moído a 60 "mesh", obtendo-se assim a biomassa fúngica.

Análise da Biomassa - O bagaço de cana moído a 60 "mesh" e a biomassa fúngica foram analisados quanto aos teores de:

- Proteína bruta, Umidade, Extrato etéreo, Cinzas (2); Fibra bruta, Celulose e Lignina (21); Ácidos nucléicos totais (25); Cálcio e Magnésio (20); Ferro, Potássio, Sódio e Manganês (3); Fósforo (4); Zinco (16).
- Aminograma (23).

RESULTADOS

Os valores obtidos com relação à composição química do bagaço de cana moído a 60 "mesh" e a biomassa fúngica se encontram na Tabela 1. Os re-

TABELA 1 - Composição do bagaço de cana moído e da biomassa fúngica.

Componentes g/100 g	Bagaço de Cana Moído	Biomass a Fúngica
Proteína Bruta	1,58	7,70
Extrato Etéreo	1,40	0,69
Cinzas	3,30	2,86
Fibra Detergente Ácido (F. D. A.) ^b	60,1	62,1
Extrato Não Nitrogenado (E. N. N.) ^c	33,6	25,6
Umidade	9,0	7,1
Celulose	44,7	47,2
Lignina	15,4	15,9
Fósforo	0,05	0,26
Potássio	0,20	0,12
Cálcio	0,08	0,06
Magnésio	0,06	0,03
Sódio	traços	traços
Manganês	0,006	0,006
Ferro	0,05	0,18
Zinco	0,001	0,008

a. Constituída por bagaço de cana não digerido e micélio.

b. Constituída por lignina e celulose.

c. Engloba a hemicelulose. Diferença entre a soma dos teores decinza, extrato etéreo, proteína e F. D. A. e o valor 100.

TABELA 2 - Aminograma do bagaço de cana moído e da biomassa fúngica

Aminoácidos	Bagaço de Cana Moído		Biomassa Fúngica ^a	
	Proteína g/100 g	Materia Seca g/100 g	Proteína g/100 g	Materia Seca g/100 g
Lisina	2,04	0,06	3,87	0,25
Histidina	0,86	0,02	1,31	0,08
Arginina	2,41	0,07	3,15	0,20
Ácido Aspártico	9,77	0,28	5,61	0,36
Treonina	3,11	0,11	3,88	0,20
Serina	4,08	0,12	2,88	0,18
Ácido Glutâmico	12,79	0,36	6,93	0,44
Prolina	4,40	0,12	2,82	0,18
Glicina	4,40	0,12	3,13	0,20
Alanina	4,90	0,14	3,77	0,24
Cistina	traços	traços	traços	traços
Valina	3,55	0,14	4,81	0,23
Metionina	0,55	0,02	0,78	0,03
Isoleucina	2,84	0,11	3,91	0,18
Leucina	7,25	0,21	9,68	0,62
Tirosina	1,68	0,07	2,32	0,11
Fenilalanina	2,60	0,12	4,17	0,17
Triptofano	traços	traços	traços	traços
Total	—	2,07	—	3,67
Amônia		0,03		0,16

a. Constituída por bagaço de cana não digerido e micélio.

TABELA 3 - Teores de aminoácidos essenciais da proteína do bagaço de cana moído, da biomassa fúngica, da proteína de referência da FAO e do ovo.

Aminoácidos Essenciais g/100 g	Bagaço de Cana Moído	Biomassa Fúngica	Proteína de Referência FAO/WHO 1/	Ovo2/ 100
Lisina	2,0	3,9	5,5	7,0
Leucina	7,2	9,7	7,0	8,8
Isoleucina	2,8	3,9	4,0	6,3
Aromáticos	4,3	6,5	6,0	9,9
Sulfurados	0,5	0,8	3,5	5,8
Treonina	3,1	3,9	4,0	5,1
Valina	3,5	4,8	5,0	6,8
Triptofano	traços	traços	1,0	1,5
Total	23,4	33,5	36,0	51,2
Cômputo				
Químico I	3/	3/	—	100
Cômputo				
Químico II	8,6	13,8		
Aminoácido				
Limitante I	Triptofano	Triptofano	Nenhum	Nenhum
Aminoácido				
Limitante II	Sulfurados	Sulfurados		
Índice de				
Aminoácidos				
Essenciais				
(Índice AAE)	38,3	56,6	—	100

1/ Pellet & Young (1980) (15)

2/ Pellet & Young (1980) (15)

3/ Valores não determinados

TABELA 4 - Frações nitrogenadas no bagaço de cana moído e biomassa fúngica

Frações Nitrogenadas	Bagaço de Cana Moído g/100 g	Biomassa Fúngica ^a g/100 g
N Total ^b	0,25	1,23
Proteína Bruta ^c	1,56	7,70
NAN Totais ^d	0,09	0,20
Ácidos Nucléicos Totais ^e	0,61	1,36
N proteíco ^f	0,16	1,40
N Proteíco ^g	0,33	0,59
N de Purinas ^h	0,06	0,14
NAN: N Proteíco	1:1,78	1:5,15
N de Purinas: N Proteíco	1:3,67	1:2,95
N de Purinas	1:1,5	1:7,35
N Total X 100	1:5,5	1:4,21
N Total	36,0	16,30

a. Constituída por bagaço de cana não digerido e micélio.

b. Nitrogênio total (AOAC) (2)

c. N Total X 6,25

d. Dosado pelo método descrito por VANANUVAT (1973) (25)

e. NAN X 6,25

f. Diferença entre N Total e NAN

g. Total de aminoácidos/6,25

h. NAN/1,4

ferentes à composição em aminoácidos e amônia na Tabela 2 e na Tabela 3 se encontram os valores referentes ao conteúdo em aminoácidos essenciais, índice de aminoácidos essenciais e cômputo químico nesta última, exercendo um paralelo com a proteína de referência da FAO/WHO e do ovo (g de aminoácido por 100 g de proteína). Na Tabela 4, encontram-se as proporções de nitrogênio de proteínas e nitrogênio de purinas ou de ácidos nucleicos totais.

DISCUSSÃO

O crescimento da cultura mista de fungos em bagaço de cana proporcionou um aumento de 387% no teor de proteína bruta deste resíduo (Tabela 1). Este resultado pode ser explicado pelo teor de proteína bruta presente nos fungos, em torno de 30 - 60% do peso seco do micélio, como relatado por Kosaric & Miyata (9). A redução no teor de extrato etéreo no material fermentado pode ser, segundo Sorenson & Hesseltine (22), o resultado da intensa atividade lipolítica do *R. oligosporus*, que tem a capacidade de utilizar ácidos graxos como o linolênico, como fonte de carbono. Ainda com relação à Tabela 1, observa-se um pequeno aumento no teor de fibra em detergente ácido na biomassa fúngica. Isto é devido provavelmente ao aumento no teor de celulose, visto que o teor de lignina foi mantido. Wang & col. (27) relatam um aumento no teor de fibras, devido ao micélio de *R. oligosporus*. Griffin (7) salienta que a rigidez da célula fúngica é devida à parede ser composta de polissacarídeos de natureza celulósica e pela quitina, além de proteínas e lipídios.

Quanto ao teor de extrato não nitrogenado (Tabela 1) verifica-se uma leve redução na biomassa fúngica, indicando uma utilização de apenas 23,8% dos carboidratos disponíveis no resíduo, para seu crescimento.

A redução no teor de cinzas na biomassa fúngica (Tabela 1) tem relativamente pouco valor, uma vez que são vários fatores que interferem na sua quantificação (21). Dentre os vários elementos metálicos e não metálicos encontrados, o fósforo apresenta um aumento porcentual no resíduo mineral, justificado pois o referido elemento é um componente essencial dos ácidos nucleicos.

A porcentagem de proteínas na biomassa, baseadas na soma das porcentagens dos resíduos de aminoácidos, foi de 3,67% (Tabela 2) e é bastante inferior ao resultado de 7,7%, obtido pelo

método de nitrogênio total observado na Tabela 1. Esse resultado se explica, pois nesse último método, determinou-se o nitrogênio protéico propriamente dito e outros compostos nitrogenados não protéicos, tais como aminas, amidas, nitrilas e aminoácidos, resultando a proteína bruta. Dos compostos nitrogenados não protéicos, apenas a dosagem de amônia foi realizada. Os altos teores em ácido glutâmico e aspártico observados na Tabela 2, se justificam tendo em vista que a maior parte das proteínas estruturais e enzimáticas de fungos são conhecidas como de natureza ácida (7). Quanto ao aminograma do bagaço de cana moído, os teores encontrados são superiores aos obtidos por Toit & col. (24).

Com relação aos dados apresentados na Tabela 3, observa-se que a proteína da biomassa fúngica apresentou deficiência em triptofano e aminoácidos sulfurados. A simples determinação do teor de aminoácidos de uma proteína não indica sua disponibilidade e seu valor nutritivo. Através do cômputo de aminoácidos essenciais e índice de aminoácidos essenciais (índice AAE), a qualidade de uma proteína é avaliada quimicamente. O cômputo de aminoácidos essenciais é a porcentagem de cada um desses aminoácidos, em relação ao mesmo aminoácido numa proteína de referência, geralmente o ovo. A menor porcentagem é chamada cômputo químico e o aminoácido correspondente é o aminoácido limitante. O índice AAE é a média geométrica dos cômputos de aminoácidos essenciais, em relação à proteína de referência, nesse caso, o ovo (15). A Tabela 3 apresenta esses cálculos, utilizando o ovo como referência. Tendo como padrão a proteína da FAO/WHO, seguramente o cômputo e o índice AAE serão maiores. O padrão FAO/WHO é uma proteína teórica, em proporções aminoacídicas ótimas, com 100% de utilização. Indiferente à proteína de referência utilizada, os aminoácidos triptofano e sulfurados foram os limitantes na biomassa fúngica. Entretanto, Krause & Mahan (10) mostraram que muitos alimentos convencionais, possíveis fontes de proteínas, também apresentam deficiências de um ou vários aminoácidos essenciais. São os casos, da lisina para os cereais, a metionina para o leite de vaca, feijão e soja e isoleucina para a mandioca.

O reduzido teor em ácidos nucleicos totais, detectado na biomassa fúngica, foi devido ao crescimento lento dos fungos (Tabela 4). Moraes (13) em seus estudos com *R. oligosporus* encontrou um teor em ácidos nucleicos totais variando entre 7 e 10%. Pode-se observar também na Tabela 4, uma

alta relação N de purinas: N protéico, devido o N protéico ter sido superestimado e a concentração de purina ser realmente baixa. Provavelmente, com essas concentrações em ácidos nucléicos totais e purinas, 147 gramas de biomassa poderão ser ingeridos por dia, assegurando o nível normal de 3 - 6 mg/100 ml de ácido úrico no soro.

A fração de N de ácidos nucléicos, expressa como porcentagem de N total, varia de 14-16% para fungos; 17-21% em leveduras e 30% ou mais em bactérias. Como está referido na Tabela 4, os valores de 16,3% encontrados na biomassa fúngica não foram devidos a altos teores em nitrogênio de ácidos nucléicos, mas a um conteúdo menor em nitrogênio protéico.

Deve-se reconhecer que não é suficiente produzir uma biomassa protéica, mas também descobrir como fazê-la um produto aceitável, de baixo custo e adequado para o uso em dietas animais e humanas. Ainda, são necessários estudos que avaliem a viabilidade econômica tanto dos pré-tratamentos aplicados ao bagaço de cana como também, da relação carbono/nitrogênio na composição do meio de fermentação, frente ao teor protéico da biomassa fúngica. As barreiras tecnológicas e sociológicas são talvez os maiores obstáculos para o uso desse produto como alimento.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi parcialmente financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a quem agradecemos.

SUMMARY

Trichoderma reesei and *Rhizopus oligosporus* growth in sugar cane bagasse for protein production

The use of sugar cane bagasse as substrate for a mixed culture of *Trichoderma reesei* and *Rhizopus oligosporus*, both non pathogenic microorganisms, seemed to be adequate. A high bulk biomass production was conducted in a pilot fermentor in two phases: vegetative inoculum production and fermentation. Culture of *T. reesei* BF 1207, growth during 62 hours, was inoculated in the production fermentor at zero time with 600 liters Czapec-Dox modified medium. The *R. oli-*

gosporus inoculum was added after 40 hours of fermentation to production fermentor with 40 hours in activity. The biomass protein content was 7.7%, with the tryptophan as the limiting aminoacid, followed by the sulfur aminoacids being the other aminoacids very similar to those from FAO reference protein. The biomass presented an essential aminoacids index equal to 56.6, suggesting that its protein have low nutritional value when compared to egg protein. The total nucleic acid content equal to 1.4% revealed a very slow fungi growth. The nitrogen fraction of the nucleic acid, expressed as total N percentage was 16.3% and showed that value was not due to great nucleic acid nitrogen content but to a lower content of protein nitrogen.

Key Words: Biomass, sugar cane bagasse, *Trichoderma reesei*, *Rhizopus oligosporus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen, A.L. & Mortensen, R.E. - Production of cellulase from *Trichoderma reesei* in fed-batch fermentation from soluble carbon sources. *Biotechnol. Bioeng.* 23: 2641-2645, 1981.
- Association of Official Analytical Chemists, eds. - *Official Methods of Analysis of the AOAC*. Washington, D.C., The Association, 1980.
- Braga, J.M. - Avaliação da Fertilidade do Solo. Viçosa, Imprensa Universitária. 1980. p. 45-86.
- Braga, J.M. & Defelipo, B.V. - Determinação espectrofotométrica de fósforo em extrato de solo e material vegetal. *Rev. Ceres*, 21: 73-85, 1974.
- Carter, G.B. - Is biotechnology feeding the russian? *New Scientist*, 90: 216-218, 1981.
- Ferrari, B.T. - Desnutrição: A tragédia da fome. *Rev. Bras. Clin. Terap.* 15: 41-48, 1986.
- Griffin, D.H. - *Fungal Physiology*. New York, John Wiley & Sons Inc., 383 p, 1981.
- Jurus, A.M. & Sundberg, W.J. - Penetration of *Rhizopus oligosporus* into soybeans in tempeh. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 284, 1976.
- Kosaric, N. & Miyata, N. - Growth of morel mushroom mycelium in cheese whey. *J. Dairy Res.* 48: 149-162, 1981.
- Krause, M.V. & Mahan, L.K. - Alimentos, Nutrição e Dietoterapia. São Paulo, Roca, 1052 p, 1985.
- Litchfield, J.H. - Single cell proteins. *Science*, 219: 740-746, 1983.
- Menezes, T.J.B.; Duchini, L.A. & Figueiredo, I.B. - Produção em laboratório de proteína fúngica em bagaço de cana. *Rev. Bras. Tecol.* 7: 439-446, 1976.
- Moraes, C.A. - Utilização do soro de queijo para produção de proteína microbiana. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. (Tese M.S.), 1981.
- Nicol, J.R. Produção de proteína fúngica em resíduos industriais agroalimentares. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais. (Tese D.S.), 1986.
- Pellet, P.L. & Young, V.R. - Nutritional Evaluation of

- Protein Foods. Tokyo, The United Nations University, 153 p, 1980.
- 16. Price, W.J. - Analytical atomic absorption spectrometry. Londres, Heydeu & Son Ltd, 239 p, 1972.
 - 17. Rao, R.R.; Deshmukh, S.S. & Srinivasan, M.C. - Biomass protein formation by filamentous fungi on woody substrates. *Biotechnol. Letters*, 6: 461-464, 1984.
 - 18. Rimmington, A. - Single cell protein. The soviet revolution? *New Scientist*, 146: 12-15, 1985.
 - 19. Ryu, D.D.Y. & Mandels, M. - Cellulases: biosynthesis and application. *Enzyme Microbiol. Technol.* 2: 91-102, 1980.
 - 20. Sarruge, J.R. & Haag, H.P. - Análise química em plantas. Piracicaba, Imprensa Universitária, ESALQ. 1974. p. 56.
 - 21. Silva, D.J. - Análise de Alimentos: métodos químicos e biológicos. Viçosa, Imprensa Universitária. 1981. p. 166.
 - 22. Sorenson, W.G. & Hesseltine, C.W. - Carbon and nitrogen utilization by *Rhizopus oligosporus*. *Mycologia*, 58: 681-689, 1966.
 - 23. Spackmann, O.H.; Stein, W.H. & Moore, F. - Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.* 30: 1190-1206, 1958.
 - 24. Toit, P.J.; Oliver, S.P. & Van Biljon, P.L. - Sugar cane bagasse as a possible source of fermentable carbohydrates: Characterization of bagasse with regard to monosaccharide, hemicellulose, and aminoacid composition. *Biotechnol. Bioeng.* 26: 1071-1078, 1984.
 - 25. Vananuvat, P. - Production, composition and properties of protein from *Saccharomyces fragilis* from on crude lactose. Cornell University. (Tese Ph.D.), 1973.
 - 26. Waliszewska, A.; Garcia, H.S. & Waliszewska, K. - Nutritional evaluation of *Rhizopus oligosporus* biomass propagated on potato. *Nutr. Rep. Int.* 28: 197-202, 1983.
 - 27. Wang, H.L.; Ruttle, D.I. & Hesseltine, C.W. - Protein quality of wheat and soybeans after *Rhizopus oligosporus* fermentation. *J. Nutrition*, 96: 109-114, 1968.

Recebido para publicação em 15/12/89

EFEITO DA REMOÇÃO DE CÉLULAS SOBRE O RENDIMENTO DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA POR LEVEDURA

Valentina de Fátima De Martin Orelli¹
Henrique Vianna de Amorim¹
Alessandro Antonio Orelli Júnior¹
Antonio Joaquim de Oliveira²

RESUMO

O presente trabalho visou estudar o efeito da remoção de quantidades crescentes de células de levedura do processo (sangria) sobre o rendimento da fermentação alcoólica. As fermentações foram conduzidas com a levedura de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*) em mosto de xarope a 30°C e mosto de melaço a 33°C. Após cada ciclo fermentativo foram removidos 5%, 10%, 15% e 20% (v/v) de células, durante sete ciclos. A remoção de 5% a 20% (v/v) provocou uma diminuição no teor de matéria seca, proporcional a porcentagem removida em ambas as condições testadas. A viabilidade celular aumentou com a aplicação de 5% a 20% (v/v) de sangria, sendo este aumento significativo no ciclo 7 para sangria de 5% e nos ciclos 5, 6 e 7 para sangrias de 10%, 15% e 20% (v/v), em mosto de xarope a 30°C. Em mosto de melaço a 33°C também ocorreu aumento da viabilidade, porém as sangrias de 5% e 10%, 10% e 15%, 15% e 20% (v/v) não diferiram significativamente entre si. A aplicação de 5% a 20% (v/v) de sangria diminuiu os rendimentos das fermentações conduzidas tanto em xarope como em melaço. Rendimentos relativos às sangrias de 5% e 10%, e entre 15% e 20% (v/v) não diferiram significativamente entre si quando em mosto de xarope a 30°C. O mesmo efeito foi observado entre as sangrias de 15% e 20% (v/v) em mosto de melaço a 33°C.

Palavras-chave: fermentação alcoólica, remoção de células, "sangria"

INTRODUÇÃO

Devido ao grande valor proteico e vitamínico da levedura é de interesse das indústrias alcooleiras do Brasil a produção de levedura como subproduto da fermentação alcoólica para utilizá-la na alimentação animal.

Embora indiscutível a utilização deste subproduto no arraçoamento de gado bovino, é polêmica a prática da sangria de levedura no

processo de fermentação alcoólica.

No processo de fermentação de Melle-Boinot, sistema mais utilizado no Brasil, as células de levedura são recuperadas através de uma total recirculação das mesmas, de maneira a tornar mínima a formação de novas células pela manutenção de alta concentração celular e assim conseguir um aumento do rendimento alcoólico através de um consumo menor de açúcar que seria empregado na formação de componentes celulares da levedura (9, 18). En-

1. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP, Deptº de Química, Caixa Postal 09, 13.400 - Piracicaba-SP, Brasil.
2. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP, Deptº de Tecnologia Rural, Caixa Postal 09, 13.400 Piracicaba-SP, Brasil.

tretanto várias usinas e destilarias, baseadas em evidências práticas, contestam essa teoria mostrando que o desvio de parte do leite-de-levedura a ser recirculado não compromete a produção de etanol. A remoção de 15% do fermento do mosto fermentado (5), 20 a 40 gramas de matéria seca por litro de álcool produzido (15) ou 10% do leite-de-levedura (6), são alguns dos níveis de sangria praticados em destilarias brasileiras.

De um modo geral não parece possível fazer uma generalização do nível de levedura a ser removido pelas indústrias de álcool face aos inúmeros fatores envolvidos, dentre os quais podemos destacar o processo de fermentação usado (contínuo ou descontínuo), as condições de fermentação, e o desempenho das centrífugadoras.

Este trabalho foi desenvolvido, em escala de laboratório, com o objetivo de estudar o efeito da remoção de quantidades crescentes de fermento, entre um ciclo fermentativo e outro, sobre o rendimento da fermentação alcoólica.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo - O microrganismo utilizado foi a levedura de panificação Fleischmann (*Saccharomyces cerevisiae*).

Meio de Fermentação - Xarope de cana-de-açúcar (62,7% açúcares redutores totais; 1250 ppm N total; 69 ppm P; 6885 ppm K; 1188 ppm Ca; 669 ppm Mg; 1,5 ppm Zn; 421 ppm SO₄) e melado de cana-de-açúcar (66,8% açúcares redutores totais; 2910 ppm N; 443 ppm P; 19890 ppm K; 1918 ppm Ca; 2320 ppm Mg; 5,1 ppm Zn; 52 ppm SO₄) foram diluídos a uma concentração de 150 g/l e 152 g/l em açúcares redutores totais (ART) respectivamente. Os mostos foram então ajustados a pH 3,60 com ácido sulfúrico e autoclavados a 121°C/1 atm durante 20 minutos.

Fermentação e remoção de células - De uma suspensão aquosa de células de levedura de concentração conhecida foram transferidos volumes correspondentes a 10 ml de células (cerca de 3,46 g de matéria seca) para tubos de fermentação graduados de 45 mm x 170 mm. As células foram separadas por centrifugação a 1900 rpm (686 x g) durante 20 minutos e o seu volume completado a cerca de 19 ml com água destilada esterilizada afim de manter constante o volume de inóculo em todos os tubos sujeitos à remoção de células no decorrer dos ciclos fermentativos. Em seguida fez-

se a adição do mosto em 4 alíquotas de 20 ml, em intervalos de 2 horas. O inóculo inicial foi de cerca de 10⁹ células/ml. As fermentações foram conduzidas a 30°C ou 33°C e, para maior facilidade dos trabalhos em laboratório, por um tempo mínimo de 20 horas.

O álcool desprendido da fermentação e arrastado pelo gás carbônico foi recuperado pelo borbulhamento em erlenmeyers contendo água destilada gelada e determinado posteriormente.

Ao final da fermentação, caracterizada pela paralisação (visual) da liberação de gás carbônico determinou-se a viabilidade celular e completou-se o volume a 100 ml com água. A suspensão foi centrifugada e no vinho foram determinados o grau alcoólico, pH e o teor de açúcares residuais (AR) cujo valor médio não excedeu 0,09% em todos os tratamentos, indicando um consumo de açúcar quase que total durante as fermentações.

As células foram lavadas por ressuspensão em água ácida a pH 2,5 e o seu volume final completado a 100 ml. Desta suspensão retirou-se 1 ml para determinação da matéria seca e 5, 10, 15 e 20 ml equivalentes a 5, 10, 15 e 20% (v/v) de células (sangria) conforme descrito em (4). A suspensão remanescente no tubo foi centrifugada e o sobrenadante descartado. A massa celular foi ressuspensa até cerca de 19 ml com água destilada dando início a um novo ciclo fermentativo. O mesmo procedimento foi repetido durante 7 ciclos.

Métodos analíticos - As concentrações de AR e ART foram determinadas pelo método de Somogyi e Nelson adaptado (1).

Nitrogênio total foi determinado pelo método micro-Kjeldhal (16), após digestão sulfúrica das amostras. Fósforo foi analisado após digestão nitroperclórica das amostras (3). Cálcio, magnésio, potássio e zinco foram determinados por absorção atômica após digestão nitroperclórica das amostras (16).

O nível de sulfito no mosto foi determinado colorimetricamente através da reação com p-rosanilina após destilação da amostra em meio ácido (21).

Na determinação de etanol, o vinho delevurado foi destilado em microdestilador Kjedhal adaptado para álcool e a densidade da mistura hidroalcoólica medida em densímetro digital Anton-Paar mod. DMA-46 (1).

A viabilidade celular foi determinada com azul de metileno e citrato de sódio (14).

O teor de matéria seca foi determinado (13) relacionando-se a turbidez da suspensão aquosa de levedura com o peso da massa celular.

Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando-se o delineamento "split-plot" em blocos casualizados (8). As curvas foram ajustadas por análises de regressão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Efeito da sangria de levedura sobre a fermentação alcoólica em mosto de xarope a 30°C

Matéria seca - A remoção de células provocou uma diminuição do teor de matéria seca (g/100 ml) proporcional à porcentagem de células removidas, conforme mostra a Figura 1.

Verificou-se que ciclo a ciclo o teor de matéria seca aumentou para a testemunha (sem remoção de células) e diminuiu para as sangrias de 5%, 10%, 15% e 20% (v/v) mostrando uma tendência à estabilização nos dois ciclos finais.

Embora tenha ocorrido crescimento celular entre os ciclos, verificou-se que este ficou abaixo dos níveis de sangria aplicados, resultando na queda do teor de matéria seca com os ciclos.

Este resultado pode provavelmente ser explicado pela deficiência de nutrientes do mosto de xarope, principalmente com relação a N e P. Do N-total do mosto, apenas 40-50% fica disponível para a levedura (12), o que corresponde a 125-175 ppm de N no presente trabalho. Esta concentração está abaixo de 500 - 600 ppm N total que é considerada uma concentração ótima (2). O P, elemento essencial ao crescimento celular, é requerido a uma concentração de 55-65 ppm (17) ou 186 ppm/10 g células (9), concentrações estas muito superiores a encontrada no mosto utilizado (cerca de 17 ppm).

Viabilidade celular - Os resultados apresentados na Figura 2 demonstraram que a viabilidade celular da testemunha foi significativamente menor a partir do ciclo 6 em relação à sangria de 5% (v/v) e a partir do ciclo 4 relativamente às sangrias de 10%, 15% e 20% (v/v). Ciclo a ciclo, verificou-se uma diminuição da viabilidade celular em todos os níveis de sangria. Entretanto quanto maior a porcentagem de células removidas do processo, menos acentuada foi a queda da viabilidade.

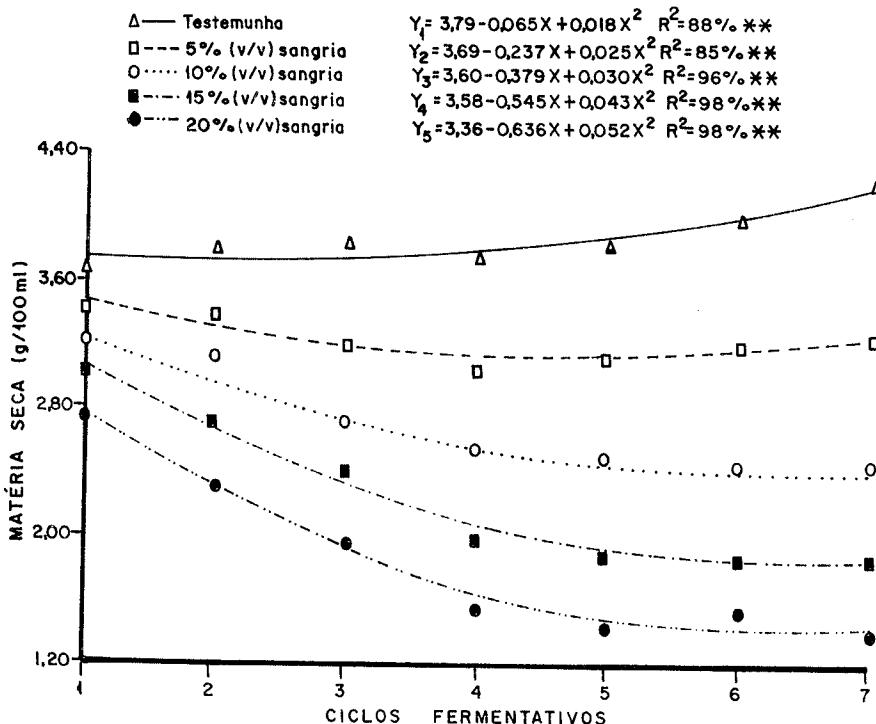


FIGURA 1 - Matéria seca (g/100 ml) em função dos diferentes níveis de sangria de células para levedura de panificação Fleischmann em mosto xarope a 30°C.

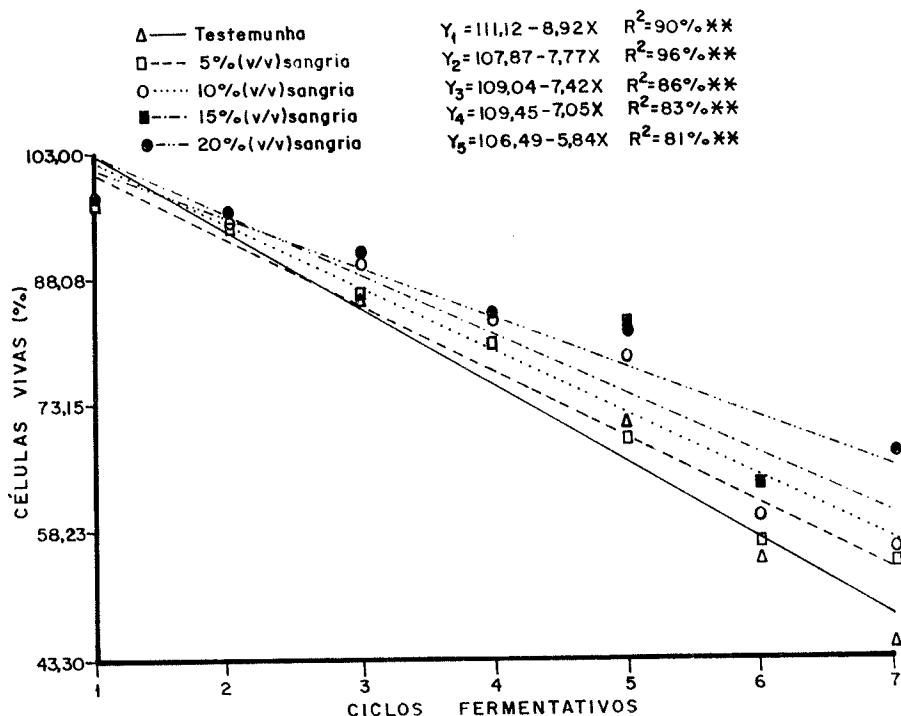


FIGURA 2 - Viabilidade celular (%) em função dos diferentes níveis de sangria de células para levedura de panificação Fleischmann em mosto de xarope a 30° C.

Em escala de laboratório, a aplicação da sangria no final do ciclo fermentativo causou uma diminuição significativa da concentração celular. Desse modo a competição do microrganismo pelos nutrientes e o efeito de inibição pelo produto tornaram-se menores favorecendo a multiplicação e consequentemente a viabilidade celular, resultados esses concordantes com os encontrados na literatura (7). Essa condição aumentou também a disponibilidade de oxigênio dissolvido no meio, o qual em quantidades traço favorece o aumento da viabilidade celular e a produtividade de etanol (19).

Portanto, a remoção de células do processo favoreceu a multiplicação e consequentemente a viabilidade celular coincidindo com observações feitas em unidades industriais brasileiras, onde uma perda elevada de levedura no vinho centrifugado resulta em alta viabilidade celular no processo.

Rendimento de fermentação - Os resultados apresentados na Figura 3 demonstram que os rendimentos das fermentações diminuíram com aplicação de 5% a 20% (v/v) de sangria quando comparados a testemunha. Entretanto, as diferenças de rendimento

obtidas entre as sangrias de 15% e 10%, e entre 15% e 20% (v/v) não foram significativas. Ciclo a ciclo, verificou-se uma tendência de diminuição no rendimento, em todos os níveis de sangria.

O tempo de fermentação variou igualmente para testemunha e sangria de 5% (v/v) (21 a 22 horas), porém foi maior para as sangrias de 10% e 15% (v/v) (21 a 28 horas) e 20% (v/v) (21 a 43 horas). Verificou-se que o tempo de fermentação foi igual a 21 horas até o ciclo 4 em todos os tratamentos. A partir deste ciclo observou-se uma diminuição significativa no teor de matéria seca e aumento da viabilidade celular para as sangrias de 10%, 15% e 20% (v/v). O tempo de fermentação aumentou com o aumento correspondente de remoção de células, confirmando observações feitas por outros autores (11).

Considerando que com 5% (v/v) de sangria já ocorreu diminuição da matéria seca, estímulo para multiplicação e consequentemente aumento da viabilidade celular, pode-se concluir que a diminuição no rendimento está diretamente relacionada com o uso de ART para a produção de massa celular em detrimento da produção de álcool.

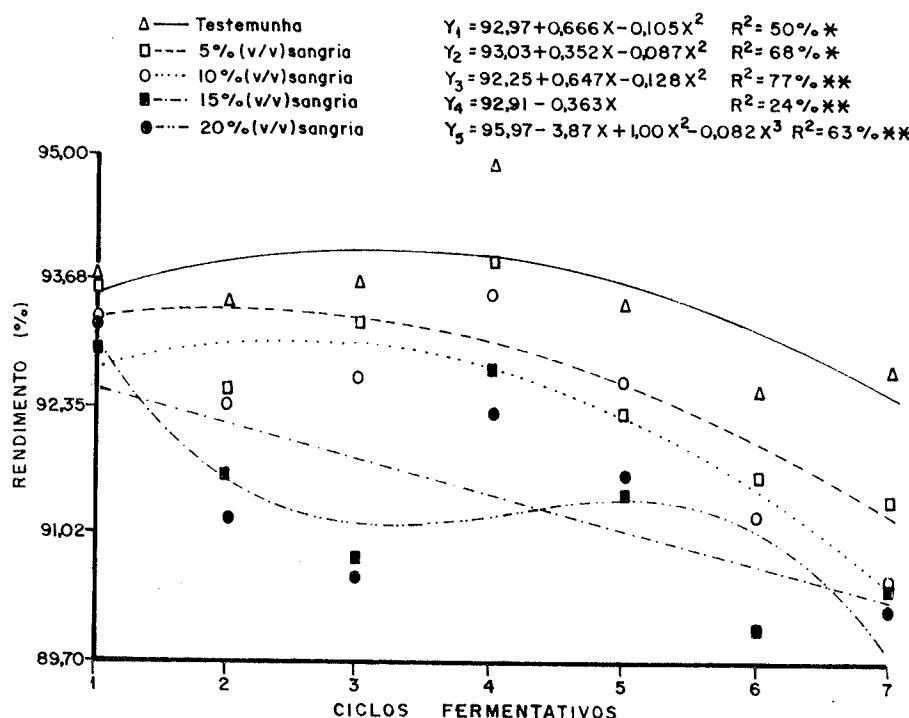


FIGURA 3 - Rendimento de fermentação (%) em função dos diferentes níveis de sangria de células para levedura de panificação Fleischmann em mosto de xarope a 30°C.

2. Efeito da sangria de levedura sobre a fermentação alcoólica em mosto de melaço a 33°C.

Matéria seca - A remoção de 5% a 20% (v/v) de células do processo provocou uma diminuição no teor de matéria seca em todos os níveis de sangria. A massa celular diminuiu proporcionalmente ao nível de sangria aplicado.

As curvas apresentadas na Figura 4 mostram o comportamento da matéria seca, ciclo a ciclo, para todos os tratamentos. O teor de matéria seca da testemunha aumentou com os ciclos. Verificou-se recuperação do fermento para as sangrias de 5% e 10% (v/v), o que não foi observado para 15% e 20% (v/v) por tratar-se de níveis de sangria mais drásticos para os quais é necessário uma multiplicação celular mais intensa para repor o fermento retirado do processo.

Com a utilização de melaço o teor de matéria seca não decresceu nos ciclos sucessivos como o fez em xarope, o que pode ser explicado pela presença de maior quantidade de sais e outros componentes para a multiplicação das células presentes no primeiro substrato. Com cerca de 675 ppm de N to-

tal e 103 ppm de P total, o mosto de melaço constituiu-se em meio mais adequado às fermentações.

Embora 30°C seja a temperatura mais indicada (20,10) obteve-se maior rendimento em células a 33°C como consequência da utilização de um substrato mais rico em nutrientes.

Viabilidade celular - Os resultados apresentados na Figura 5 demonstram que a remoção de 5% a 20% (v/v) de células aumentou a viabilidade celular em relação à testemunha. Entretanto as sangrias de 5% e 10%, 10% e 15%, 15% e 20% (v/v) não apresentaram diferenças significativas entre si.

Uma análise da viabilidade celular ciclo a ciclo demonstrou um decréscimo da mesma durante os 7 ciclos, em todos os níveis de sangria. Nesse experimento (melaço, 33°C) não ocorreu attenuação da queda da viabilidade entre os ciclos correspondente ao aumento do nível de sangria aplicado, comportamento este semelhante ao obtido em mosto de xarope a 33°C (4). Esse fato deveu-se provavelmente à temperatura de 33°C que favoreceu uma multiplicação mais intensa, porém mais rápida com consequente aumento na taxa de morte

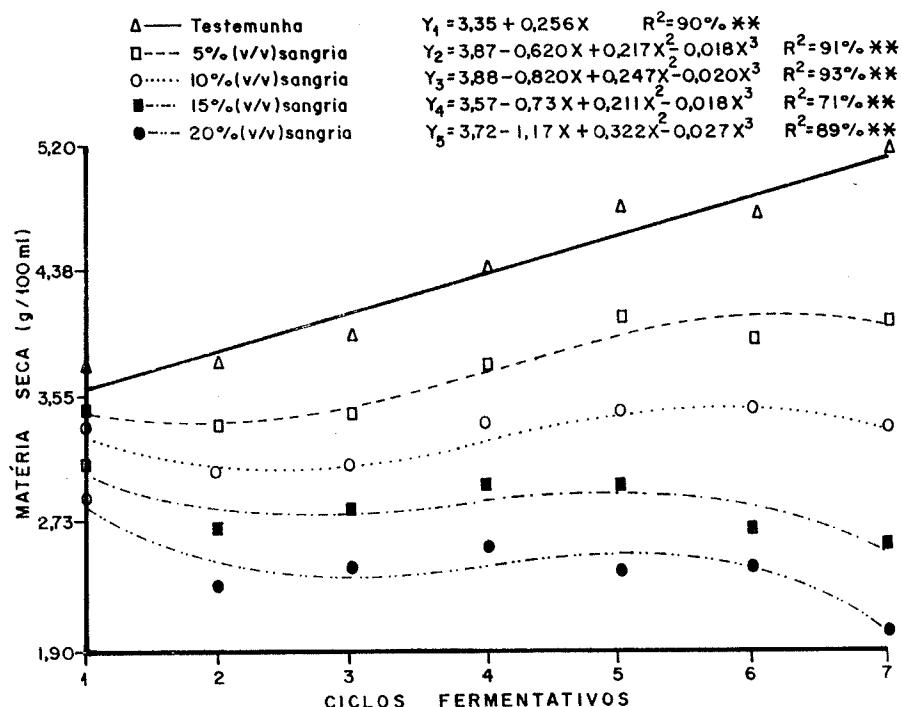


FIGURA 4 - Matéria seca (g/100 ml) em função dos diferentes níveis de sangria de células para levedura dse panificação Fleischmann em mosto melaço a 33° C.

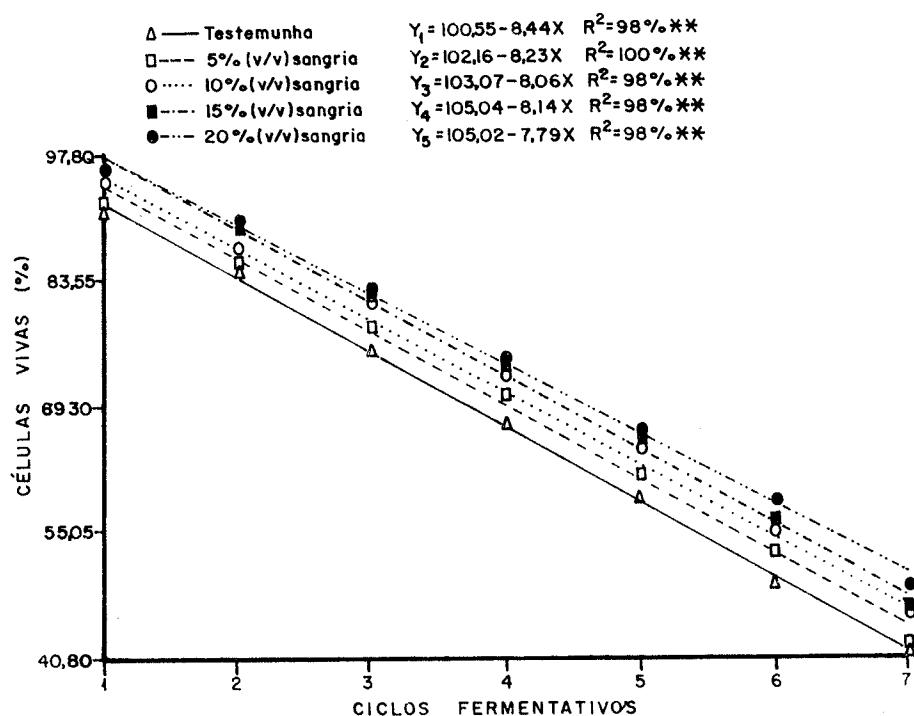


FIGURA 5 - Viabilidade celular (%) em função dos diferentes níveis de sangria de células para levedura de panificação Fleischmann em mosto de melaço a 33° C.

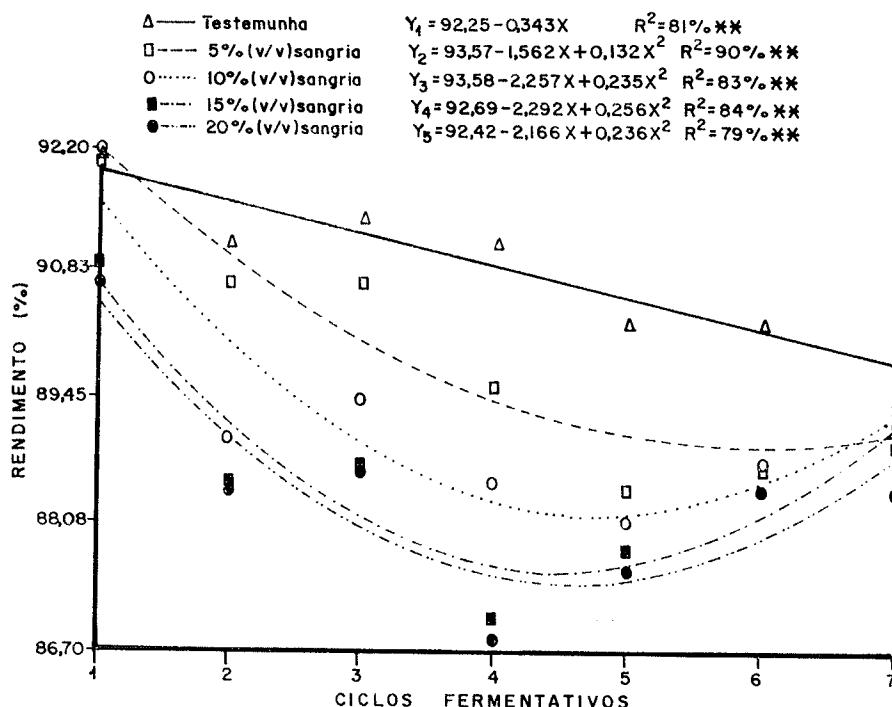


FIGURA 6 - Rendimento de fermentação (%) em função dos diferentes níveis de sangria de células para levedura de panificação Fleischmann em mosto de melão a 33°C.

das células o que mascarou o efeito positivo da sangria sobre a viabilidade no decorrer dos ciclos.

Rendimento de fermentação - Os resultados apresentados na Figura 6 demonstram que o rendimento da fermentação diminuiu em consequência da aplicação de 5% a 20% (v/v) de sangria. A queda no rendimento foi proporcional ao nível de sangria, exceto para 15% e 20% (v/v) cujos rendimentos não diferiram significativamente entre si.

A análise das curvas às quais os dados melhor se ajustaram demonstram que a testemunha apresentou um decréscimo pouco acentuado durante os 7 ciclos fermentativos. Com as sangrias 5%, 10%, 15% e 20% (v/v) observou-se que o rendimento decresceu até o ciclo 5 com tendência a recuperar-se nos ciclos 6 e 7. Ciclos posteriores ao ciclo 7 provavelmente mostrariam mais claramente o comportamento do rendimento neste experimento.

Os tempos de fermentação foram constantes e iguais a 20 horas em todos os ciclos e em todos os níveis de sangria, fato este que corroborou com as observações feitas com relação a recuperação da massa celular.

A aplicação de sangria aliada ao aumento da temperatura da fermentação e utilização de um meio mais rico em nutrientes provocou uma multiplicação mais intensa e consequentemente um gasto maior de ART para a manutenção da concentração celular. Em escala de laboratório, a remoção de 5% (v/v) de células sob ambas as condições já foi suficiente para diminuir o rendimento da fermentação.

SUMMARY

Effect of the cells removal on the yield of alcoholic fermentation by yeast

Due to the high value of protein and vitamin from yeasts it is interesting for the alcohol industries in Brazil producing that kind of microorganism, as a by-product of alcoholic fermentation, to use it as animal feeding. Although the utilization of such by-product for cattle feed preparation is accepted, the practice of yeast cell removal (bleeding) from the fermentation process is a subject of controversy. The present work was undertaken to study the effect of yeast cell removal on the yield

of alcoholic fermentation in laboratory scale. The experiments were performed with baker's yeast Fleischmann (*Saccharomyces cerevisiae*) in sugar cane syrup diluted to 150g/l of total reducing sugars at 30°C and in molasses diluted to 152 g/l of total reducing sugars at 33°C. The worts had the pH adjusted to 3,6 with H₂SO₄ and were sterilized at 120°C/1 atm for 20 minutes.

From a water suspension of known yeast cells content, 10 ml (about 3,46 g of dry matter) were transferred to graduated fermentation tubes of 45 mm x 170 mm. Cells were separated by centrifugation at 1900 rpm (686 x g) for 20 minutes and the volume made up to about 19 ml with sterilized water. The wort was added in four parts of 20 ml at intervals of two hours. The alcohol evaporated from the fermentation was collected for further yield calculations. At the end of fermentation, characterized by no gas carbonic liberation, a sample was withdrawn for cell viability determination (staining with methylene blue). The volume was made up to 100 ml with distilled water. The suspension was centrifuged and the alcohol, reducing sugar content and pH were determined in the supernatant (fermented wort). The alcohol content was determined by distillation of samples using a Kjeldahl microdistillator and measuring the distillate density with a digital densimeter. Reducing sugars were estimated by Somogyi & Nelson method. The pH was measured in Orion Research model 601 pH meter. The yeast cells were washed with acidic distilled water (pH 2,5 with H₂SO₄) and the volume made up to 100ml. From this suspension it was removed 1 ml for dry matter determination and 5, 10, 15 e 20 ml equivalents to 5, 10, 15 e 20% (v/v) of cells. A correlation was established between the optical density (660 nm) of a cell suspension and the dry matter content. The cells suspension was again centrifuged (686 x g) for 20 minutes and their volume completed to about 19 ml with sterilized water starting another fermentation cycle. The same procedure was repeated for seven cycles.

The results were statistically analysed using the "split-plot" statistical design in randomised blocks and the following considerations can be presented:

a) The removal of 5 a 20% (v/v) of cells promoted a decrease in the content of dry matter, proportional to the removed amounts in both tested conditions.

b) Cells viability increased with the increase in cell removal in both treatments. In wort of syrup at 30°C the viability increase was significative on the 7th cycle for 5% (v/v) bleeding and on 5 th, 6th and 7th cycles for 10,15 and 20% (v/v) bleed-

ings. In wort of molasses at 33°C, there were no significative variation for 5 and 10, 10 and 15, 15 and 20% (v/v) of cells removal.

c) The application of 5 to 20% (v/v) bleedings decreased fermentation yields carried out in worts from syrup and molasses. Yields related to 5 and 10, 15 and 20% (v/v) bleedings were not different when fermentation was carried out in wort from syrup at 30°C. The same effect was observed between 15 and 20% (v/v) bleedings when fermentation was carried out in wort from molasses at 33°C.

Key words: alcoholic fermentation, yeast cell removal, bleeding.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amorim, H.V.; Zago, E.A. & Oliveira, A.J. Novos métodos para o controle da fermentação alcoólica. São Paulo, SBM, 1982.
2. Amorim, H.V.; Oliveira, A.J. & Zago, E.A. Fermentação descontínua: otimização do processo de Melle-Boinot. In: Semana da fermentação alcoólica, "Jayme Rocha de Almeida", 4. Anais. Piracicaba, 1985.
3. Catani, R.A. & Jacintho, A.O. Avaliação da fertilidade do solo. Métodos de análises. Piracicaba, Livroceres, 1974.
4. De Martin, V.F. Efeito da remoção de células sobre o rendimento da fermentação alcoólica por leveduras. Piracicaba, 1987. (Mestrado-ESALQ/USP).
5. Desmonts, R. Tecnologia da produção dos fermentos seco de desilíaria. *Boletim Informativo da APM*, Piracicaba, 8: 1-11, 1966.
6. Germek, H.A Uso de dormas fechadas com recuperação de álcool e produção de proteína. *Álcool & Açúcar*, 5(27): 48-51, 1986.
7. Goma, G. & Duran, G. Behaviour of high cell density culture. In: International Biotechnology Symposium. 8, Proceedings, Paris, 1988.
8. Gomes, F.P. Curso de estatística experimental. 11 ed. Piracicaba, Nobel, 1985.
9. Jones, R.P.; Pamment, N. & Greenfield, P.F. Alcohol fermentation by yeast - the effect of environmental and other variables. *Process Biochem.*, 16: 42-49, 1981.
10. Merrit, N.R. The influence of temperature on some properties of yeast. *J. Inst. Brew.*, 72: 374-383, 1966.
11. Nagodawithana, T.W. & Steinraus, K.H. Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in "rapid fermentation". *Appl. Environ. Microbiol.*, 31(2): 158-162, 1976.
12. Nielsen, N. Untersuchungen über den Gehalt der Bierwürze an durch hefe assimilerbarem Stickstoff. *Carlsberg Lab. Ser. physiol.*, 21: 113-138. 1935.
13. Pelczar, M., Reid, R. & Chan, E.C.S. Microbiologia, vol. 1, São Paulo, Mc Graw-Hill, 1981.
14. Pierce, J.S. Institute of Brewing: analysis committee measurement of yeast viability. *J. Inst. Brew.*, 76(5): 442-443, 1970.
15. Pinnotti, R.F. Aproveitamento da levedura de fermentação alcoólica para rações. In: Congresso Nacional da STAB, 3, e Convenção da ACTALAC, 5. Anais. São Paulo, 1984.

16. Sarruge, J.R. & Haag, H.P. Análise química em plantas. Piracicaba, ESALQ, 1974.
17. Stupiello, J.P. & Horii, J. Condução da fermentação alcoólica. *Saccharum*, 17: 43-46, 1981
18. Stupiello, J.P. & Horii, J. Fundo de dorma de fermentação: um fator de eficiência industrial. *Açúcar, Álcool e Subprodutos*, 1: 34-36, 1982
19. Tyagi, R.D. Participation of oxygen in ethanol fermentation. *Process Biochem.*, 19: 136-141, 1984.
20. White, J. & Munns, D.J. Influence of temperature on yeast growth and fermentation. *J. Inst. Brew.*, 57: 280-284, 1951.
21. Zago, E.A.; Amorim, H.V.; Basso, L.C.; Gutierrez, L.E. & Oliveira, A.J. Métodos analíticos para o controle da produção de álcool. CEBTEC/ESALQ-USP, 1989.

Recebido para publicação em 4/9/90.

FUNGAL SUCCESSION ON *OCOTEA PULCHELLA* (NEES) MEZ. LEAVES IN DECOMPOSITION ON "CERRADO" SOIL TREATED WITH VINASSE

Iracema Helena Schoenlein-Crusius¹
Sânia Maria Tauk²

SUMMARY

The effects of cumulative doses of vinasse treatment in "cerrado" soil on the fungal succession on *Ocotea pulchella* leaves during its decomposition process, were observed on four plots, randomly delimited in a "cerrado" reserve in the municipality of Corumbataí, São Paulo State, where since 1981, 20 $\ell \cdot m^{-2} \cdot y^{-1}$ of vinasse has been added to the soil of two plots and the other two ones maintained as controls. After 1984 this dose was then increased to 50 $\ell \cdot m^{-2} \cdot y^{-1}$. Thirty six litter-bags (10 x 20 cm and 1 mm mesh diameter) each containing 100 dry *Ocotea pulchella* leaves were placed in the plots at the beginning of each period of time.

The experiments were conducted in two periods: from June 1984 to June 1985 and from July 1985 to June 1986. Three litter-bags were taken monthly from each plots. Fungi were isolated by the leaf disks washing technique and plated on Martin media, cellulose agar media and starch agar media. *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* and *Fusarium* were the most frequent during the succession.

The fungal successions were similar during the experiments. It was not possible to detected any effect of the vinasse treatment on the fungal succession on *Ocotea pulchella* leaves, in terms of fungal diversity.

Key Words: *Ocotea pulchella*, fungal succession, vinasse treatment.

INTRODUCTION

Vinasse is a hot liquid waste (75-80°C), resulting from the distillation of alcohol. Its volume has been increased each year in response to the Brazilian alcohol production. Because of its nutrient and organic matter content, vinasse has been added to the soil as fertilizer (1, 4). An extensive review about several kinds of vinasse, chemical compositions and results of the treatment of the "cerrado" soil with vinasse was given in literature (18, 19, 20). Cumulative vinasse treatments in the "cerrado" soil increased levels of phosphorus, potassium, calcium, manganese, hydrogen, organic matter, pH and decreased aluminium and changed

the quantity and diversity of microorganisms (20). From these results, it was concluded that the incorporation of this waste into the nutrient deficient "cerrado" soil would affect the equilibrium of the ecosystem by modifying the soil conditions drastically, probably affecting the nutrient cycles and the soil microbiota.

In a first experiment, *Ocotea pulchella* green leaves were placed in a vinasse treated soil, resulting in a decomposition rate decrease over six months (Casagrande and others, personal communication).

After these results other investigations were taken by Schoenlein-Crusius (not published) on the actual effects of the vinasse treatment on soil

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

2. Centro de Estudos Ambientais e Departamento de Ecologia, UNESP, Caixa Postal 178, 13500 Rio Claro, São Paulo, Brasil.

to observe the decomposition rate, nutrient levels and microorganisms of *Ocotea pulchella* leaves in different periods of times and after 24 months the results were similar to the ones of the first experiment.

The effect of the soil treatment has been evaluated upon the leaf mycota, because the importance of the fungi in the litter decomposition is well known in literature (8,13). Another reason has been the recovering of the "cerrado" soil microbiota of its original characteristics, except by the fungi (19).

The aim of these experiments was to observe the effects of vinasse on the fungal succession on *Ocotea pulchella* leaves, evaluating the extension of the nutrient and microbiological modification of the soil and the decomposition on the diversity of the leaf mycota.

MATERIAL AND METHODS

The study site was a "cerrado", a kind of Brazilian savannah, located in a reserve which is located in the Municipality of Corumbataí, SP, 180 km far from São Paulo city. The climatic conditions in this region comprises two well-defined seasons: a rainy, from October to March and a dry one, from April to September (18).

Four plots of the "cerrado" soil were delimited in 1981, being two of them treated once with 20.1. m⁻², of vinasse in June of each year and two maintained as controls. Since 1984 this quantity was increased to 50.1.m⁻², to be similar to that usually applied in sugarcane crops. Vinasse was applied manually by plastic hoses on the soil with the litter. The vinasse contained about 0.33 kg/m of N, 0.12 kg/m of P₂O₅, 3.84 Kg/m of K₂O, 1.05 kg/m of MgO, 21.65% of organic matter and pH 4.15. This experiment was carried out at two different periods, the first from June/ 1984 to July/ 1985 and the second one, from July/ 1985 to June/ 1986.

Ocotea pulchella was chosen for the experiments because its great frequency in the reserve. Green leaves were collected at the same height on the trees and brought to the laboratory in plastic bags. Leaves of the same size were chosen and maintained for about two weeks at room temperature to dry, instead of the usual stove drying, to avoid the eventual elimination of the leaf mycota. Other samples of green leaves were taken before abscission aiming the isolation of fungi present in the substrate by the same methods mentioned above.

One hundred and forty four litter bags (10 x 20 cm and 1 mm mesh) were filled with 100 previous weighed leaves, closed with metal clamps and randomly placed on the soil surface of the plots.

Half of hem were disposed on the plots with the soil treated with vinasse and the other half was disposed on the control sites, so that there were 36 litter bags on each plot at each period of the experiment. The litter bags were fastened with a nylon thread to avoid losses. Monthly, three litter bags were collected from each site for fungal isolations.

The fungi were isolated by the leaf disks washing method (14). Three different culture media were employed: starch agar media, cellulose agar media and the Martin media used by other authors (20) for eventual further comparisons. Moist chambers were also used. Forty leaf disks were incubated at room temperature during a week.

The isolated fungi were identified to genera level, with keys for Hyphomycetes, Deuteromycetes and Zygomycetes (2, 3, 15). Isolations on potato dextrose agar media and exposure of colonies under ultra violet light were employed to induce sporulation of some fungi.

RESULTS AND DISCUSSION

In the first period of the experiment, 17 genera belonging to Deuteromycetes, three to Ascomycetes, four to Zygomycetes and one to Myxomycetes were isolated (Figure 1). In the second period, 20 genera belonging to Deuteromycetes, three to Ascomycetes, five to Zygomycetes and one to Myxomycetes were isolated. There were also many fungi isolated belonging to Mycelia sterilia group. The majority of the genera belonged to Deuteromycetes, followed by Zygomycetes and Ascomycetes. These results are similar to the ones found by other workers (8, 21).

Aspergillus, *Penicillium*, *Fusarium* and specially *Trichoderma* were the most commonly isolated fungi many times observed in the succession.

It was not possible to quantify the colony number of the fungi because some genera as *Trichoderma*, *Penicillium* and *Aspergillus* grew faster than others. Beside this, fungivorous nematodes developed in the dishes, spreading spores through the media, turning difficult the counting.

The leaf disks washing method was used in this experiment because this techniques allows the isolation of the fungi present in the mesophyll of the leaves, eliminating propagules from the leaf surface. Because of the observed increase of the fungal community of the soil in response to vinasse treatment the elimination of opportunistic propagules was important to guarantee the observation of the effects of the waste incorporation into the soil on the fungi that actually were decomposing the leaf substrate. The same method was used in further studies to verify the effects of submergence of *Ficus microcarpa* (16) and *Quercus robur* leaves (17) and has been used to compare di-

ferences between aquatic and terrestrial leaf mycofauna in the Atlantic Rain Forest (Schoenlein-Crusius, personal communication) with satisfactory results.

Alternaria, Cladosporium, Neurospora, Chaetomium, Verticillium, Pestalotia, Paecilomyces, Cephalosporium, Trichoderma, Penicillium, Aspergillus, Fusarium, Mucor and *Absidia* occurred in the cerrado soil treated with vinasse and on the control sites, whereas *Trichothecium* was found just in the control plots in this study and in other one (19), whereas *Epicoccum, Drechslera, Nigrospora, Curvularia, Pithomyces, Beltrania, Cylindrocladium, Rhizomucor, Circinella, Humicola, Zygorrinchus, Diplococcum* and *Sepedonim* occurred just on *Ocotea pulchella* leaves disposed on soil treated with vinasse and on the control sites.

In November of 1984 there was a modification in the fungal succession by simultaneous presence of Zygomycetes genera, which decompose simple components such as starch. This results were also observed in *Nothofagus dombeyi* leaves (5). It is possible that the decomposition of complex compounds as cellulose and lignin resulted in simple sugar, available for Zygomycetes. Normally sugar fungi were considered pioneers in the leaf decomposition (6), but in Japanese forests (21), sugar maple leaf litter (9) and in *Nothofagus dombeyi* leaves (5) they were considered colonizers of the final stages of the leaf decomposition.

In leaf litter of moist tropical forest, three kinds of decomposing fungi were classified: green leaves colonizers, that includes phylloplane inhabitants and leaf inhabiting fungi, pioneer fungi and those that colonizes the substrate in the final stages of the decomposition (10). Following this criteria we divided the isolated fungi in *Ocotea pulchella* leaves (Table 1).

The distribution of the genera during the fungal succession presented differences from one period to another for instance, there were more "pioneers" in the first period than in the second variations. Probably high moisture and temperature conditions in December/ 1984 and January/ 1985 caused a decrease in fungi isolations, except for *Trichoderma* and *Fusarium*, that developed faster than others. It is possible that excessive moisture decreased the population of some aerobic fungi such as *Penicillium* and *Aspergillus* (12), although the importance of the high temperature and moisture content of the leaves as essential parameter of the fungal colonization. In the second period of the experiment these decreases of the fungal populations in response to climatic conditions were not so marked (Figure 1). These results showed the great importance of the climatic and sazonality conditions, often cited in literature (9, 11, 21).

The aim of the use of three different culture media for the fungal isolation was to allow the de-

TABLE 1 - Fungal distribution in function of the succession in *Ocotea pulchella* leaves placed on the "cerrado" soil treated with vinasse and in the control sites located in the municipality of Corumbataí, SP.

First Period of time (June of 1984 to June of 1985)		
1. autochthonic fungi	2. invaders	3. final decomposers
<i>Epicoccum</i>	<i>Neurospora</i>	<i>Humicola</i>
<i>Drechslera</i>	<i>Curvularia</i>	<i>Mucor</i>
<i>Nigrospora</i>	<i>Pithomyces</i>	<i>Absidia</i>
<i>Cladosporium</i>	<i>Verticillium</i>	<i>Rhizopus</i>
<i>Alternaria</i>	<i>Pestalotia</i>	<i>Zygorrinchus</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>Paecilomyces</i>	
<i>Penicillium</i>	<i>Beltrania</i>	
<i>Fusarium</i>	<i>Cephalosporium</i>	
<i>Trichoderma</i>	<i>Cylindrocladium</i>	
<i>Mycelia sterilia</i>		

Second Period of time (June of 1985 to June of 1986)		
1. Autochthonic fungi	2. Invaders	3. Final decomposers
<i>Epicoccum</i>	<i>Trichothecium</i>	<i>Cephalosporium</i>
<i>Drechslera</i>	<i>Nigrospora</i>	<i>Humicola</i>
<i>Curvularia</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Absidia</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>Neurospora</i>	<i>Rhizopus</i>
<i>Penicillium</i>	<i>Curvularia</i>	<i>Zygorrinchus</i>
<i>Fusarium</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Rhizomucor</i>
<i>Trichoderma</i>	<i>Chaetomium</i>	<i>Diplococcum</i>
	<i>Pithomyces</i>	<i>Sepedonim</i>
	<i>Verticillium</i>	
	<i>Pestalotia</i>	
	<i>Paecilomyces</i>	
	<i>Beltrania</i>	
	<i>Mycelia sterilia</i>	

1. Autochthonic fungi: fungi present in the green leaves, isolated even after months of decomposition.
2. Invaders: fungi from the environment or a dormant stage in the leaf substrate.
3. Final decomposers: fungi isolated at the end of the decomposition.

velopment of a great diversity of fungi in function of the nutrient requires of each group. Although the colonies were not quantified, it was possible to verify that the isolated colonies developed practically in a same way in all culture media employed. It is important to consider that many of the isolated fungi in this experiment are considered cosmopolitans, with low nutricional exigencies. The Martin media was considered the best for the fungal isolations because the colonies grew concentrated on the petri dishes, making easier the preparing of microscopic slides and isolations for the purifications of the fungi. The capacity of this method to improve the development of poor sporulating fungi (7) was also a reason to employ this technique. Moist chambers were not efficient to isolate cellulitic, because of the great incidence of nematodes and *Trichoderma*.

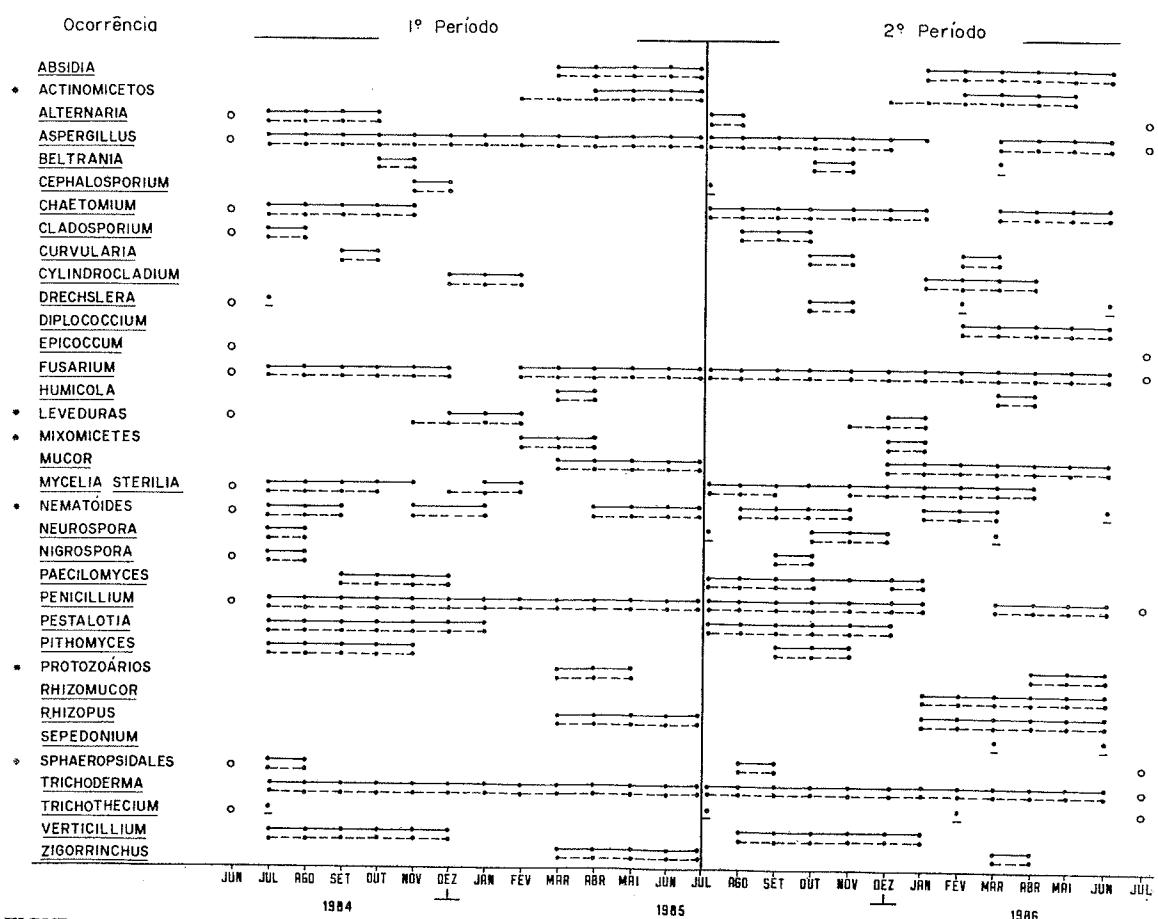


FIGURA 1 - Fungi isolated on newly fallen *Ocotea pulchella* leaves (o), in decomposition in "cerrado" soil treated with vassasse (—) and in decomposition on the control parcels (---) in Corumbataí municipality, São Paulo, Brasil.

The mycota of the leaves placed on the vassasse treated soil was very similar to the one isolated from leaves placed on the control parcels (Figure 1).

It was not possible to observe any effect of the soil treatment on the fungal succession on the leaves. This results were not expected because in the same plots, samples of *Ocotea pulchella* leaves decomposed more slowly in the "cerrado" soil treated with vassasse than the ones disposed on the control sites (Schoenlein-Crusius, personal communication). Beside this, the soil mycota was increased significantly by the vassasse treatment during the same periods of time studied (19). Considering the fact that many typical soil fungi occurred during the succession it was expected to find qualitative and quantitative differences between the mycota of the leaves placed in the vassasse treated soil and those placed in the control parcels, but it is important to consider that in this experiments could not be counted and were identified to genera level. Intraspecific interactions between the isolated taxa could this way not be verified.

The mycota occurring in the early stages of the leaf decomposition was isolated frequently over a long period in the present experiment (Figure 1). It seems possible that this mycota was very well adapted to the leaf tissue and avoided the invasion by typical soil fungi, until the effects of the vassasse addition on the soil mycota were no more detected.

It was not possible to detect the effects of vassasse treated soil upon the fungal succession on *Ocotea pulchella* leaves, despite the effects on the rate, nutrient levels and correlations reported elsewhere.

RESUMO

Successão fúngica em folhas de *Ocotea pulchella* (Nees) Mez colocadas sobre o solo sob cerrado, tratado com vinhaça.

Estudaram-se os efeitos da adição de doses cumulativas de vinhaça em solo sob vegetação de

cerrado na sucessão fúngica em folhas de *Ocotea pulchella* durante o processo de decomposição, de quatro parcelas delimitadas ao acaso, em uma reserva de cerrado situada no município de Corumbataí, SP. Ao solo de duas parcelas, 20 l. m⁻². ano de vinhaça têm sido aplicados desde 1981, sendo que aquelas remanescentes foram mantidas como testemunhas. Após 1984 as doses foram aumentadas para 50 l. m⁻². ano. Trinta e seis sacos de tela de "nylon" (10 x 20 cm com diâmetro de malha de 1 mm), cada unidade contendo 100 folhas secas de *Ocotea pulchella* foram dispostos em junho de 1984 sobre o solo de cada parcela. Esta técnica foi aplicada novamente para o segundo período de estudo, isto é, junho de 1985. O primeiro período correspondeu entre junho de 1984 a junho de 1985 e o segundo, de julho de 1985 a junho de 1986. Mensalmente foram coletados três sacos de tela de "nylon" de cada parcela de cada tratamento, solo com ou sem vinhaça.

Os fungos foram isolados por meio da técnica de lavagem de discos de folhas em água destilada esterilizada com plaqueamento em meio de Martin, meio de celulose-ágar e meio de amido. *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium* foram os fungos mais frequente durante a sucessão.

As sucessões fúngicas foram semelhantes durante os dois períodos do experimento. Não foi detectado o efeito do tratamento do solo com a vinhaça sobre a sucessão fúngica nas folhas de *Ocotea pulchella* em termos de diversidade dos fungos.

Palavras-chave: *Ocotea pulchella*, sucessão fúngica, tratamento com vinhaça.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to express their gratitude to FAPESP and FINEP for the financial support and to Dr. Aladair Burman for improving the English.

REFERENCES

- Almeida, J. R.- O problema da vinhaça em São Paulo. Boletim do Instituto Zimotécnico. (ESALQ), Piracicaba, 1955, 23p.
- Barnett, H. L. & Hunter, B. B. - Illustrated genera of Imperfect Fungi. 3th. ed. Minnesota, Burgess Publishing Company, 1972.
- Barron, G. L.- The genera of Hyphomycetes from soil. Baltimore, Robert Krieger, 1968.
- Cambium, F. A. & Cordeiro, D. A. - Ação da vinhaça sobre pH, acidez total, acumulação e lixiviação de nutrientes em solo arenoso. *STAB*, Piracicaba, 4: 27-33, 1986.
- Gamundi, I. J.; Arambarri, A. M. & Spinedi, H. A.- Sucessión fúngica en la hojarasca de *Nothofagus dombeyi*. Extracto de la Revista del Museo de la Plata (Nueva Serie), Sección Botánica, Tomo XIV, p.89-116, 1987.
- Garrett, S. D.- Soil fungi and fertility. Pergamon Press, 1962, 165p.
- Grandi, R. A. P. Hifomicetos do solo no cerrado da Reserva Biológica de Moji-Guaçu (São Paulo-Brasil) e triagem da ação amiolítica, celulolítica e proteolítica. São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1984, 114p. (Master's Degree Work).
- Hogg, B. M. & Hudson, H. J.- Microfungi on leaves of *Fagus sylvatica* L. The micro-fungal succession. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 49: 185-192, 1966.
- Kuter, G. A. - Microfungal populations associated with the decomposition of sugar maple leaf litter. *Mycologia*, 78: 114-126, 1986.
- Maia, L. C. Sucessão de fungos em folhado de floresta tropical úmida. Recife, Universidade Federal de Pernambuco, 1983, 198p. (Master's Degree Work).
- Park, D.- Phytoplano fungi: tolerance of hyphal tips to drying. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 78: 114-126, 1982.
- Pugh, G. T. F.- Leaf litter fungi found on *Carex paniculata* L. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 41: 185-195, 1958.
- Pugh, G. T. F.- Terrestrial Fungi. In: Dickinson, C. H. & Pugh, G. T. F. Biology of plant litter decomposition. Academic Press London, 1974, 175p.v.2.
- Pugh, G. J. F.; Buckey, N. G.; & Mulder, J. - The role of phytoplano fungi in the early colonization of leaves. *Symp. Biol. Hung.*, 11: 329-333, 1972.
- Schipper, M. A. A. - On certain species of *Mucor* with a key to all accepted species.2. On the genera *Rhizomucor* and *Parasitella*. *Series of Mycology*, 17: 53-65, 1978.
- Schoenlein-Crusius, I. H. & Milanez, A. I. Sucessão fúngica em folhas de *Ficus microcarpa* L. f. submersas no lago frontal situado no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. *Rev. Microbiol.*, 20: 95-101, 1989.
- Schoenlein-Crusius, I. H.; Pires-Zottarelli, C. L. & Milanez, A. I. Sucessão fúngica em folhas de *Quercus robur* L. (carvalho) submersas em um lago situado no município de Itapeceira da Serra, SP. *Rev. Microbiol.*, 21: 61-67, 1990.
- Tauk, S. M. Atividade enzimática em solo de cerrado tratado com vinhaça, município de Corumbataí, SP. *Revta. bras. Bot.*, 13: 39-47, 1990.
- Tauk, S. M. Effects of cumulative doses of vinasse on soil microorganisms in cerrado. *Pedobiol.*, 34: 69-75, 1990.
- Tauk, S. M. & Ruegger, M. S. - Alguns aspectos da microbiota do solo sob vegetação de cerrado, tratado com vinhaça, no município de Corumbataí, SP. *Rev. Microbiol.*, 18: 67-76, 1987.
- Tubaki, K. & Yokoyama, F. - Successive flora on sterilized leaves in the litter of forests. II. IFO. *Res. Comm.*, 6: 18-26, 1973.

Received for publication in 30/04/90.

TRANSFORMATION OF PREGNENOLONE IN PROGESTERONE BY
RHODOCOCCUS RHODOCROUS.
INFLUENCE OF DIFFERENT CONDITIONS FOR BIOMASS
OBTAINMENT IN BIOCONVERSION.

Maria Isabel Sanz de Tosetti
Sonia Encarnación Blanco
Rodolfo Faustino Segovia

SUMMARY

Several conditions for *Rhodococcus rhodocrous* obtention were studied with the aim of using it as catalyst in the transformation of pregnenolone in progesterone, trying to minimize 1-dehydroprogesterone production. Harvest time, presence of pregnenolone as inductor and variations in the composition of the culture medium were analized. The microorganism was grown in a stirrer tank and in Erlenmeyers flasks with stainless steel baffles by using culture media of different composition. Bioconversion reaction of pregnenolone in progesterone was carried out in a system of two immiscible liquid phases with gas oil ($C_{14} - C_{19}$, 92% of paraffins) as solvent.

The products of bioconversion were determined by means TLC and Gas-liquid Chromatography. As regards harvest time, it was stated if it was performed in stationary phase, microorganisms with a lower Δ^1 -dehydrogenase activity were obtained. *Rhodococcus* grown in media with lactic acid (15%) and with corn step liquor (13,5% in lactic acid) showed a highly increased Δ^1 -dehydrogenase activity and were less apt for the conversion desired. On the other hand, the presence of substrate as inductor during cell growth did not favorably influence in yielding, since it enhances Δ^1 -dehydrogenase activity.

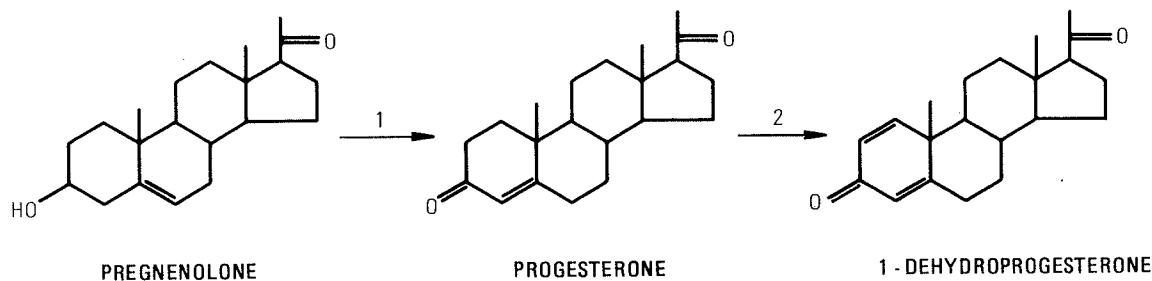
Key Words: Steroids; *Rhodococcus rhodocrous*; Steroid oxidase; Δ^1 -dehydrogenase

INTRODUCTION

In a bioconversion process mediated by whole microorganisms, different from those conducted by purified enzymes, it is important to consider biomass obtention conditions since the aptitude to perform transformations does not only depend on the increase of activity of an enzyme in particular, but also on the presence and regeneration capacity of cofactors. It also depends on the activity of other enzymatic systems hampering or favoring the conversion desired.

Unlike a conversion carried out by means of enzymes, the control of a conversion by whole microorganisms could be more difficult. However, the use of a complete cell is profitable because: it increases the stability of the enzymatic system (3); the enzyme involved in a conversion is not a unique one. For example, cholesterol oxidation implies the existence of the specific oxidase and also a system permitting to eliminate the other reaction product, hydrogen peroxide, that the complete cell makes through its peroxidases (1), and the regeneration of cofactors could be per-

Laboratório de Microbiologia Industrial, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis 5700 — San Luis, Argentina.

FIGURE 1 • Conversion sequence, 1: Steroid oxidase, 2: Δ^1 -dehydrogenase

formed *in situ*, by means of the enzymatic systems of the cell (7).

In this work the influence of conditions of growth and the composition of the environments in the capability of the *Rhodococcus rhodocrous* for transforming pregnenolone into progesterone are studied. Taking into account that there are generally two associated activities, steroid oxidase and Δ^1 -dehydrogenase (5), providing in this case progesterone and Δ^1 -dehydroprogesterone from pregnenolone (Fig. 1), conditions minimizing the Δ^1 -dehydrogenase activity were searched in order get a higher yielding in progesterone.

The studies carried out are part of a project for the manufacture of steroidal medicine from glycoalkaloids contained in the fruits of a regional bush.

MATERIALS AND METHODS

Reagents - Pregnenolone and progesterone standards were acquired in Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA, and YPF, Argentina, provided Gas-Oil (C_{14} - C_{19} , 92% in paraffines).

Microorganism - The microorganism chosen was *Rhodococcus rhodocrous* NCIB 10554. It was grown in media of different compositions (Table 1), the wet paste for conversion being obtained by centrifuging at 8000 rpm, for 15 min in a Sorvall SS centrifuge with GSA rotor and by subsequently washing the cells with phosphate buffer, pH 7,5; 0,05 mM.

Bioreactors - Microorganism growth was carried out in 500 and 1000 ml Erlenmeyer flasks with stainless steel baffles (UNSL, Argentina) and in an 18 litres stirrer tank (CETIN, Argentina). For bioconversion 500 ml Erlenmeyers flasks were used, similar to the ones mentioned above. They were

TABLE 1 - Culture media used for *Rhodococcus rhodocrous* growth

Components g/l	Medium N°			
	1	2	3	4
Glycerol	10.00	10.00	10.00	0.00
Lactic acid	0.00	0.00	5.00	15.00
Yeast extract	20.00	0.00	20.00	20.00
Corn steep liquor	0.00	40.00	0.00	0.00
$(NH_4)_2SO_4$	2.00	2.00	2.00	2.00
K_2HPO_4	2.00	2.00	2.00	2.00
$Mg SO_4 \cdot 7 H_2O$	0.10	0.10	0.10	0.10
$CaCl_2$	0.01	0.01	0.01	0.01
$FeSO_4$	0.01	0.01	0.01	0.01

(a): g/l

In all cases pH was adjusted to 6.7 with NaOH 2 N

agitated in a rotating shaker (2,5 cm eccentricity) placed in a stove with regulable temperature.

Bioconversion reaction - The bioconversion reaction was carried out by spreading 100 mg of pregnenolone in 50 ml of Gas oil by vigorous stirring in an homogenizer operating at 10.000 rpm for 15 min. Wet biomass (10 g, 70% humidity) was immediately added and the mixture was homogenized. The reaction time was 2 hours and temperature and shaking conditions were 30°C and 240 rpm, respectively.

Analytical procedures

Qualitative techniques - Thin layer chromatography (TLC). Samples were immediately subjected to centrifuging and the organic phase was analyzed by TLC on Silica Gel plates F₂₅₄. Pregnenolone and progesterone standards (2 mg / ml in gas oil) and ethyl ether - chloroform (9:1) as solvent were used. Samples and standards were deposited in volumes of 30 microlitres and after de-

veloping the chromatogram, the spots were seen first under short UV radiation and then, by using cobalt chloride in acid medium (8).

Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

- Δ^1 -dehydroprogesterone identification was carried out by NMR by previously separating the compound in a Silica gel column.

Quantitative procedures - Determination of reaction products. Quantification of reaction products was performed by exposing the samples to gas-liquid chromatography in a Hewlett Packard 5700 A Chromatografer equiped with a stainless steel column filled with OV-210 isothermically operated (255°C). After having obtained the chromatogram and in order to determine the percentage of by-product resulting from reaction (Δ^1 - dehydroprogesterone), areas were assessed by planimetry and the ratio progesterone- Δ^1 -dehydroprogesterone was calculated. In this case, solutions of pregnenolone and progesterone in diethyl ether (1mg/ml) were used.

Biomass determination - It was carried out by wet weight. Dry weight was calculated by using the data obtained in humidity determination performed by placing 1 g of wet paste on weighed filter paper

and by drying in a stove at 50°C to constant weight.

Determination of enzyme unities - Enzyme unities were done in the washed cells as follow: 16 micromoles of pregnenolone (0,08 M in methanol) were incubated with 0,1 ml of cell suspension (10% w/v in phosphate buffer pH 7,5; 0,05 mM), in a 5 ml final volume (phosphate buffer) for 10 min at 30°C. The reaction was stopped by adding threchloroacetic acid (15%) and after centrifuging, the product was recovered from sediment with 3 ml of absolute alcohol and alcoholic solution was read at 245 nm in a Shimadzu Double Beam UV 190 equipment.

RESULTS AND DISCUSSION

In order to determine the influence of the physiological state of the cells in the bioconversion reaction, microorganisms were grown in medium Nº1 and determinations of enzyme unities and bioconversion tests were performed at different stages of the development. Microorganisms grown in erlenmeyers as well as in stirrer tank showed polymorphism. In the initial stages of the growth, Gram positive coccoid forms were observed with subsequent appearance of typical forms with pseudomycelium formation and development of an intense pink pig-

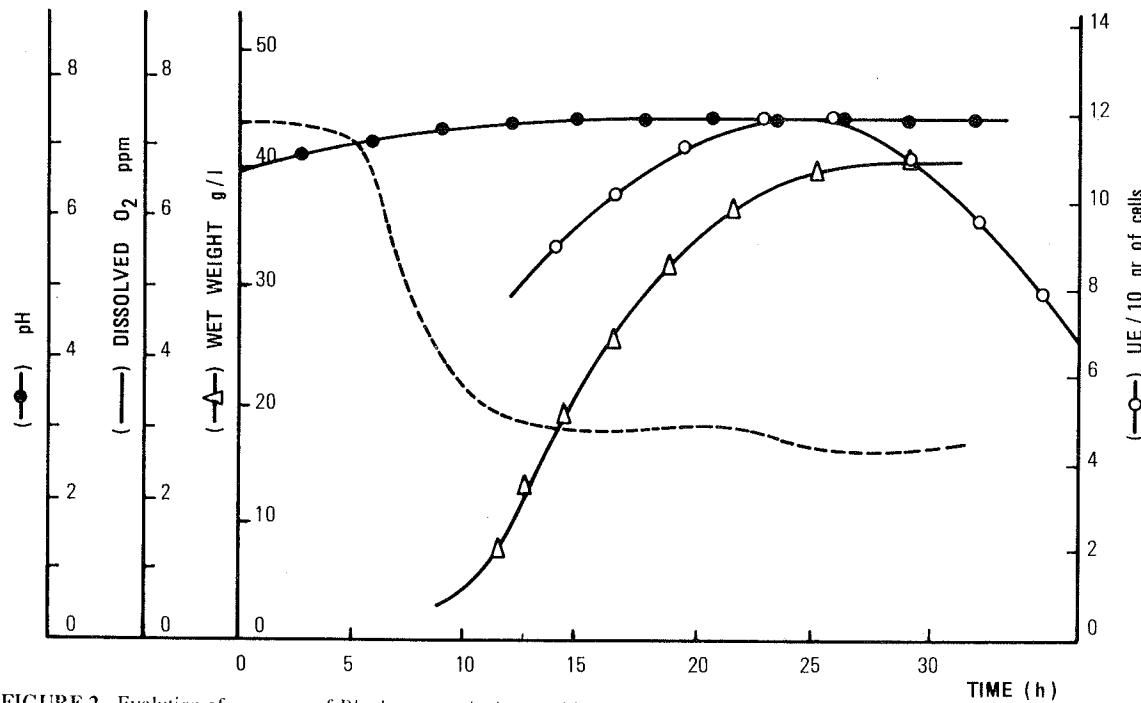


FIGURE 2 - Evolution of a process of *Rhodococcus rhodocrous* biomass obtainment

TABLE 2 - Influence of the physiological state of cells and of the presence of the inducer in bioconversion.

Harvest time	UE/10g of cells	Conversion %	Δ^1 -dehydro progesterone %
<i>Non induced cells</i>			
Beginning of growth	8.00	- (a)	-
End of growth	12.00	100	17
Stationary phase	7.00	98	9.5
<i>Induced cells</i>			
Beginning of growth	8.00	-	-
End of growth	12.6	-	-
Station phase	8.6	98	18

1 UE = micromole of progesterone produced at 30°C and pH 7.5, per minute
(a):no measurement

mentation at the end of the process. The evolution of a typical process is shown in Fig. 2. Enzyme unities decreased considerably at stationary phase, which coincides with what was studied for cholesterol oxidase (2). Results of bioconversion tests show dissimilar behavior of cells according to their physiological state (Table 2). It could be explained by the possible exhaustion of oxidized coenzyme, necessary for the action of dehydrogenase (6), due to oxygen limitation imposed by the system used. The activity for Δ^1 -dehydrogenation would be more sensitive to it. However, such behavior could also be explained because that enzymatic system is more unstable (6).

So as to induce the pregnenolone oxidation system, experiments were made by adding pregnenolone to the culture at beginning of the period of exponential growth until 0.4 g/l final concentration was reached. Enzyme unities were measured and bioconversion tests were performed with the induced cells. Results are shown in Table 2. It can be appreciated that under such experimental conditions Δ^1 -dehydrogenase activity enhances a fact which would affect the efficiency of the bioconversion wanted.

Considering the industrial application of the process studied and with the aim of lowering prices, changes were attempted in formulating the culture medium, by replacing yeast extract for corn step liquor (Medium N° 2, Table 1). Cells obtention tests were carried out in erlenmeyers with excellent performance as regards the biomass. There was also a tendency of microorganism to grow up in the form of clumps. Bioconversion tests with these cells were made similarly to those with cells obtained in media with yeast extract. The results were unexpected and are shown in Table 3. Their analy-

TABLE 3 - Influence of the composition of the culture medium in bioconversion

Medium N°	Conversion %	Δ^1 -dehydroprogesterone %
1	98	9.5
2	98	18.5
3	97	18.0
4	96	25.0

sis led to the following work hypothesis: if the microorganism used is capable of dehydrogenating progesterone more efficiently when it is grown in media with corn step liquor without adding an artificial acceptor of electrons (10), the corn step liquor would possibly either stimulate the appearance of some endogenous acceptor or facilitate its regeneration. The answer could be twofold: 1 - The wall of many bacteria has a special system for aminoacid and sugar transportation of which the dehydrogenase of L-Lactic is a part. 2 - The corn step liquor used is of high lactic content.

The experiment made to try out such hypothesis consisted in growing *Rhodococcus rhodocrous* in media with dl-Lactic acid and then, proving its capability of progesterone dehydrogenation. The media proven are in Table 1 and the results in Table 3. A possible explanation to these results could be the induction on the part of the lactate of Lactic-dehydrogenase which would provide a regeneration system of endogenous cofactor. This enzyme is one of those used in conversion systems with purified enzymes for cofactor regeneration (4,9).

As inferred from results shown, every fact favoring the regeneration of an oxidized cofactor or its storing, favors the appearance of by-product, Δ^1 -dehydroprogesterone. Thus, the presence of the lactate that would act in such a way, as well as the early harvest of the cells, when there is not oxygenation problem yet, produce not so adequate biomass for the process of pregnenolone oxidation with the aim of comertial progesterone obtainment. The same thing can be said of cell induction by pregnenolone since Δ^1 -dehydrogenase seems to be more sensitive to induction. However, these factors must be taken into account for transforming pregnenolone into Δ^1 -dehydroprogesterone or progesterone into its dehydrogenated derivate.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the National University of San Luis and CONICET (Consejo Na-

cional de Investigaciones Científicas y Técnicas) for financial support; to Mr. Juan Carlos Soloa for technical guidance and to Licenciada María Estela López and Prof. Dr. J. Ascar for linguistic advice.

RESUMO

Transformação de pregnenolona em progesterona por *Rhodococcus rhodocrous*. Influência das diferentes condições de obtenção de biomassa na bioconversão

Estudam-se as diferentes condições de obtenção de *Rhodococcus rhodocrous* para sua utilização na transformação de pregnenolona em progesterona, procurando minimizar a produção do Δ^1 -deidropregesterona.

Foram analisadas: 1) A influência do estado fisiológico das células na bioconversão, utilizando células coletadas em diferentes momentos. 2) A presença de pregnenolona como indutor. 3) As variações na composição do meio de cultura. O microorganismo foi cultivado em fermentador com agitação mecânica e em erlenmeyers de vidro com chicanas de aço inoxidável. A reação de conversão foi feita num sistema de duas fases líquidas inmiscíveis, utilizando parafina líquida (C_{14} - C_{19} , 92% em parafinas) como solvente. Os produtos da reação de bioconversão foram determinados por cromatografia em camada delgada e cromatografia gas-líquido. A biomassa obtida em meios de cultura com ácido lático (15%) e com líquido de macerado de milho, milhacina (com 13,5% em ácido lático mostrou uma atividade muito aumentada de Δ^1 -desidrogenase e foi pouco apta para a conversão desejada.

Tampouco foi favorável ao rendimento a presença de pregnenolona como indutor durante a proliferação das células, já que na reação de conversão em que utilizou-se estas células, ocorreu um aumento de 10% na quantidade do produto 1-deidrogenado.

Em relação ao momento da colheita determinou-se que a mesma deva ser feita na fase estacionária quando se obtém microorganismos com menor atividade de Δ^1 -desidrogenase que resulta mais adequada para a bioconversão de pregnenolona em progesterona.

REFERENCES

- Buckland, B.; Dunnill, P. & Lilly, M. - The enzymatic transformation of water insoluble reactants in non aqueous solvents. Conversion of cholesterol to cholest 4-ene 3 one by a *Nocardia* sp. *Biotech. Bioeng.*, 17: 815-826, 1975.
- Buckland, B.; Richmond, W.; Dunnill, P. & Lilly, M. - The large scale isolation of intracellular microbial enzymes. Cholesterol oxidase by *Nocardia*. - In: Spencer, B., ed. Industrial Aspects of Biochemistry - London, p. 65-77, 1974.
- Jones, J. B.; Sih, C. J. & Perlman, D. - Applications of Biochemical Systems in Organic Chemistry. - J. Wiley, New York, p. 57-66, 1976.
- Legoy, M.; Gelli, G.; Ergan, F.; Cocquempot, F.; Larreta Garde, V. & Thomas, D. - Immobilised multienzyme systems and organellas. - *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 32: 170-179, 1982.
- Levy, R. & Talalay, P. - Bacterial oxidation of steroids I: Ring A dehydrogenation by intact cells. - *J. Biol. Chem.*, 234: 2014-2021, 1959.
- Levy, R. & Talalay, P. - Bacterial oxidation of steroids II: Studies on enzymatic mechanism of Ring A dehydrogenations. - *J. Biol. Chem.*, 234: 2010-2014, 1959.
- Mosbach, K. - Use of immobilised cells with special emphasis on the formation of products formed by multistep enzymes systems and coenzymes. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 32:179-187, 1982.
- Pasich, B.; Kowalewski, Z. & Skibichi, J. - Spectrophotometric method of assay of solasodine in *Solanum laciniatum*. - *Dis. Pharm. Pharmacol.*, 22: 41-43, 1970.
- Rose, A. H. - Chemical Microbiology, Third edition. Plenum Press, New York, p. 214, 1979.
- Yamané, T.; Nakatani, H.; Sada, E.; Omata, T.; Tanaka, A. & Fukui, S. - Steroid bioconversion in water insoluble organic solvents. Δ^1 -dehydrogenation by free microbial cells and by cells entrapped in hidrophilic or lipophilic gels. - *Biotech. Bioeng.*, 21: 2133-2145, 1979.

Received for publication in 22/05/90

ISOLAMENTO DE *SALMONELLA DUBLIN* EM LEITE CRU, NA REGIÃO DE LONDRINA-PR., BRASIL

Jacinta Sanchez Pelayo¹
Halha Ostrenski Saridakis¹
Deise Passeto Falcão²

NOTA BREVE

RESUMO

Em 78 amostras de leite cru tipo C, coletadas de uma usina de beneficiamento, da região de Londrina, *Salmonella dublin* foi isolada a partir de uma das amostras. Provavelmente, trata-se do primeiro isolamento desse microrganismo, no Brasil, a partir do leite. Ao teste de sensibilidade, esta cepa mostrou-se resistente apenas à tetraciclina.

Palavras-chave: *Salmonella*, leite, laticínios, gastroenterite.

INTRODUÇÃO

A presença de salmonelas em produtos alimentícios representa grande problema à Saúde Pública (Chalker, R. B. & col., Rev. Infect. Dis. 10: 111-124, 1988). Este fato foi muito bem evidenciado pelo "Center for Disease Control" nos Estados Unidos, ao constatar que *Salmonella* infecta, naquele país, anualmente, mais de dois milhões de pessoas, resultando em 500.000 admissões hospitalares e em milhares de casos fatais (Morb. Mortal. Weekly Rep., CDC, surveill, 27:7, 1978).

A ocorrência de surtos de salmonelose causados pela ingestão de leite cru e pasteurizado, contaminados, tem sido relatado por vários pesquisadores. A maioria desses ocorre em países onde é elevado o consumo de leite cru, como no Reino Unido e Estados Unidos (Marth, E. H., J. Dairy Sci. 52: 283-315, 1969. Morb. Mortal. Weekly Rep. CDC. surveill, 30:373-374, 1981. Morb. Mortal. Weekly Rep. CDC. surveill, 33:505-506, 1984).

Embora frequentemente citado na literatura estrangeira, pesquisadores no Brasil, vêm tentando isolá-lo esse microrganismo a partir de laticínios, sem obter bom êxito (Jessouroun, E. Dissertação de mestrado da Universidade de São Paulo, 1983. Tibana, A. Tese de Doutorado. Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1981).

No presente trabalho, foram estudadas 78 amostras de leite cru de origem bovina, utilizados no processamento de leite pasteurizado tipo C de uma usina de beneficiamento da região de Londrina, no período compreendido entre março de 1986 a março de 1987. Foram coletados, semanalmente, na usina, volumes de 400 ml por amostras, em frascos estéreis. Após a coleta, as amostras foram transportadas ao laboratório, permanecendo sob refrigeração, pelo prazo máximo de 1 hora, até o momento da semeadura. O isolamento e a identificação de *Salmonella*, foram realizados segundo as metodologias preconizadas por American Public Health Association, (14 ed., 1978) e Vassiliadis, P. & col., (Appl. Environ. Microbiol., 42:615-618,

1. Departamento de Patologia Geral, UEL, Caixa Postal 6001, 86051, Londrina-Pr., Brasil.

2. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP, Caixa Postal 331, 14800, Araraquara - SP, Brasil.

1981). Assepticamente, 25 ml de leite foram adicionados a 225 ml de água peptonada tamponada pH 7,2, e incubados a 35°C por 24 horas. A seguir, duas alíquotas de 1 ml, foram transferidas para 2 tubos contendo 9 ml de caldo tetracionato adicionado de novobiocina a 0,4% (400 ug/ml), e incubadas a 35°C e 43°C por 24 horas. Outra alíquota de 0,1 ml foi transferida para 10 ml de caldo Rappaport Vassiliadis e incubada a 43°C por 24 horas. A partir do crescimento em caldo tetracionato e caldo Rappaport Vassiliadis, foram feitas semeaduras, em duplicata, em Ágar *Salmonella-Shigella* e Ágar Verde Brilhante. As placas foram incubadas a 35°C durante 18 horas. Após, as colônias suspeitas foram identificadas pelos testes bioquímicos EPM, MILi e Citrato, proposto por Fontes, C. F. (Dissertação de Mestrado. Escola Paulista de Medicina, 1982). As colônias com características bioquímicas de *Salmonella*, foram testadas, em nosso laboratório, com anti-soro polivalente (PROBAC) e a sorotipagem realizada no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo. Os testes de sensibilidade a drogas antimicrobianas foram realizadas frente a 10 antimicrobianos, utilizando-se a técnica de Bauer, A. W. & col (Am. J. Clin. Pathol., 45:493-496, 1966). Foram empregados os seguintes antimicrobianos: Estreptomicina, Clonrafenicol, Ac. pipemídico, Gentamicina, Ac. nalidíxico, Canamicina, Cefalotina, Ampicilina, Fosfomicina, Cotrimoxazol.

Os resultados revelaram o isolamento de uma cepa de *Salmonella dublin* após enriquecimento no caldo de tetracionato com novobiocina, incubado a 35°C e 43°C, tanto em Ágar *Salmonella-Shigella* como em Ágar Verde Brilhante, não sendo isolada a partir do caldo de enriquecimento de Rappaport-Vassiliadis.

De acordo com a literatura consultada, o presente relato de isolamento de *Salmonella dublin* a partir de leite parece ser o primeiro no Brasil. Considerando o papel dessa bactéria como patógeno humano (Morb. Mortal. Weekly Rep. CDC. surveill, 30:373-375; 1981; Morb. Mortal. Weekly

Rep. CDC. surveill, 33:197-199, 1984), este isolamento se reveste da maior importância.

A cepa de *Salmonella dublin* apresentou resistência apenas a tetraciclina. Isto pode ser explicado pelo fato desse antimicrobiano ser amplamente utilizado na veterinária, não só na terapêutica, mas também em rações para promover o crescimento dos animais (Egan, J. & col., Ferm. Food Res. 10:135-137, 1979).

É importante que se conscientize o produtor de leite sobre o uso correto destes antimicrobianos, pois sua utilização abusiva e indiscriminada traz consequências desastrosas, não somente a nível de saúde pública, como também para a indústria de laticínios.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Instituto Adolfo Lutz pela sorotipagem realizada e à CPG (Coordenadoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Estadual de Londrina), pelo apoio financeiro.

SUMMARY

Isolation of *Salmonella-dublin* from raw milk in the region of Londrina - Parana, Brazil.

Salmonella dublin was isolated from one of 78 samples of type C raw milk, collected from a dairy plant, in Londrina - Parana, Brazil. It is probably the first isolation of this microorganism, in Brazil, from raw milk. In a sensitivity test this strain showed resistance to tetracycline, only.

Key Words: *Salmonella*, Salmonelose, Milk, Dairy products, Gastroenterites.

Recebido para publicação em 16/05/91.

"IN VITRO" SUSCEPTIBILITY TO FOUR ANTIMICROBIAL AGENTS OF STRAINS OF THE *BACTEROIDES FRAGILIS* GROUP ISOLATED IN BRAZIL

Cláudia Garcia Mol¹,
Mario Julio Avila-Campos¹,
Maria Auxiliadora Roque de Carvalho¹,
Carlos Américo Veiga Damasceno¹,
Eduardo Osório Cisalpino¹,

SHORT COMMUNICATION

SUMMARY

The Minimal Inhibitory Concentrations of cefoxitin, clindamycin, metronidazole, and penicillin G against species of the *Bacteroides fragilis* group from human origin was determined, by using an agar dilution method. The percentages of resistant tested strains of the *B. fragilis* group were 77% to cefoxitin, 31% to clindamycin, and 89% to penicillin G. No resistant strain for metronidazole was found at the breakpoint (16 µg/ml).

Key Words: *Bacteroides fragilis*, anaerobic bacteria, antimicrobial susceptibility — MIC.

The anaerobic bacteria represent an ecologically significative group of the indigenous microbiota of many mammals (Tannock, G.W., Microbiol. Scien., 5:4-8, 1988), and are also causative agents in various mixed anaerobic infections of endogenous nature (Finegold, S.M., Anaerobic Bacteria in Human Diseases, Academic Press Inc., 1977).

Bacteroides spp. are recovered from mixed infections with aerobic bacteria. Penicillins and cephalosporins are commonly used for the treatment of infections caused by species of the *Bacteroides melaninogenicus* group, and chloramphenicol, cefoxitin, clindamycin or metronidazole are used for those produced by species of the *B. fragilis* group (Brook, I., Hunter, V. & Walker, R.I., J. Infect. Dis. 149: 924-928, 1984).

Resistance to commonly used antibiotics among the majority of clinical isolates, particularly species of the *B. fragilis* group, have been in-

creasingly reported worldwide (Tally, F.P. & Col., Antimicrob. Agents Chemother. 28: 675-677, 1985). From the therapeutic point of view, one must consider appropriate guidelines in attempt to control the antibiotic prescription which, unfortunately, is not always observed in Brazil.

On the other hand, the isolation, the identification and antimicrobial susceptibility determination of anaerobic bacteria are not usually done in Brazil, being restricted only to university hospitals and research institutes (De Uzeda, M. & Col., F. Med. 86: 383-389, 1983).

Considering the importance of this microbial group for their pathogenic potential and multiple resistance to antimicrobial drugs, the aim of this study was to determine the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of cefoxitin, clindamycin, metronidazole, and penicillin G against human species of the *B. fragilis* group.

1. Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, Instituto de Ciências Biológicas, Depto. de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, CP. 2486, CEP. 30.161, Belo Horizonte, MG, Brazil.

A total of 100 human intestinal isolates of the *B. fragilis* group was tested: 41 *B. fragilis*, 9 *B. vulgatus*, 7 *B. uniformis*, and 43 other *Bacteroides* of the *B. fragilis* group.

The species identification was carried out according to Holdeman, L.V., Cato, E.P. & Moore, W.G.C., Anaerobic Laboratory Manual, 4a ed. (1977) and Sutter, V.L., Citron, D.M. & Finegold, S.M., Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual, 3a ed. (1980). The strains were stored in skim-milk (10%) at -20°C. Two reference strains — *B. fragilis* ATCC 23745 and *B. vulgatus* ATCC 8482 — were included for control in each test.

Standard laboratory powders were supplied: sodic cefoxitin, from Merck Sharp & Dohme (Research Laboratories); chloride clindamycin from Rhodia Farma Ltda. (São Paulo, Brazil); metronidazole, from Rhodia S.A. (São Paulo, Brazil); and penicillin G, from Fontoura-Wyeth S.A. (São Paulo, Brazil).

Stock solutions of each antimicrobial were prepared on the day of this study, according to the instructions given by the manufacturers. Antimicrobial susceptibility tests were performed by using the agar dilution method described by Sutter, V.L. & Col., Antimicrob. Agents Chemother. 16: 495-502 (1979). Brain heart infusion agar (Difco) supplemented with 0.5 µg/ml hemin (Inlab S.A.) plus 0.5% yeast extract (Difco) was used as a growth medium modification. Antibiotic dilutions ranged from 0.25 to 512 µg/ml. The plates were inoculated by using a Steers replicator (Steers, E., Foltz, E. & Graves, B., Antimicrob. Chemother. 9: 307-311, 1959) with a final inoculum of approximately 10⁵ cfu/spot, and then incubated under anaerobic conditions (90% N₂/10% CO₂) at 37°C for 48 h. After the incubation period, the MIC for each tested strain was recorded as the lowest concentration of antimicrobial agent that prevented macroscopic growth.

The "in vitro" susceptibility of the 100 strains of the *Bacteroides fragilis* group to the drugs are shown in Table 1. The percentages of resistant tested strains of the *B. fragilis* group were 77% to cefoxitin, 31% to clindamycin, and 89% to penicillin G. The resistance level of the tested strains against cefoxitin and penicillin G was higher in relation to the breakpoint (16 µg/ml) for each drug (Table 1).

Cefoxitin, clindamycin, metronidazole, and penicillin G activities were compared, among the *B. fragilis* group, with MICs for 90% of the tested strains being 64, 256, 8, and 256 µg/ml, respectively. 56% of the *B. fragilis* isolates showed resistance to cefoxitin. The resistance to this drug has been reported by other researchers (Tally, F.P. & Col., An-

timicrob. Agents Chemother. 28: 675-677, 1985; Betriu, C. & Col. Antimicrob. Agents Chemother. 34: 671-673, 1990), and it has been associated with high frequency of cross-resistance to other B-Lactam agents (Cuchural, G.L. & Col., Antimicrob. Agents Chemother. 26: 145-148, 1984).

Increasing clindamycin resistance in species of the *B. fragilis* group has been reported by several investigators (Cuchural, G.L. & Col., Antimicrob. Agents Chemother. 26: 145-148, 1984; Soriano, F., Ponte, C. & Wilhelmi, I. J. Antimicrob. Chemother. 13: 395-399, 1984; De Almeida, A.E.C.C. & DE UZEDA, M., Antimicrob. Agents Chemoter. 31: 617-618, 1987). The isolated strains showed high levels of resistance to this drug.

Metronidazole was the most effective drug against all the species of the *B. fragilis* group. No resistant strain for this drug was found at the breakpoint (16 µg/ml), as previously described (Barry, A.L. & Col., Rev. Infect. Dis. 12: 210-217, 1990).

Species of the *B. fragilis* group have commonly shown diverse susceptibility patterns (Goldstein, E.J.C. & Citron, D.M., J. Clin. Microbiol. 26: 2361-2366, 1988; Betriu, C. & Col. Antimicrob. Agents Chemother. 34: 671-673, 1990). However, the data obtained in different laboratories are not easily comparable, since in these studies the *B. fragilis* group have not been identified at the species level.

Reference strains *B. fragilis* ATCC 23745 and *B. vulgatus* ATCC 8482 showed, respectively, the following MICs values: cefoxitin, 8 µg/ml and 4 µg/ml; clindamycin, 4 µg/ml and 1 µg/ml; metronidazole, 1 µg/ml and 2 µg/ml; Penicillin G, 16 µg/ml and 8 µg/ml.

Considering that cefoxitin, clindamycin, metronidazole, and penicillin G are usually recommended for the treatment of anaerobic infections

TABLE 1 - "In vitro" activity of four antimicrobial agents against 100 isolates of the *B. fragilis* group.

Antimicrobial Agents	MIC Range (µg/ml)	% of Strains		% of Resistant Strains *
		50	90	
Cefoxitin	8 - 128	32**	64	77
Clindamycin	≤0.25 - 256	2	256	31
Metronidazole	1 - 16	8	8	0
Penicillin G	≤0.25 - 256	32	256	89

* % of resistant strains at breakpoints: cefoxitin, 16 µg/ml; clindamycin, 4 µg/ml; metronidazole, 16 µg/ml; penicillin G, 16 µg/ml.

** MIC, in µg/ml.

in Brazil; considering the increasing resistance of anaerobic bacteria to antimicrobial agents and the regional differences in the susceptibility patterns of the isolates (Bawdon, R.E. & Col., Antimicrob. Agents Chemother. 16: 664-666, 1979; Tally, F.P. & Col., Antimicrob. Agents Chemother. 28: 675-677, 1985), it is necessary to make an effort to perform periodical studies on the susceptibility of anaerobic bacteria in order to provide information for rational therapeutic decisions.

RESUMO

A Concentração Inibitória Mínima de cefoxitina, clindamicina, metronidazol e penicilina G, contra cepas do grupo *Bacteroides fragilis*, foi determinada pelo método de diluição em ágar. As percentagens de resistência das cepas testadas foi

percentagens de resistência das cepas testadas foi de 77% para cefoxitina, 31% para clindamicina, e 89% para penicilina G. Nenhuma cepa testada evidenciou resistência ao metronidazol, ao nível do ponto crítico (16 µg/ml).

Palavras-chave: *Bacteroides fragilis*, bactérias anaeróbias, susceptibilidade a antimicrobianos — MIC.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted to Luzia Rosa Resende for technical help.

This work was supported by grants from the CPq/UFMG, CNPq, and FINEP.

Received for publication in 30/08/90

SURVIVAL OF *METARHIZIUM ANISOPliaE* TO FAR UV LIGHT, 8-METHOXYPSOLAREN PLUS NEAR UV LIGHT AND NITROUS ACID

Francisco de Assis Limeira Júnior*
José Pinto de Siqueira Júnior*
José Carlos da Silva*

SHORT COMMUNICATION

SUMMARY

This note shows dose-response survival data of *Metarhizium anisopliae* to some agents used as mutagens in genetical research.

Key Words: *Metarhizium anisopliae*, mutagenic agents

Examination of dose-response data provide information on the process of cell-killing itself, and indirectly on the choice of the optimal mutagenic dose for obtaining specific mutants (Bos, C. J., Stam, P. and van der Veen, J. H., Mutat. Res., 197: 67, 1988) or inducing quantitative genetic variation (Simpson, I.N. and Caton, C.E., J. Gen. Microbiol., 110: 1, 1979).

For the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* a dose-response curve for survival to gamma rays was already reported (Okino, L.A. *et al.*, Solo, Piracicaba-SP, 70: 32, 1978). In spite of the usefulness and extensive employment of far UV light (FUV, 254 nm) for genetical researches with *M. anisopliae* (Silva, J.C. and Messias, C.L., J. Invertebr. Pathol., 48: 368, 1986), precise dose-effect survival data, with UV intensity measurements taken with radiometric unit, are rare and not well documented for a dose range (Silveira, W.D. and Azevedo, J.L., Rev. Brasil. Genet., 7:1, 1984). Using 8-methoxysoralen (8MOP) in combination with near UV light (NUV, 365 nm) as a mutagen, an improvement program was applied to *M. anisopliae* for exoenzymes production, but was

reported only the dose employed which allow 25% survival (Silva, J.C., Siqueira, Jr., and Marcondes, C.B., Rev. Brasil. Genet., 12: 1, 1989).

The purpose of this note is to present dose-response data for survival of *M. anisopliae* (strain E₉) to FUV, 8 MOP-UVL combination and nitrous acid (HNO₂).

A suspension of conidia was irradiated with FUV at a dose rate of 12J/m². Conidia previously treated with 8 MOP (Silva, J.C., Siqueira, Jr., J.P. and Marcondes, C.B., *op. cit.*) were irradiated with NUV at a dose rate of 20J/m². The UV source and the dosimeters were from Ultra-Violet Products Inc., San Gabriel CA, USA. The treatment with HNO₂ was as described elsewhere (Azevedo, J.L., Mutat. Res., 10: 111, 1970). Suitable dilutions of untreated and treated conidia were plated on complete medium (Pontecorvo, G. *et al.*, Adv. Genet., 5: 141, 1953); after incubation at 28°C for 96h. The colonies were counted and survival was calculated for each dose. The LD₇₀ and LD₉₅ were calculated as described by Baracho, I.R. and Piedrabuena, A. E. (Ciência e Cultura, São Paulo, 29: 314, 1977).

* Depto. de Biologia Molecular/CCEN, Universidade Federal da Paraíba, 58059 João Pessoa Pb, Brasil

The results are shown in Table 1.

Although in routine mutant isolation it is enough to measure the UV dose in terms of time of exposure to a given source under standard conditions, physical measurement has the advantage

TABLE 1- Dose-response survival data of *Metarhizium anisopliae* to some agents

FVU KJ/m ²	%	NUV* KJ/m ²	%	HNO ₂ min.	%
1,2	70	6	45	3	70
2,4	23	9	18	6	14
3,6	1,6	12	8,2	9	3,2
4,8	0,53	15	2,1	12	0,36
ID ₉₅ 2,99 KJ/m ²		12,5 KJ/m ²		7,9 min.	
ID ₇₀ 2,12 KJ/m ²		7,3 KJ/m ²		4,7 min.	

* in combination with 8MPO (25 µg/ml)

of being applicable to day-to-day monitoring of a UV source to taking in account the changes in output due to voltage fluctuations, ageing of the tube, variations in reflectivity of lamp housing, and other causes. Amongst the chemical mutagens, the nitrous acid has the advantage that mutagenesis is very easily controlled, and the mutagen is a rather harmless substance.

It is clear that the best suited dose of a given mutagen for a particular mutant isolation depends

on many factors, including the availability or otherwise of enrichment procedures and the extent to which multiple mutants will give trouble nevertheless it is generally accepted that doses giving ca 25% survivors are often more effective in inducing quantitative genetic variation and that the doses giving ca 5% survivors are more convenient for qualitative traits (Burnett, J.H., Mycogenetics, J. Willey & Sons, 375 p, 1975).

ACKNOWLEDGEMENTS

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

RESUMO

Sobrevivência de *Metarhizium anisopliae* à luz UV curta, 8-metoxipsoraleina associada à luz UV longa e ácido nitroso.

Esta nota apresenta dados de sobrevivência de *Metarhizium anisopliae* à agentes usados como mutagênicos em pesquisas genéticas.

Palavras-chave: *Metarhizium anisopliae*, agentes mutagênicos.

REVISÃO DE LIVRO

THE BACTERIAL CHROMOSOME. Eds. Karl Drlica & Monica Riley American Society for Microbiology, Washington, DC - 1990

O livro aborda aspectos variados do material genético bacteriano, tendo envolvido a participação de mais de 100 cientistas dos Estados Unidos e Europa.

Numa primeira parte, alguns capítulos são destinados à análise da estrutura primária do cromossomo bacteriano, através do mapeamento de genes por cruzamentos, hibridização e por técnicas recentes envolvendo a digestão do DNA cromossômico com a enzima *NotI* e separação dos fragmentos resultantes por eletroforese tipo "pulse-field". A estrutura geral do material genético de muitos microrganismos tem sido analisada por essas e outras técnicas disponíveis. Ao final dessa primeira parte do livro, encontram-se capítulos abordando a organização geral do genoma de *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas sp*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces sp*, e *Staphylococcus aureus*.

Num segundo bloco, 9 capítulos são destinados à análise da conformação do DNA. Um capítulo muito interessante aborda as chamadas "estruturas não-usuais" do DNA, como Z-DNA, DNA triplex, procurando sempre que possível demonstrar o papel de tais estruturas "in vivo", não se detendo apenas em sua descrição física.

O terceiro bloco do livro é destinado ao estudo da replicação do DNA cromossômico. Um aspecto fascinante é o controle da iniciação da replicação, tratado no primeiro capítulo do bloco, onde os autores fazem uma revisão dos eventos que ocorrem durante o ciclo celular de *Escherichia coli*. Segundo uma linha lógica entre os capítulos, a inibição da forquilha de replicação do cromossomo bacteriano é analisada tanto em *E. coli* como em *B. subtilis*.

A análise dos mecanismos de recombinação do DNA são destinados 6 capítulos, em que o papel do pareamento imperfeito ("slippage") e de operons múltiplos (como os de RNA ribossômicos) na geração de novas sequências é analisado. Nesse bloco, acredito que um capítulo específico para elementos genéticos móveis (ISs e transposons) poderia ter sido incluído, o que enriqueceria bastante o enfoque de recombinação.

Um bloco final é destinado ao estudo de respostas globais aos stress, analisando a função SOS, esporulação e resposta ao choque térmico.

Trata-se de um livro de grande utilidade para alunos e cientistas interessados em aspectos genéticos de microrganismos em geral.

Salete Newton
Inst. Ciências Biomédicas U.S.P.
Departamento de Microbiologia