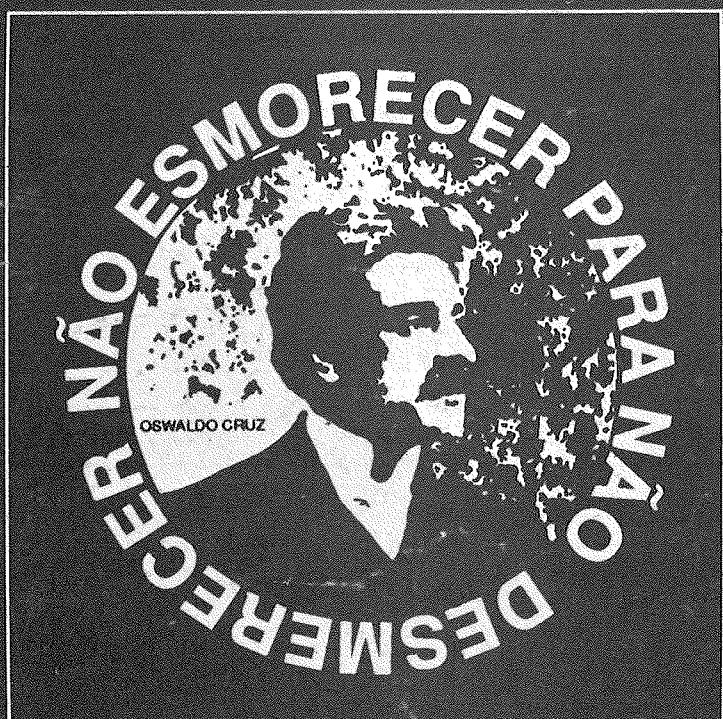


Revista de Microbiologia



SBM

Sociedade
Brasileira de
Microbiologia

São Paulo – Brasil

Volume 22 Número 4 Out. - Dez. 1991

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Revista de Microbiologia/Sociedade Brasileira de Microbiologia.

— Vol. 22, nº 4 (out/dez 1991)
— São Paulo: SBM, [1970] -
v.:il ; 27 cm

Trimestral
1970 - 1991, 4-22
ISBN 0001-3714

1. Microbiologia I. Sociedade Brasileira de Microbiologia

NLM-QW4

SCT/PR



126 - 1991 - 4-22
126 - 1991 - 4-22
126 - 1991 - 4-22
126 - 1991 - 4-22



Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo — Brasil

Filiado à IUMS — INTERNATIONAL UNION OF MICROBIOLOGICAL SOCIETIES

Diretor Executivo: FLÁVIO ALTERTHUM

Conselho Editorial

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

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

Secretária Executiva: Maria Helena Colón Silva

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

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

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

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

Av. Prof. Lineu Prestes, 1374

05508 - São Paulo - S.P.

Brasil

Fone (011) 813-9647

TELEX 11 35085

FAX 88 79875

REVISTA DE MICROBIOLOGIA - SBM

Av. Prof. Lineu Prestes, 1374

Cid. Universitária - USP

05508 - São Paulo/SP

Sociedade Brasileira de Microbiologia

Filiada a IUMS - INTERNATIONAL UNION OF MICROBIOLOGICAL SOCIETIES

Diretoria	Presidente Maria Therezinha Martins Inst. de Ciências Biomédicas - USP Dept.º de Microbiologia Av. Prof. Lineu Prestes, 1.374 05508 - São Paulo - SP	Vice-Presidente Walderez Gambale Inst. de Ciências Biomédicas - USP Deptº de Microbiologia Av. Prof. Lineu Prestes, 1.374 05508 - São Paulo - SP
	Secretária Geral Lúcia Martins Teixeira Inst. de Microbiologia - UFRJ Centro de Ciências da Saúde - Bl.1 Ilha do Fundão 21944 - Rio de Janeiro - RJ	1º Tesoureiro Leonardo Perego Jr. Fac. de Ciências Farmaceuticas - USP Conjunto das Químicas Cidade Universitária 05508 - São Paulo - SP
	2ª Secretária Rosana F. Vazoller USP-São Carlos	2º Tesoureiro Roberto M. Yanaguita Inst. de Ciências Biomédicas - USP Deptº de Microbiologia Av. Prof. Lineu Prestes, 1.374 05508 - São Paulo - SP
Conselho Fiscal	Paulo S. Minami (FCF/USP) Claudete R. Paula (ICB/USP) Sebastião Timo Laria (ICB/USP)	

Coordenadores de Programas da SBM Microbiologia de Alimentos (Sebastião Timo Laria - ICB/USP-SP);
Microbiologia Clínica (Sergio E. Longo Fracalanza - UFRJ-RJ);
Microbiologia Industrial (Rosana L. Vazoller - UFS Carlos);
Microbiologia Ambiental (Maria Therezinha Martins - ICB/USP-SP);
Microbiologia de Solo (Ely Nahas - UNESP - Jaboticabal - SP)
Micologia (Benedito Corrêa - ICB/USP-SP);
Micotoxinas (Mirna Sabino - IAL-SP);
Infecções Hospitalares (Carlos Emílio Levy - FMRP/USP).
Taxonomia - Coleções de Cultura (Vanderley P. Canhos - UNICAMP-SP)

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

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

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos colegas citados abaixo que colaboraram com a Revista de Microbiologia durante o ano de 1991, fazendo revisões críticas aos trabalhos submetidos.

Adalto Ivo Milanez	Laurinda A. Soares
Adilson Murilo	Leda N. Hagler
Allen N. Hagler	Leon Rabinovitch
Aline A. Pizzarani Kleiner	Lúcia Martins Teixeira
Antonio Joaquim Rossini	Luis Fernando T.L. Linhares
Antonio de Melo Serrano	Luiza L. Villa
Antonio F.P. de Castro	Luiz Rachid Trabulsi
Armando Ventura	Maria Candida Faccioti
Astreia Giesbrecht	Maria de Lourdes Monteiro
Augusto Cesar Montelli	Maria Raphaela Musumeci
Beatriz Valavicius	Maria Regina Toledo
Benedito Anselmo	Marina B. Martinez
Bernadette Gamboski	Marisa Landgraf
Caio M.F. Mendes	Marney P. Cereda
Carlos Augusto Pereira	Mauro F.F. Leitão
Carlos da Silva Lacaz	Mauro Mariano
Cecília Laluce	Michele Vitolo
Celeste Fava Neto	Milton de Uzeda
Celidéia A.C. Vaz	Newton P. Stamford
Darcy Fontoura de Almeida	Paschoal Robbs
Deise Pasetto Falcão	Pedro Magalhães Lacava
Dilma Scala Gelli	Petra S. Sanchez
Dirceu do Nascimento	Regina Ayr
Edda de Rizzo	Regina M.S. Carlis
Edna Haapalainen	Ricardo Ishak
Eduardo Nascimento Mós	Rosa M.C. Muchovej
Elsa Mamizuka	Rubem Abreu Machado
Eugenio Aquarone	Sânia Maria Tauk
Eva Burger	Sérgio E.L. Fracalanza
Fumio Yokoya	Silvio Arruda Vasconcelos
Gabriel Padilha	Sirdeia M. Furlanetto
Hector Terenzi	Siu Mui Tsai Saito
Heloíza Ramos Barbosa	Sumie H. Shimizu
Helvécio de Polli	Sunaô Sato
Henry About Boul	Tomomasa Yano
Hermann G. Schatzmayr	T. Yoneda
Iracema H. Schoenlein-Crusius	Valter Roberto Linardi
João Kolling	Vanderley P. Canhos
João Lúcio de Azevedo	Vera Calich
João Ruy Jardim Freire	Vera Fantinato
Johanna Dobereiner	Vera Lúcia R. Bonomi
Jorge Timenetsky	Dra. Yoshime
José Antonio G. Aleixo	Walderez Gambale
José Cesar Panetta	Yong Kun Park
Juliet K. Sugai	

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.cib.net

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA
VOLUME 22 OUTUBRO-DEZEMBRO 1991 NÚMERO 4
REV. MICROBIOL. (S. PAULO), 22(4)

CONTEÚDO — CONTENTS

PÁG

Domingues, R.M.C.P.; Cavalcanti, S.M.B.; Fonseca, M.E.F.; Ferreira, M.C.S. Hemagglutination activity of <i>Bacteroides fragilis</i> as a virulence marker Atividade hemaglutinante de <i>Bacteroides fragilis</i> como marcador de virulência	277
Hársi, C.M.; Candeias, J.A.N. A reação de imunofluorescência indireta no diagnóstico por rotavírus The indirect immunofluorescence assay in the diagnosis of human rotavirus gastroenteritis.....	282
Modolo, J.R.; Gottschalk, A.F.; Moreno, G.; Lopes, C.A. de M.; Margatho, L.F.; Del Fava, C. <i>Campylobacter</i> em cães com ou sem diarréia: incidência e suscetibilidade a 21 antimicrobianos Incidence of <i>Campylobacter</i> in stools of diarrheic and non-diarrheic dogs	288
Guilardi, A. C. R.; Ortolan, M.; De Gasperi, E.N. Conservação de bactérias do gênero <i>Haemophilus</i> Preservation of genera <i>Haemophilus</i> bacteria.....	293
Pinheiro, M. S.; Barrucand, L.; Ricciardi, I.D.; Tibana, A. Avaliação do método da passivação do cobre para a obtenção de microaerofilia e do ágar cefoxitina no cultivo de <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>Campylobacter coli</i> Evaluation of cefoxitin medium and the microaerophilic environment produced by a combination of iron, copper and sodium bicarbonate for the culture of <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>Campylobacter coli</i>	298
Furlanetto, S.M.P.; Nascimento, D. do; Cerqueira-Campos, M.L.; Iaria, S.T. Efficacy of direct plating and selective enrichment media for detecting <i>Campylobacter jejuni</i> in fresh eviscerated whole market chickens - São Paulo - Brazil <i>Campylobacter jejuni</i> em carcaças de frangos, avaliação da eficiência de meios de plaqueamento e enriquecimento seletivo no seu isolamento	303
Smania Jr., A.; Gil, M.L.; Smania, E.F.A.; Zoccoli, C.M.; Michels, D.; Lopes, R. Resistência a agentes antimicrobianos de amostras de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> isoladas em Florianópolis Resistance to antimicrobial agents of <i>Neisseria gonorrhoeae</i> isolated at Florianópolis, Santa Catarina	308
Korol, S.; Natale, P.; Moretton, J.; Santini, P.; D'Aquino, M. Isolation and characterization of a new para-chlorophenol degrading strain of <i>Pseudomonas</i> from samples of natural waters Isolamento e caracterização de uma nova raça de <i>Pseudomonas</i> capaz de degradar p-clorofenol... ..	313
Oliveira, V. de; Mesquita, A.J.; Serafini, A.B.; Ribeiro, J.L.; Silva, M.R.R. Ocorrência de aflatoxinas B ₁ , e G ₁ , em amendoim comercializado em Goiânia - GO, Brasil The occurrence of aflatoxins B ₁ , e G ₁ , in peanuts dealt in Goiânia - GO, Brazil	319

Machoshivili, I.A.; Penna, T.C.V.; Colombo, A.J.	
Resistência térmica de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> em solução tampão fosfato (pH 7,0) e em leite reconstituído	
Thermal inactivation studies on <i>Staphylococcus aureus</i> strains in potassium phosphate solution at pH 7,0 and in reconstituted milk	323
Cerutti, R.L.; Barbosa, T.C.P.	
Flora bacteriana heterotrófica em ostras (<i>Crassostrea rhizophorae</i>) e águas da Baía Norte, ilha de Santa Catarina, Brasil	
Heterotrophic bacteria in oysters and waters of North Bay, Santa Catarina, Brazil	330
Faintuch, B.L.; Sato, S.; Aquarone, E.	
Emprego de algumas fontes nitrogenadas na obtenção de biomassa de <i>Oscillatoria limnetica</i>	
Use of different nitrogen sources in the production of biomass of <i>Oscillatoria limnetica</i>	335
Oliveira, R.G.B.; Souza, M.L.	
Partial characterization of a brown pigment produced by <i>Azospirillum lipoferum</i>	
Caracterização parcial de um pigmento produzido por <i>Azospirillum lipoferum</i>	340
Pacheco, S.; Cambraia, J.; Kasuya, M.C.M.	
Efeito de diferentes níveis de fósforo sobre a atividade de fosfatases ácidas e a composição mineral de alguns fungos ectomicorrízicos	
Effect of different levels of P on acid phosphatase activity and mineral composition of some ectomycorrhizal fungi.....	345
Pereira, M.L.; Lara, M.A. de ; Dias, R.S.; Carmo, L.S. do	
Intoxicação por <i>Staphylococcus aureus</i> provocada por queijo "Tipo Minas"	
Staphylococcal food poisoning by cheese "Tipo Minas"	349

HEMAGGLUTINATION ACTIVITY OF *BACTEROIDES FRAGILIS* AS A VIRULENCE MARKER

Regina M.C. Pilotto Domingues¹

Silvia M. Baêta Cavalcanti¹

Maria Evangelina F. Fonseca²

Maria Candida S. Ferreira¹

SUMMARY

Hemagglutination activity (HA) of *Bacteroides fragilis* strains was studied. Several behavior patterns were found with erythrocytes from different species (human, guinea pig, sheep) and 4 distinct groups were formed. The loss of the HA followed by previous heat treatment of some strains, selected from the groups, showed that *B. fragilis* adhesins have, probably, a proteic nature. On the other hand, treatments with a few proteases, and also with neuraminidase, did not interfere in HA. Studies at light and electron microscope, with the same strains, suggested the adhesins as being associated with outer membrane proteins or with the presence of a structure defined as microcapsule. It seems rather unprobable the role of structures such as capsule and fimbriae in this activity, since both hemagglutinating and non-hemagglutinating strains presented capsule, and, fimbriae were not found in all of the hemagglutinating strains. The greater frequency of hemagglutinating strains isolated from clinical specimens (84,2%) than from normal flora (15,8%), and, the observed difference in the capacity of inducing subcutaneous abscess in mice by hemagglutinating and non-hemagglutinating strains suggested the HA of *B. fragilis* as a marker of its virulence potential.

Key Words: hemagglutination, *Bacteroides fragilis*, virulence marker.

INTRODUCTION

Bacteroides fragilis has been subject of intense research in the last years since it is one of the most important anaerobic pathogen in intra-abdominal infection, in spite of representing a minor component of the fecal flora (3). This situation evokes the existence of particular virulence factors or properties that could be associated with the pa-

thogenicity. Recent studies have suggested that its virulence could be due to adhesive properties to mucosal surfaces (7, 9 10). There is a general consensus that adherence contributes to the virulence of many bacterial species and it is supported by extensive data in the literature (1, 2). Microbial surface structures, such as capsule and fimbriae have already been proposed as the possible adhesins of *B. fragilis* (7, 8, 9, 10, 11, 13), but there is

1. Departamento de Microbiologia Médica

2. Departamento de Virologia

Instituto de Microbiologia - Universidade Federal do Rio de Janeiro - PO BOX 68040 - Ilha do Fundão - Rio de Janeiro, RJ - Brasil

a great controversy about it. As hemagglutination techniques have often been suggested as an useful procedure in the investigation of the mechanisms of adherence, and since erythrocytes possess many of the receptors found on epithelial cells, our purpose, in the present study, was to screen some types of erythrocytes for agglutination of *B. fragilis* strains and to identify the surface components implicated as mediators of the attachment and their chemical composition. By the end, we tried to verify a possible relationship between the hemagglutination activity and the capacity of inducing abscess, a model of anaerobic infection.

MATERIAL AND METHODS

Strains and cultural conditions - A total of 31 strains of *Bacteroides fragilis*, isolated from normal intestinal flora (10 strains) and from different infections (21 strains), was used. All the strains identified according to Holdeman *et al.* (4). Two reference strains obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD) - 23745 and 25285 - were also included.

Organisms were grown in brain heart infusion broth, prereduced sterilized anaerobically - BHI-PRAS (4), for 18 h at 37°C. Following incubation, the bacterial cells were pelleted, washed, and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) 0,01M pH 7,2 to a concentration of approximately $3,0 \times 10^{10}$ UFC/ml (optical density of 1,0 at 620nm).

Hemagglutination tests - Fifty microliters of the bacterial suspension were serially diluted two-fold in PBS, in a microtiter tray, and 50 µl of the erythrocyte (human A, B, O, guinea pig and sheep) suspension (1%) were added to each well. The microtiter tray was gently shaken for 1 min at room temperature, and after 60 min of incubation at 4°C, it was read. An extra incubation, overnight at 4°C, was also done. Hemagglutination activity (HA) titers were expressed as the reciprocal of the highest bacterial dilution that showed hemagglutination activity.

Treatments of bacteria - Six isolates of *B. fragilis*, defined by the previous screening performed, were treated separately with protease of *Streptomyces*, pronase E, trypsin (1mg/ml) and neuraminidase (0.1U/ml, PBS pH 6.0) for 30 min at 37°C. After the treatment, the bacterial cells were sedimented and resuspended to the original volume. Bacterial suspensions were also heated at 100°C for 10 min. After the treatments, the hem-

agglutination tests were assayed, as described above.

Light and transmission electron microscopy studies - Capsule formation was detected under light microscope after using India ink. For studies by electron microscopy, carbon-coated formvar grids were floated on the top of the bacterial suspension drop and were inverted successively on a drop of 1% glutaraldehyde, distilled water, 1% phosphotungstic acid aqueous solution (PTA) and again in distilled water. After the staining, all the samples were examined at Phillips electron microscope.

Abscess formation - Subcutaneous abscess, as virulence determinant, was performed as described by Joiner *et al.* (5). Two strains, one HA positive (ATCC 25285) and other negative (MC₃) one were used. Healthy adult mice were employed and the implantation of inoculum was done by infection SC of 0.25 ml of 10^8 CFU/ml *B. fragilis* in mixture 50:50 (V/V) with sterile cecal contents from meat-fed mice. The animals were assessed daily and after developing abscess they were killed with ether. Abscess were removed by wide dissection and cultured to determine quantitative viability.

RESULTS

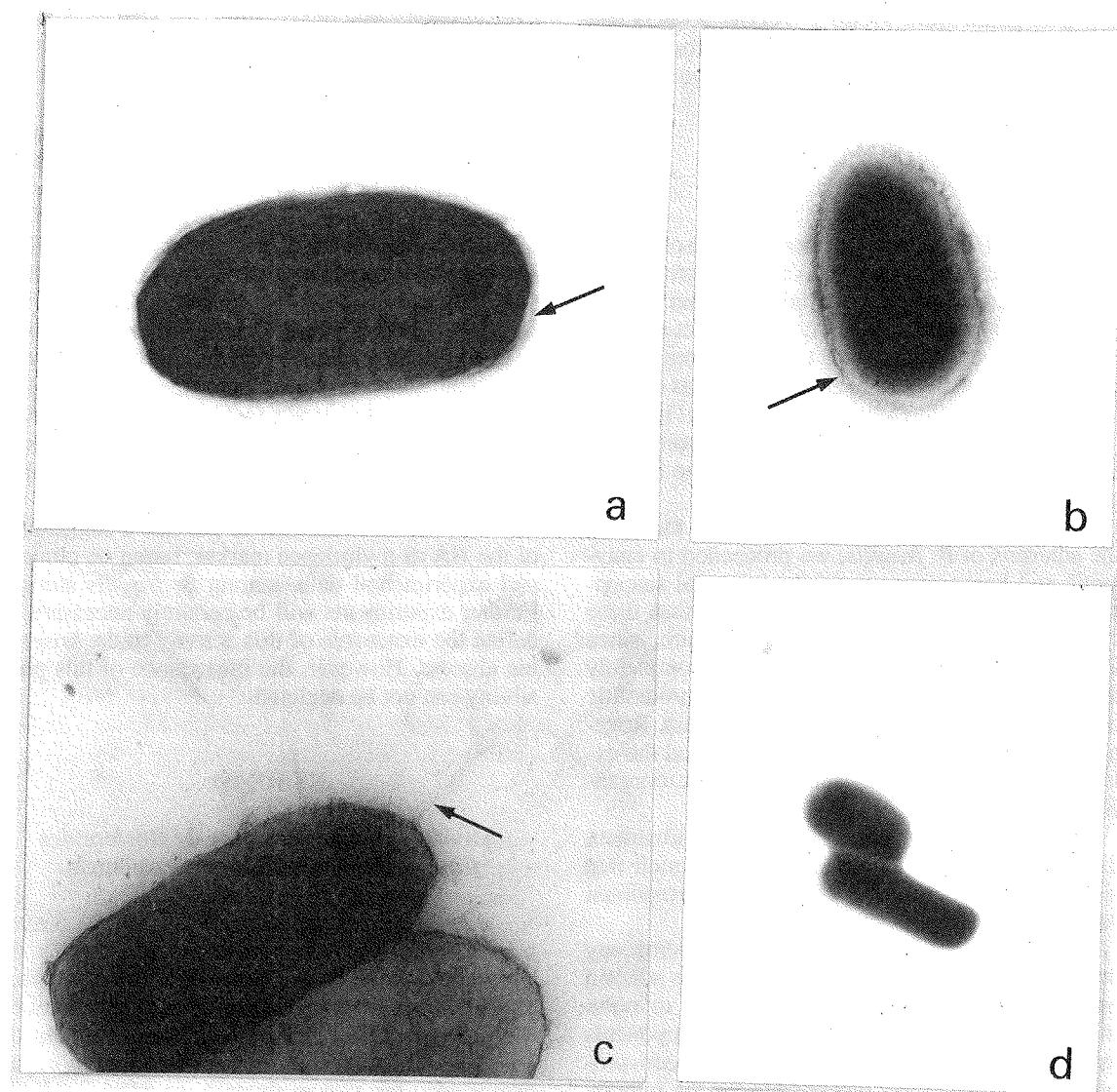
The results of the hemagglutination screening are presented in Table 1. Different patterns of hemagglutination were found and four groups were formed. Sixteen strains agglutinated the five types of erythrocytes tested (group I), 1 strain agglutinated only human erythrocytes (group III) and 1 strain, human and sheep erythrocytes (IV). Fifteen out of the 33 strains did not show any HA when tested (II). The results found to the different human erythrocytes tested (blood group A, B, O) presented total agreement. The screening showed that among the strains from clinical material tested, 84,2% was HA positive whereas only 15,8%

TABLE 1 - Hemagglutination activity of *Bacteroides fragilis* strains with different erythrocytes

Number of Strains	Erythrocytes			Groups
	Human ABO	Sheep	Guinea pig	
16	+	+	+	I
15	-	-	-	II
1	+	-	-	III
1	+	+	-	IV

TABLE 2 - Hemagglutinating titers of *Bacteroides fragilis* strains - heat and enzymatic treatments and morphological aspects

Strains	Control	Bacterial treatments			Light microscopy capsule	Electron microscopy	
		Heat	Proteases	Neuraminidase		fimbriae	microcapsule
<i>Group I</i>							
ATCC 25285	16	0	16	16	+	-	+
ATCC 23745	8	0	8	8	+	+	+
20656-2-1	16	0	16	16	+	-	+
030 M	8	0	8	8	+	+	+
MC ₂	4	0	4	4	+	+	+
<i>Group II</i>							
MC ₃	0	0	0	0	+	-	-



from fecal normal was capable of agglutinating erythrocytes.

Five strains from group I and one from group II were evaluated for HA after enzymatic and heat treatments. The heat treatment abolished completely the HA, whereas proteases and neuraminidase did not affect the HA of strains from both groups (Table 2).

By light microscopy it was observed capsule in 6 strains: 5 HA positive and 1 HA negative. By electron microscopy it was found that all the strains from group I had microcapsule, 2 strains from group I had also fimbriae and the strain from group II did not present these two components (Figure 1).

One strain from group I (ATCC 25285) and one from group II (MC_3) were assayed for abscess formation and only the first one, positive for HA, induced this pathological process.

DISCUSSION

In the last few years, the phenomenon of microbial adherence has deserved the credit of a great number of researches, as an essential parameter for the pathogenic mechanisms, being the subject of wide and accurate revisions, and, the binomium adherence - pathogenicity has been recognized as of great importance for different microbial groups (1, 2).

In our work, with the aim of investigating the adherence of *B. fragilis*, we employed the hemagglutination model.

In order to determine the chemical nature of the adhesins of *B. fragilis*, we proceeded to enzymatic and heat treatments of the bacterial suspensions and we came to the conclusion that these components have probably proteic nature, since the previous heat treatment abolished completely the HA, in spite of the treatments with proteolitic enzymes having not influenced this process. Rogemond & Guinet (12) had already suggested the existence of lectin-like adhesins in this microorganism.

The observation that neuraminidase treatment did not alter the HA of *B. fragilis* indicated that sialic acid, probably, did not play a determinant role in this process of interaction.

Based on the light and electron microscopy studies, it seems reasonable to suggest this adhesin as being associated to microcapsule or to outer membrane proteins. Although surface components as capsule and fimbriae have already been proposed as the structures responsible for the interac-

tion, their participation in the HA seems rather improbable, once both hemagglutinating and non-hemagglutinating strains presented capsule, and, fimbriae were not detected in all the hemagglutinating strains. Our results are according to those of Patrick *et al.* (8) and the structure, here defined as a microcapsule, seems to be referred as an electron dense layer by these authors.

Our data raised the possibility that the HA of *B. fragilis* can be suggested as a marker of its virulence, since the majority of the hemagglutinating strains was isolated from clinical specimens. Pruzzo *et al.* (10), in recent work, have already suggested this relationship, which has also been accepted to a few other microorganisms (14). Corroborating this observation, we also detected a relevant difference in the behavior of hemagglutinating and non-hemagglutinating strains concerning the ability to induce animal abscess.

Although most anaerobic abscess contains multiple organisms, *B. fragilis* is the only anaerobic bacterium known to induce the experimental formation of abscess without the presence of a facultative organism for synergism and this ability has been attributed to the polysaccharide capsule (16). Regardless of the fact that we were able of inducing abscess, without any living helper, using an encapsulated strain (ATCC 25285), we were incapable to promote the same process with another encapsulated strain (MC_3). The use of cecal contents in this model do not reduce the importance of this finding since its function is related with an adjuvant effect.

This report is the first to provide a suggestion of the HA as a virulence marker, based on clinical and experimental data, among *B. fragilis* strains. Further experiments will be certainly necessary to define the exact role of this activity in the anaerobic abscess. However, the importance of this possibility can not be neglected.

RESUMO

Atividade hemaglutinante de *Bacteroides fragilis* como marcador de virulência.

Atividade hemaglutinante (AH) de *Bacteroides fragilis* foi estudada. Vários padrões de comportamento foram encontrados com eritrócitos de diferentes espécies (humano, cobaio, carneiro) e 4 grupos distintos foram formados. A perda da AH, após tratamento com calor, de algumas cepas demonstrou ter, provavelmente, as adesinas de *B.*

fragilis, uma natureza proteica. Por outro lado, tratamentos com algumas proteases e neuraminidase não interferiram na AH. Estudos ao microscópio ótico e eletrônico, com as mesmas cepas, sugeriram que as adesinas estejam associadas com proteínas de membrana externa ou com a presença de uma estrutura definida como "microcápula". Parece improvável o envolvimento de estruturas como cápsula e fimbrias nesta atividade, uma vez que tanto cepas hemaglutinantes como não hemaglutinantes apresentaram cápsula, e, fimbrias não foram encontradas em todas as cepas hemaglutinantes. A maior frequência de isolamento de cepas hemaglutinantes a partir de espécimes clínicos (84,2%) do que a partir de flora normal (15,8%), e, a diferença observada na capacidade de indução de abscesso sub-cutâneo em camundongos por cepas hemaglutinantes e não hemaglutinantes sugerem a AH de *B. fragilis* como um marcador de virulência.

Palavras-chave: hemaglutinação, *Bacteroides fragilis*, marcador de virulência.

ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully acknowledge the help of Joaquim Santos Filho and Fernando Magalhães for the technical assistance.

This work was supported by grants of the following national institutions: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

REFERENCES

1. Beachey, E.H. - Bacterial adherence: adhesion-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J. Infect. Dis.*, **143**: 325-345. 1981.
2. Beachey, E.H., Grampapa, C.S. & Abraham, S.N. - Bacterial adherence: adhesion-receptor mediated attachment of pathogenic bacteria to mucosal surfaces. *Amer. Rev. Respir. Dis.*, **138**: 1988.
3. Finegold, S.M. - Anaerobic bacteria in human disease. Academic Press Inc., New York, 1977.
4. Holdeman, L.V., Cato, E.P. & Moore, W.E.C. - Anaerobe Laboratory Manual, 4th ed. Virginia Polytechnic Institute & State University, Blacksburg, VA. 1977.
5. Joiner, K.A., Onderdonk, A.B., Gelfand, J.A., Bartlett, J.G. & Gorbach, S.L. - A quantitative model for subcutaneous abscess formation in mice. *Br. J. Exp. Pathol.*, **61**: 97-107. 1980.
6. Onderdonk, A.B., Kasper, D.L., Cisneros, R.L. & Bartlett, J.G. - The capsular polysaccharide of *B. fragilis* as a virulence factor: comparison of the pathogenic potential of encapsulated and unencapsulated strains. *J. Infect. Dis.*, **136**: 82-89. 1977.
7. Onderdonk, A.B., Moon, N.E., Kasper, D.L. & Bartlett, J.G. - Adherence of *Bacteroides fragilis* in vivo. *Infect. Immun.*, **19**: 1083-1087. 1978.
8. Patrick, S., Coffey, A., Emmerson, A.M. & Larkin, M.J. - The relationship between cell surface structure expression and hemagglutination in *Bacteroides fragilis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **50**: 67-71. 1988.
9. Pruzzo, C., Dainelli, B. & Riochetti, M. - Piliated *Bacteroides fragilis* strains adhere to epithelial cells and are more sensitive to phagocytosis to human neutrophils than nonpiliated strains. *Infect. Immun.*, **43**: 189-194. 1984.
10. Pruzzo, C., Guzman, C.A. & Dainelli, B. - Incidence of hemagglutination activity among pathogenic and non-pathogenic *Bacteroides fragilis* strains and role of capsule and pili in HA and adherence. *FEMS Microbiol. Lett.*, **59**: 113-118. 1989.
11. Riley, T.V. & Mee, B.J. - Hemagglutination of *Bacteroides fragilis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **25**: 229-232. 1984.
12. Rogemond, V. & Guinet, R.M.F. - Lectin-like adhesins in the *Bacteroides fragilis* group. *Infect. Immun.*, **53**: 99-102. 1986.
13. Vel, W.A.C., Namavar, F., Marian, A., Verwey-van Vught, J.J., Pubben, A.N.B. & McLaren, D.M. - Hemagglutination by the *Bacteroides fragilis* group. *J. Med. Microbiol.*, **21**: 105-107. 1986.
14. Vosbeck, K. & Metz, H. - Bacterial adhesion: influence of drugs. *Med. Microbiology*, **3**: 21-62. 1983.

Received for publication in 30/10/90

A REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA NO DIAGNÓSTICO POR ROTAVÍRUS

Charlotte Marianna Hársi*
José Alberto Neves Candeias*

RESUMO

Utilizando a cepa de rotavírus SA-11, cultivada em células MA-104 e purificada em gradiente de CsCl, prepararam-se soros antirotavírus em cobaias para uso no diagnóstico de gastroenterites por rotavírus, através da reação de imunofluorescência indireta. Num total de 268 casos, obteve-se uma porcentagem de positividade de 14,93% (40 amostras). A comparação desta prova com o ensaio imunoenzimático (EIERA) e a eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), revelou boa concordância entre os três ensaios, com valores de *kappa* entre 0,72 e 0,76.

Palavras-chave: Rotavírus, imunofluorescência, gastroenterites

INTRODUÇÃO

Os rotavírus têm sido considerados como um dos principais agentes etiológicos de diarréias infantis e de recém-nascidos de várias espécies animais, principalmente mamíferos e aves (9). A existência de um antígeno de grupo, comum aos rotavírus do grupo A, situado na proteína VP6 do capsídeo interno da partícula viral (16), permite que cepas de rotavírus animais, cultiváveis, sejam utilizadas na produção de抗ígenos e antisoros usados na identificação de rotavírus humanos.

Os rotavírus têm sido identificados em material fecal através de uma variedade de técnicas laboratoriais, seja por exame direto por microscopia eletrônica (1,9), por análise de seu ácido nucléico através da eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) (7,14), ou ainda, através de reações imunológicas com a utilização de antisoros específicos, como o radioimunoensaio, o ensaio imunoenzimático e a reação de imunofluorescência (2,3,5,12).

As reações de imunofluorescência podem ser

feitas em biópsias, em culturas celulares inoculadas, ou, ainda, através de precipitação de complexos antígeno/anticorpo em amostras fecais (9). A imunofluorescência de amostras fecais inoculadas em culturas celulares preparadas em microplacas, permite o exame simultâneo de um grande número de amostras, com boa sensibilidade (1,2,30). Por outro lado, quando aplicada com antisoros específicos, permite a identificação dos sorotipos pela neutralização dos focos fluorescentes (16).

O presente trabalho teve por objetivos preparar anti-soro específico para rotavírus, a ser utilizado no diagnóstico laboratorial de gastroenterites infantis, usando-se reação de imunofluorescência indireta. Ao mesmo tempo, compararam-se os resultados obtidos por esta reação com as reações de ensaio imunoenzimático e eletroforese em gel de poliacrilamida.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras – Foram analisadas 268 amostras de

* Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
Departamento de Microbiologia — Av. Prof. Lineu Prestes, 1374. — São Paulo - SP

fezes, colhidas entre janeiro e dezembro de 1986, de crianças de 0 a 12 meses de idade, com quadros clínicos de diarréia. De cada amostra preparou-se uma suspensão 10-20% em tampão Tris/HCl 0,01M pH 7,3, com 1000U/ml de penicilina e 1000 µg/ml de estreptomicina, clarificadas com triclorotrifluoroetano (Freon TF, DuPont) e centrifugadas a 12.350g/20min. As suspensões foram conservadas a -20°C até o momento de uso.

Antígeno – A cepa SA-11 de rotavírus de macacos (Simian Agent Antígeno 11) foi cultivada em células MA-104 (rim de embrião de macaco Rhesus), em monocamada, com meio de Eagle em salina de Earle, sem soro, acrescido de 10µg/ml de tripsina (1:250-Difco). As culturas com efeito citopático total foram clarificadas e concentradas por ultracentrifugação a 100.000g/15 min, em ultracentrifuga Sorwall, DuPont, modelo OTD 75B, com rotor AH 627. O concentrado foi purificado em gradiente de CsCl 20 a 40%, em tampão Tris 0,05M, NaCl 0,15 M (TrisTN), em ultracentrifuga Beckmann, modelo L5-75, com rotor SW 65, 100.000 g por 24 horas. As alíquotas de densidade em torno de 1,36g/ml foram agrupadas, dialisadas contra tampão Tris TN e tituladas por hemaglutinação (12).

Soro anti-rotavírus – Obtido em cobaias inoculadas com 0,5 ml do rotavírus purificado, de densidade 1,36g/ml, com título hemaglutinante de 512 UHA/25µl, adicionado de 0,5 ml de Adjuvante Completo de Freund, por vias intradérmica e intramuscular. A produção de anticorpos foi medida através da reação de inibição da hemaglutinação (12).

Conjugado anti-γ-globulina de cobaia – Obtido em coelho, por inoculação via subcutânea de 0,5ml de suspensão de γ-globulina de cobaia precipitada, acrescida de Adjuvante Completo de Freund. O título de soro de coelho anti IgG de cobaia foi avaliado por prova de imunodifusão em gel de agar a 1% em salina. A conjugação do soro de coelho anti-g-globulina de cobaia, com isotiocianato de fluoresceína foi feita segundo técnica descrita por CAMARGO (6).

Titulação em bloco do soro e conjugado: o soro de cobaia anti-rotavírus e o conjugado foram titulados, simultaneamente, em placa de microtitulação de fundo chato (Nunc), recobertas com células MA-104, inoculadas com SA-11, utilizando-se a técnica da reação de imunofluorescência indireta descrita a seguir.

Reação de imunofluorescência indireta – As amostras fecais testadas pela reação de IFI, segundo técnica descrita por BRYDEN (2), com al-

gumas modificações: *Inoculação* - microplacas de fundo chato (Nunc), com monocamada de células MA-104, foram inoculadas com 25µl de cada suspensão de fezes, em duas diluições (1:4 e 1:16), em duplicata, acrescida de 75µl de meio de Eagle em salina de Earle, com 10µg/ml de tripsina e centrifugadas a 1.200g/1h, em centrifuga Beckmann, modelo TJ-6R, com rotor TH-4. A seguir, o inóculo foi decantado e as cavidades preenchidas com 100µl de meio de Eagle com 10µg/ml de tripsina e incubadas por 18h a 37°C. *Reação* - as placas foram lavadas com PBS 0,01M pH 7,2 e as células fixadas com metanol gelado. Soro de cobaia anti-rotavírus, diluído a 1:40, foi adicionado (50µl) a todas cavidades. Após incubação a 37°C por uma hora, as placas foram novamente lavadas e acrescidas de 50µl/cavidade de conjugado diluído a 1:20. Após a incubação a 37°C por hora, as placas foram lavadas e adicionadas de glicerina tamponada, pH 8,4 e imediatamente decantadas. A leitura da reação foi feita em microscópio de epifluorescência Microstar, Reichert-Jung.

Ensaio imunoenzimático para rotavírus e adenovírus (EIERA) – As amostras foram testadas pela técnica EIERA, seguindo a padronização feita por PEREIRA *et alii* (15), com reagentes fornecidos pelo Departamento de Virologia da FIO-CRUZ, utilizando-se placas de microtitulação de PVC, Hemobag.

Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) – A eletroforese foi feita segundo a técnica de LAEMLI, modificada por PEREIRA *et alii* (14), utilizando-se gel de poliacrilamida a 7,5%, tampão Tris-glicina, e uma corrente de 40mA por 4 a 5h. A coloração das bandas de RNA foi feita com nitrato de prata 0,011 M.

Análise estatística – Os resultados obtidos pela reação de IFI foram comparados com os obtidos pelo EIERA e pela EGPA, sendo estes dois usados como teste referência. Determinou-se a positividade e a concordância das reações, assim como o coeficiente estatístico de concordância k (kappa) (10).

RESULTADOS

A Figura 1 apresenta o perfil do gradiente de densidade de CsCl e os títulos hemaglutinantes das frações. A banda viral, obtida ao término da centrifugação dos gradientes, era visível na altura correspondente às alíquotas 16 a 19. Os títulos hemaglutinantes mais elevados corresponderam às frações 16, 17 e 18 do gradiente A e 17, 18 e

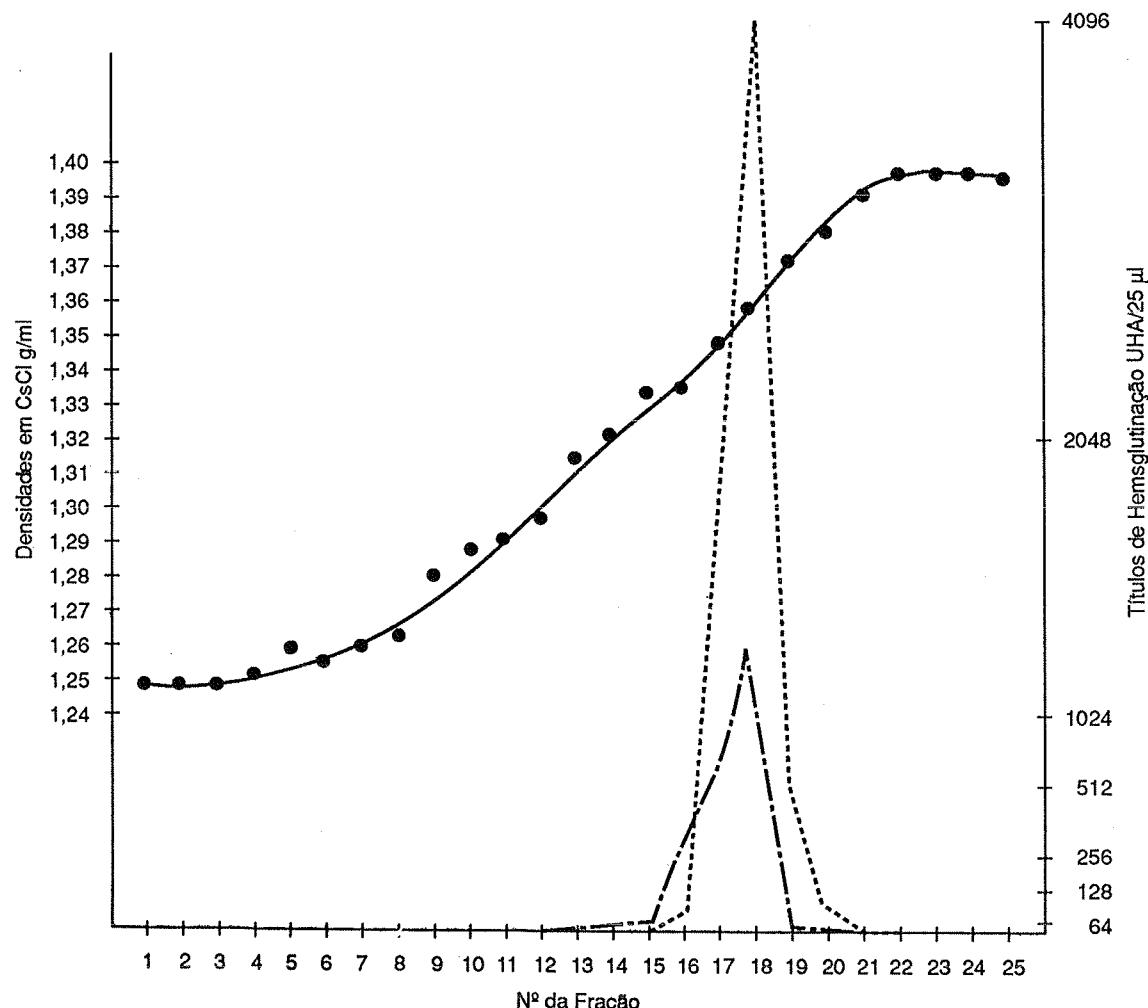


FIGURA 1 - Perfil do gradiente de CsCl 20-40%: (—) densidades de CsCl em g/ml (----) Títulos hemagglutinantes em UHA/25 μ l do gradiente A. (- - -) Títulos hemagglutinantes do gradiente B. São Paulo, 1987

19 do gradiente B. Quando comparados com os valores de densidade, notamos que a banda viral situou-se entre as frações de densidade 1,35 e 1,37 g/ml, com os títulos hemagglutinantes de cada fração, semelhante ao descrito por KALICA *et alii* (12).

Na titulação em bloco do soro anti-rotavírus e do conjugado, foram consideradas ideais para uso as maiores diluições que apresentaram fluorescência intensa granular, sem coloração de fundo, sendo 1:40 para soro-antirotavírus e 1:20 para o conjugado.

A reação de imunofluorescência indireta, padronizada com os reagentes preparados em nosso laboratório, foi utilizada para a análise de 268 amostras de fezes de casos de diarréia. Foram con-

sideradas positivas as amostras que apresentam 3 ou mais células com fluorescência citoplasmática, granular, em pelo menos uma das diluições testadas. Identificou-se, por IFI, 40 amostras como positivas para rotavírus (14,93%) e 228 como negativas (85,07).

Analizando conjuntamente os dados das três reações observamos que, no total, 54 amostras foram positivas para rotavírus, tendo a seguinte distribuição: 30 (55,56%) foram identificadas pelas três reações; 2 (3,7%) foram positivas por IFI e EGPA, 3 (5,56%) igualmente por IFI e EIERA, 7 (12,96%) foram positivas por EIERA e EGPA; 6 (11,11%) só por EIERA; 5 (9,26%) só por IFI e apenas 1 (1,85%) foi identificada só por EGPA (Fig.2).

Na tabela 1 comparamos os resultados obtidos pela IFI com EIERA. Das 46 amostras positivas por EIERA, 33 foram também positivas por IFI, copositividade de 72%. Das 222 amostras negativas por EIERA, 215 foram também negativas por IFI, conegeatividade igual a 97%. O coeficiente estatístico de concordância k (kappa) calculado foi de 0,72, indicando que a concordância foi maior que a obtida ao acaso, sendo $Z = 10,635$, significativo ao nível 0,005 com Z crítico = 2,813.

Na tabela 2 comparamos os resultados obtidos por IFI com os obtidos na EGPA: 32 amostras foram positivas pelas duas reações, sendo a copositividade igual a 80% e 220 amostras foram negativas pelas duas reações, com conegeatividade igual a 96%. O coeficiente de concordância k (kappa) foi de 0,76, sendo a concordância maior que a obtida ao acaso, significativa ao nível 0,005 com $Z = 8,549$, sendo Z crítico = 2,813.

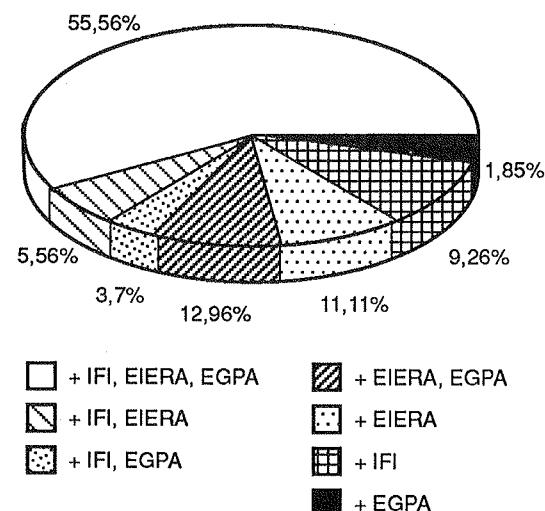


FIGURA 2 - Distribuição das 54 amostras positivas para rotavírus pelas reações de IFI, EIERA E EGPA. São Paulo, 1987.

TABELA 1 - Comparação entre a reação de imunofluorescência indireta (IFI) e o ensaio imunoenzimático (EIERA). Freqüência de reações positivas e negativas para rotavírus em casos de diarréia. São Paulo, 1987.

	IFI		EIERA		Total	
	Positivo N	%	Negativo N	%	N	%
IFI						
positivo	33*	12,31	7	2,62	40	14,93
negativo	13	4,85	215**	80,22	228	85,07
Total	46	17,16	222	82,84	268	100,00

* copositividade = 72%

** conegeatividade = 97%

coeficiente de concordância $k = 0,72$, sendo $Z = 10,635$

TABELA 2 - Comparação entre a reação de imunofluorescência indireta (IFI) e a eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA). Freqüência de reações positivas e negativas para rotavírus em casos de diarréia. São Paulo, 1987.

	IFI		EGPA		Total	
	Positivo N	%	Negativo N	%	N	%
IFI						
positivo	32*	11,94	8	2,99	40	14,93
negativo	8	2,99	220**	82,09	228	85,07
Total	40	14,93	222	85,07	268	100,00

* copositividade = 80%

** conegeatividade = 96%

coeficiente de concordância $k = 0,76$, sendo $Z = 8,549$

DISCUSSÃO

A reação de imunofluorescência indireta tem sido utilizada tanto para o diagnóstico de infecções por rotavírus (1,2,3) como para a identificação dos tipos sorológicos pela redução, por neutralização, do número de focos fluorescentes (16). Utilizamos a técnica descrita por BRYDEN *et alii* (2) com algumas modificações: ao invés da linhagem LLc-MK₂ preferimos a linhagem MA-104 (16). Na fase de inoculação das amostras utilizamos meio de Eagle em salina de Earle, sem soro, acrescido de 10 µg/ml de tripsina, em vez do meio de Eagle com 2% de soro, pelo considerável aumento de infeciosidade proporcionado pelo primeiro. A tripsina age sobre a proteína VP4 do capsídeo externo, clivando-a em duas outras proteínas a VP5* e a VP8*, aumentando a infeciosidade do inóculo (8,13), facilitando a penetração da partícula viral na célula (17). A eficiência de um inóculo pode ser melhorada, também, mediante sua centrifugação a 1.200g./60 min, sobre a cultura celular confluente (2).

A reação de IFI detecta partículas infeciosas capazes, portanto, de penetrar nas células e iniciar sua replicação no citoplasma, com síntese precoce de algumas proteínas virais. Mesmo que o ciclo replicativo não se complete, as proteínas virais podem ser detectadas no citoplasma, após 6 horas de inoculação. A fluorescência observada característica é de localização citoplasmática e granular. Nenhuma célula fluorescente foi observada nos controles não inoculados e nas amostras negativas, indicando que a contaminação accidental de cavidades vizinhas, na microplaca, não ocorreu em nossas operações. O número de células fluorescentes, que pode variar de 1 a mais de 100 por cavidade da microplaca, depende do número de partículas infeciosas presentes numa amostra, permitindo inferir o título da mesma em número de unidades formadoras de focos fluorescentes (11). A toxicidade de alguns espécimes é um dos maiores problemas desta reação, mas pode ser contornado com a diluição das amostras inoculadas (2).

A análise estatística dos resultados obtidos indicou que a copositividade da reação de IFI, quando comparada ao EIARA e à EGPA foi 72 e 80%, respectivamente, e a coneatividade de 97 e 96%. Os coeficientes de concordância observados foram significativamente maiores que os obtidos ao acaso. As pequenas discrepâncias observadas resultam apenas da diferença de sensibilidade de cada reação em função do número e tipo de partículas presentes em cada amostra.

A reação de imunofluorescência indireta mostrou ser técnica sensível e específica. Não supera a praticidade e sensibilidade do EIARA, no entanto, permite, não apenas a indicação da presença de rotavírus numa amostra como, principalmente, a detecção de partículas infeciosas. Esta última característica faz da reação uma técnica de escolha para o estudo de rotavírus de amostras laboratoriais de água, esgoto e alimentos, onde é importante a determinação do número de partículas viáveis (11).

SUMMARY

The indirect immunofluorescence assay in the diagnosis of human rotavirus gastroenteritis

Rotavirus is the most frequently implicated etiological agent in infectious diarrhea in children. Several laboratory techniques were used to identify this virus in fecal material. This indirect immunofluorescence assay described by BRIDEN *et alii* (2) was used in the work, with some modifications, to study the frequency of rotavirus in infectious diarrhea. The results were compared with those obtained with the enzyme immunoassay (EIARA) and the polyacrylamid gel electrophoresis (PAGE).

The SA-11 strain of simian rotavirus was cultivated in MA-104 cells, in Eagle's MEM, without serum, with 10 µg/ml of trypsin (1:250 Difco). The cultures with total cytopathic effect were clarified with Freon TF, DuPont. The virus was concentrated by ultracentrifugation at 100.000 g/15 min (Sorwall centrifuge OTD-75B with AH 627 rotor) and then purified in a 20-40% Cesium-chloride gradient in Tris 0,05M, NaCl 0,15M buffer at 100.000 g/24h in a Beckmann L5-74 ultracentrifuge with SW 65 rotor. This purified virus was used to prepare, in guinea-pigs, rotavirus antisera. Purified guinea-pig globulin was inoculated by subcutaneous route in rabbits to obtain antiguinea pig γ-globulin anti-serum which was conjugated with fluorescein-isotiocianate (6).

Fecal specimens were collected from 268 children, under one year of age, with acute diarrhea. Approximately 20% suspensions were made in Tris/HCl 0,01M pH 7,4 buffer, containing 15 mM CaCl₂, 1.000 U/ml penicillin and 1.000 µg/ml of streptomycin. The suspensions were clarified by centrifugation at 12.350g/20min after homogeni-

zation with Freon TF, DuPont. The supernates were examined as described below, immediately or after storage at -20°C.

The immunofluorescence reaction was performed in polystyrene microtitration plates (NUNC), with 96 wells, coated with MA-104 cells monolayer. An 25 µl amount of 20% fecal suspensions was inoculated in 2 wells, diluted at 1:4, and 25 µl in other 2 wells diluted at 1:16. The wells were filled with 75 µl of Eagle's MEM with 10µg/ml of trypsin. The plates were centrifuged for 1 h at 1.200g in Beckmann TJ-6R centrifuge, with TH-4 rotor. The inoculum was poured out, the wells refilled with fresh medium, and the plates incubated at 37°C for 18h. After incubation the plates were washed in PBS 0,01M pH 7,2, fixed with frozen metanol and allowed to dry. The infected monolayers were then treated with guinea-pig antirotavirus serum, diluted 1 in 40 (50µl/well), at 37°C. After 60 min, plates were washed in PBS and stained for 60 min at 37°C with the fluorescein-conjugated rabbit anti-guinea-pig serum, diluted 1 in 20 (50µl/well). After this period plates were washed in PBS, and allowed to dry. Readings of the fluorescence were performed in a Reichert-Jung, Microstar epifluorescent microscope. Samples with more than 3 cells with cytoplasmic granular fluorescence were regarded as positive.

Enzyme-immunoassays were performed by double antibody sandwich technique with the EIA-RA/FIOCRUZ kit by the technique described by PEREIRA *et alii* (15). Electrophoresis was carried out by LAEMLI's technique with modifications described by PEREIRA *et alii* (14). Slab gels were stained by silver impregnation. Rotavirus antigen could be detected in 40 out the 268 fecal samples (14,93%) by IF and PAGE, and in 46 (17,16%) by EIARA. A comparison between the three assays revealed a large percentage of agreement (72%). The results obtained were analysed using statistic kappa and the values obtained were between 0,72 and 0,76.

Key Words: rotavirus, immunofluorescence, diarrhea

AGRADECIMENTOS

À Seção de Genética Humana do Instituto Butantan, SP, pela cessão de Ultracentrífuga DuPont. A Dra. Maria Lucia Rácz pelas valiosas sugestões técnicas. Ao Cristóvão Alves da Costa pela elektroforese das amostras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bryden, A.S. – Comparison of electron microscopy and immunofluorescence in cell culture for rotavirus detection. *J.Clin. Path.*, 33: 413-5, 1980
2. Bryden, A.S.; Davies, H. A.; Thouless, M.E. & Flewett, T.H. – Diagnosis of rotavirus infection by cell culture. *J. Med. Microbiol.*, 10: 121-5, 1977.
3. Candeias, J.A.N.; Baldacci, E.R.; Breviglieri, J.C.; Grisis, S.J.E.; Rácz, M.L. & HÁRSI, C.M. – Diagnóstico de infecções por rotavírus através da reação de imunofluorescência indireta. *Rev. Microbiol.* (S.Paulo) 11: 76-8, 1980.
4. Candeias, J.A.N.; Rácz, M.L.; Trabulsi, L.R. & Murakowski, J. – Relative prevalence of rotavirus diarrhea in children attending outpatient departments and private clinics in S. Paulo, Brazil. *J. Diarrhoeal Dis Res.*, 7:24-7, 1989.
5. Candeias, J.A.N.; Fagundes Neto, U.; Rácz, M.L.; Pedra, M.A.; Ferreira, V.C. & Trabulsi, L.R. – Rotavirus identification in jejunal juice and stools of acute and acute and chronic forms of infantile gastroenteritis. *Brazilian J.Med. Biol. Res.*, 22: 833-9, 1989.
6. Camargo, M.E. – Introdução às técnicas de imunofluorescência. *Rev. Bras. Pal.Clin.*, 10: 57-169, 1974.
7. Costa, C.A. & Candeias, J.A.N. – Eletroferotípos de rotavírus em crianças com e sem quadros de gastroenterite. *Rev. Saúde públ.* (S.Paulo), in press.
8. Espejo, R.T., LÓPES, S. & Arias, C. – Strutural polypeptides of Simian Rotavirus SA11 and the effect of trypsin. *J.Viro.*, 37: 156-60, 1981.
9. Estes, M.K.; Palmer, E.L. & Obijeski, J.F. – Rotavirus: a Review. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, 105: 123-84, 1983.
10. Fleiss, J.L. – The measurement and control of misclassification error. In: STATISTICAL methods for rates and proportions. New York, John Wiley, 1973. p. 140-54.
11. Hejkal, T.W.; Smith, E.M. & Gerba, C.P. – Seasonal occurrence of rotavirus in sewage. *Appl. Environ. Microbiol.*, 16: 473-7, 1982
12. Kalica, A.R.; James Jr., H.D. & Kapikian, A.Z. – Hemagglutination by Simian Rotavirus. *J.clin Microbiol.*, 7: 314-5, 1978.
13. LÓPES, S., Arias, C.F.; Bell, J.R.; Strauss, J.H. & Espejo, R.T. – Preliminary Structure of the cleavage Site associated with Trypsin Enhancement of Rotavirus SA-11. *Infectivity Virology*, 144: 11,9, 1985.
14. Pereira, H.G.; Azeredo, R.S.; Leite, J.P.G.; Candeias, J.A.N.; Rácz, M.L.; Linhares, A.C.; Gabbay, Y.B. & Trabulsi, J.R. – Electrophoretic study of the genome of human rotavirus from Rio de Janeiro, São Paulo and Pará, Brazil. *J. Hyg., (Lond.)* 90: 117-25, 1983.
15. Pereira, H.G.; Azeredo, R.S.; Leite, J.P.G.; Andrade, Z.P. & De Castro, L. – A combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA). *J. virol. Methods*. 10: 21-8, 1985.
16. Sato, K.; Inaba, Y.; Miura, Y.; Tokuhisa, S. & Matumoto, M. – Antigenic Relationships Between Rotaviruses from Different Species as Studied by Neutralization and Immunofluorescence. *Arch. Virol.*, 73:50, 1982.
17. Suzuki, H.; Kitaoka, S.; Konno, T., & Ishida, N. – Two modes of human Rotavirus Entry into MA-104 Cells. *Arch. Virol.*, 85: 25-34, 1985.

Recebido para publicação em 23/03/90

CAMPYLOBACTER EM CÃES COM E SEM DIARRÉIA: INCIDÊNCIA E SUSCETIBILIDADE A 21 ANTIMICROBIANOS

José Rafael Modolo¹

Arnold Frederico Gottschalk¹

Gilberti Moreno²

Carlos Alberto de Magalhães Lopes²

Luiz Florence Margatho³

Claudia Del Fava⁴

RESUMO

Foram examinadas para pesquisa de *Campylobacter*, 102 amostras de fezes de cães de ambulatório com diarréia (0 - 12 meses de idade) e 102 amostras de cães errantes sem diarréia (com idade indeterminada). No grupo com diarréia, o *Campylobacter* foi isolado em 46% dos animais, notando-se tendência nos cães de até cinco meses de idade estarem mais acometidos pelo microrganismo (72%) e de 6% nos com apenas uma semana de vida. As 47 estirpes isoladas dos cães com diarréia foram classificadas como sendo: *C. jejuni* biotipo₁ (49%); *C. jejuni* biotipo₂ (11%); *C. jejuni/coli* (19%); *C. coli* (8,5%), NARTC - grupo (8,5%) e *C. sputorum* (4%). No grupo sem diarréia a incidência foi de 28% sendo as 27 estirpes isoladas classificadas como: *C. jejuni* biotipo₁ (34%) e biotipo₂ (28%); *C. jejuni/coli* (24%) e *C. coli* (14%). Nas provas bioquímicas, o teste de tolerância a 1% de glicina falhou em 45% das estirpes classificadas fenotipicamente como *C. jejuni* e três estirpes não reduziram o selenito de sódio. Duas estirpes do NARTC-grupo, mostraram ainda reações fenotípicas cruzadas com *C. jejuni* e *C. coli* e duas de *C. jejuni* também cresceram a 25° C. As 76 estirpes isoladas foram sensíveis à gentamicina, à nitrofurantoína e à neomicina e resistentes à oxacilina e à penicilina. Para as 16 drogas restantes testadas a resistência bacteriana variou entre 8% a 73% das amostras. A presença de *Campylobacter* nos cães pode evidenciar o risco de infecção ao homem, sendo por esse fato a campilobacteriose também frequentemente citada como importante zoonose.

Palavras-chave: *Campylobacter*, incidência, cães, sensibilidade a antimicrobianos.

INTRODUÇÃO

A campilobacteriose tem sido apontada nos últimos anos como uma das principais zoonoses, cujos agentes são causadores, principalmente, de

diarréia(2,3). Entretanto, infecções extra-intestinais também tem sido relatadas, incluindo: meningite, artrite séptica, pericardite e abortamento(12,13,17). Blaser & col.(3), referiram que em 11 estados americanos, o *Campylobacter* foi a bactéria mais isola-

1. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu - Caixa Postal 542 - 18610 - Rubião Junior - SP - Brasil
2. Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu
3. Instituto Biológico de São Paulo - Seção Laboratório de Bauru - SP,
4. Bolsista da FUNDAF para aprimoramento em Residência Veterinária na FMVZ/UNESP - Botucatu.

da em pacientes humanos com diarréia. Semelhantes observações também foram verificadas por Kaijser & Suedhen(11) no "Institute of Medical Microbiology, University of Gotemborg - Suécia". O cão e o gato tem sido apontados como uma das mais importantes fontes de infecção de campilobacteriose ao homem(3,9,23). Esse dado também foi confirmado por Young(23) ao reportar que 94 pacientes humanos com campilobacteriose, tinham cães e gatos como animais de estimação e que o *Campylobacter* foi isolado em 59% desses animais.

Caracterizando o cão e o gato importante papel como fonte de infecção em saúde pública, o objetivo do trabalho foi identificar quais as espécies de *Campylobacter* que mais acometem os cães domésticos e errantes, bem como realizar testes de suscetibilidade bacteriana à drogas, indicando-se possibilidades terapêuticas e evidencian- do a importância potencial do cão na transmissão da campilobacteriose ao homem.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram examinadas 102 amostras de fezes de cães com e 102 sem diarréia. As fezes de cães com diarréia foram colhidos no ambulatório da Disciplina de Enfermidades Infecciosas dos Animais Domésticos, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-UNESP-Campus de Botucatu, durante o atendimento clínico e anotando-se as idades dos animais. As fezes de cães sem diarréia foram colhidas no canil do "campus" universitário, durante o início da quarentena dos cães errantes capturados, sendo estes de idade indeterminada. Logo após a colheita, as fezes foram semeadas em placas contendo (TSBA) agar tioglicolato enriquecido com 20% de sangue bovino e suplemento antibiótico de Butzler (bacitracina, novobiocina, cicloheximida, colistina e cefazolina) (4). A seguir, 1 g de fezes foi suspenso em 9 ml de solução fisiológica, centrifugado a 2500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante filtrado em filtro de acetato de celulose (0,65 uM/) e 5 gotas foram semeadas em placas contendo (TSB) agar tioglicolato adicionado de 20% de sangue bovino. A microaerofilia para a incubação do *Campylobacter*, foi obtida através de interligações entre o dessecador à vácuo, o cilindro de gás contendo 5% de CO₂ e 95% de N₂, o vacuômetro e a bomba de vácuo, de modo que após a retirada do ar ambiental do dessecador e a respectiva introdução da mistura gasosa, obtinha-se uma pressão final de 0,2 atm da mistura de gases. As placas de TSB foram incubadas a 37°C e as seletivas de Butzler (TSBA) a 43°C por 72 ho-

ras. Após o período de incubação as colônias cresci- das foram examinadas ao microscópio de contraste de fase (1000 x), observando-se as características morfológicas e a movimentação típica de espirilo. A confirmação e classificação do *Campylobacter* foram feitas com as seguintes provas bioquímicas: 1) prova da catalase a 1:1 com H₂O₂ a 3%(27); 2) crescimento a 25°C e a 43°C(32); 3) crescimento em 3,5% de NaCl(24); 4) produção de H₂S em papel de acetato de chumbo, em meio com 0,02% de cisteína e em meio sem cisteína (24,27); 5) redução do sele- nito de sódio a 1%(26); 6) hidrólise do hipurato de sódio a 1% e adicionado com 3,5% de ninhidrina em 1:1 de acetona e n-butanol(7); 7) resistência a 30 mcg de (NA) ácido nalidíxico NARTC*(26); 8) tol- erância ao 2', 3' 5' cloreto de trifeniltetrazolio (TTC)(27); 9) crescimento em 1% de glicina(24, 27). O teste de suscetibilidade bacteriana a 21 anti- microbianos foi realizado conforme a técnica da difusão da droga em gel a partir de discos impregnados com concentrações conhecidas e padronizadas para cada droga e descrita por Bauer & cols.(1). Para o inóculo utilizou-se 100 uL de suspensão de cultura pura de *Campylobacter* (escala 0,5 McFarland) em superfície de placas contendo TSB e incubação em microaerofilia. As drogas utilizadas no teste de sus- cetibilidade encontram-se na Tabela 4.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No contexto de saúde pública, sob o risco da *Campylobacter*-infecção aos seres humanos, o cão tem sido apontado como reservatório para a infecção(28). A análise de nossos resultados (Tabe- la 1) demonstra uma tendência dos cães com

TABELA 1 – Isolamento de *Campylobacter* em 47 cães com diarréia em relação a faixa etária. Botucatu, 1985-88

Idade	Nº de cães positivos	% de <i>Campylobacter</i>
0 - 1 semana	3	6
1 mês	8	17
2 meses	9	19
3 meses	6	13
4 meses	4	8,5
5 meses	4	8,5
6 - 12 meses	13	28

* NART - Nalidixic Acid Resistant Thermophilic *Campylobacter*.

TABELA 2 - Identificação bioquímica de 47 estirpes de *Campylobacter* isoladas de cães com diarréia. Botucatu, 1985-88

Identificação	<i>C. jejuni</i>		<i>C. jejuni/coli</i>	<i>C. coli</i>	NARTC-GRUPO	<i>C. sputorum</i>
Características	Biotipo 1	Biotipo 2				
Catalase	++++	++	+	++	++	-
Crescimento a 25°C	--+	--	-	--	--	+
43°C	++++	++	+	++	++	+
Crescimento em 1% de glicina	-+--	++	-	--	--	-
3,5% de NaCl	----	--	-	--	--	+
Produção de H ₂ S com cisteína	++++	++	+	++	++	+
sem cisteína	---	++	-	++	++	+
Hidrólise do hipurato	++++	++	+	--	--	-
Tolerância ao TTC	--	--	+	++	--	-
Resistência ao NA	----	--	-	--	--	-
Redução do selenito	++-	++	+	--	--	+
Nº de estirpes	14/4/3/4	3/2	9	3/1	2/2	2
Total (%)	23(49)	5(19)	(19)	4(8,5)	4,85	(4)

Símbolos: vide metodologia

diarréia da faixa etária de até cinco meses de estarem mais acometidos pelo *Campylobacter*, (72%). Fox(6), Nair e col.(16) e Seifert & Weber(22) referindo-se apenas ao *Campylobacter jejuni* também verificaram a mesma tendência. Todavia, a frequência de isolamento de *Campylobacter* nos cães com diarréia (46%), diverge das encontradas por outros autores(5,8,10). Prescott (19), assinalou que diferenças de resultados de isolamento de *Campylobacter* em cães com infecção intestinal, dependem da idade e do ambiente em que vivem. Observando-se ainda a Tabela 1, é importante destacar que 6% dos cães com apenas uma semana de vida e com diarréia estavam colonizados pelo *Campylobacter*.

Na presente investigação, quanto ao encontro de biotipos de *Campylobacter jejuni* nos animais, verificou-se que 33 (43%) estirpes correspondem ao biotipo₁ e 16 (21%) ao biotipo₂. A maior freqüência de encontro do biotipo₁ do *Campylobacter jejuni* também foi verificada por Skirrow (23). Porém, o encontro do biotipo₂ nos cães sem diarréia (28%) foi mais frequente do que nos cães com diarréia (11%) (Tabelas 3 e 2). Analisando-se a Tabela 2, é importante destacar duas (4%) estirpes de *Campylobacter sputorum* isoladas de cães com diarréia, por não terem sido encontradas na literatura consultada referências sobre o seu encontro em cães e, também por terem sido encontradas linhagens de *Campylobacter* pertencentes ao NARTC-grupo (8,5%) somente no grupo de cães com diarréia.

TABELA 3 - Identificação bioquímica de 29 estirpes de *Campylobacter* isoladas de cães sem diarréia. Botucatu, 1985-88

Identificação	<i>C. jejuni</i>		<i>C. jejuni/coli</i>	<i>C. coli</i>
	Biotipo ₁	Biotipo ₂		
Características				
Catalase	++	+	+	++
Crescimento a 25°C	--	-	-	--
43°C	++	+	+	+
Crescimento em 1% de glicina	-+	-	-	--
3,5% de NaCl	--	-	-	--
Produção de H ₂ S com cisteína	++	+	+	++
sem cisteína	--	+	+	--
Hidrólise do hipurato	++	+	+	--
Tolerância ao TTC	-	-	+	--
Resistência ao NA	-	-	-	--
Redução do selenito	++	+	+	--
Nº de estirpes	7/3	8	7	3/1
Total (%)	10(34)	(28)	(24)	4(14)

Símbolos: vide metodologia

Com relação ao comportamento bioquímico das estirpes de *Campylobacter* isoladas (Tabelas 2 e 3), algumas apresentaram-se fisiologicamente atípicas. A prova de tolerância a 1% de glicina failhou em 45% das estirpes classificadas como *C. jejuni*. Com relação as estirpes do grupo *Campylobacter jejuni/coli* não foi possível observar nítida separação entre elas, pois coincidiram nos resultados

positivos à hidrólise do hipurato e ao crescimento em meio com TTC. Provavelmente essas estirpes merecem novos estudos com finalidade de incluí-las num possível novo biotipo de *Campylobacter jejuni*. Três estirpes (4%) que não reduziram o selenito de sódio, foram classificadas como *Campylobacter jejuni* biotipo₁, pois mostraram nas demais provas comportamentos fenotípicos compatíveis com a espécie. Os resultados referentes a temperatura de crescimento revelaram que duas (3%) estirpes termófilas de *Campylobacter jejuni* cresceram também a 25°C e que metade das estirpes classificadas como NARTC-grupo, mostraram reações cruzadas com o *Campylobacter jejuni* e com o *Campylobacter coli*. Em bezerros com e sem diarréia também foram encontradas estirpes de *Campylobacter* com comportamentos fenotípicos intermediários semelhantes aos isolados em cães (14).

As 76 estirpes de *Campylobacter* isoladas de cães mostraram ainda total sensibilidade à gentamicina, nitrofurantoína e à neomicina (Tabela 4), assemelhando-se assim aos resultados encontrados para estirpes isoladas de bezerros, onde os mesmos antimicrobianos também revelaram-se eficientes(19). Todas as estirpes foram resistentes à oxacilina e à penicilina-G e em relação às demais drogas, apresentaram padrão de resistência populacional variando de 8% a 73%. Grande variação na

TABELA 4 - Suscetibilidade de 76 estirpes de *Campylobacter* de cães com e sem diarréia a 21 drogas antimicrobianas. Botucatu, 1985-88

Drogas	mcg	% de amostras resistentes
Gentamicina	10	0
Nitrofurantoína	300	0
Neomicina	30	0
Estreptomicina	10	8
Sisomicina	10	8
Canamicina	30	9
Tetraciclina	30	15
Ceftriaxona	30	16
Cefalexina	30	25
Oleandomicina	15	25
Dicloxacilina	5	25
Cloranfenicol	30	29
Cefaloridina	30	33
Polimixina-B	300 u. i.	33
Colistina	10	42
Novobiocina	30	50
Rifampicina	5	58
Ampicilina	10	66
Sulfonamida	300	73
Oxacilina	5	100
Penicilina-G	10 u. i.	100

suscetibilidade de *Campylobacter* a diferentes drogas antimicrobianas, também foi verificada por Hasselbach & col.(8), Modolo & col.(15), Primavesi(20) e Rubsam(21).

De um modo geral, os microrganismos do gênero *Campylobacter* demonstraram prevalência considerável nos cães com e sem diarréia 46% e 28%, respectivamente, indicando o fato que a população humana em nosso meio pode efetivamente correr o risco em contrair a *Campylobacter*-infecção através do convívio com esses animais, sendo por esse motivo, a campilobacterose também apontada como uma importante zoonose(2).

SUMMARY

Incidence of *Campylobacter* in stools of diarrheic and non-diarrheic dogs

Two hundred and four stools of 102 diarrheic (0 - 12 months of age) and 102 non-diarrheic dogs coming from kennel and ambulatory, respectively, were assayed for the presence of *Campylobacter*. From the diarrheic group, 46% of the samples yielded positive *Campylobacter* isolation mainly found in young animals until 5 months of age (72%), whereas those with age ranging from 6 - 12 months showed either a lower frequency of the organisms (28%) and a trend of the younger animals to be more charged than the older. 47 *Campylobacter* strains isolated from the diarrheic group were: *C. jejuni* biotype₁ (49%); *C. jejuni* biotype₂ (11%); *C. jejuni/coli* (19%); *C. coli* (8,5%); *Campylobacter* NARTC group (8,5%) and *C. sputorius* (4%). In the non-diarrheic group, 27 (28%) *Campylobacter* strains were classified as: *C. jejuni* biotype₁ (34%) and biotype₂ (28%); *C. jejuni/coli* (24%) and *C. coli* (14%). According the biochemical tests, the 1% glycine tolerance test was not taking in account for the differentiation of *C. jejuni* because 45% of the strains failed in showing characteristic and 3 strains did not reduce the sodium selenite. The biochemical studies also showed phenotypic cross reactions between two *Campylobacter* NARTC-group strains with the *C. jejuni* strains, as well as two thermophilic species grew also at 25°C. All the 76 isolates were sensitive to gentamicin, nitrofurantoin and neomycin and resistant to oxacillin and penicillin. Furthermore, for the remaining 16 drugs the populational resistance ranged from 8% to 73% of strains. The presence of *Campylobacter* in dogs as well their close contact which man makes possible the occurrence of

infections as also confirm the campylobacteriosis as an important zoonosis.

Key Words: *Campylobacter*, dogs, incidence, antimicrobial susceptibility.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos colegas da Disciplina de Enfermidades Infecciosas dos Animais, FMVZ pela colaboração prestada e a Marcio Contrim e Sonia Maria Faraldo pelo excelente trabalho datilográfico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bauer, A.W.; Kirby, M.M.W.; Scherris, C.; Turck, M. - Antimicrobial susceptibility testing by a standartized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45:493-496, 1966.
- Behrens, R.; Kist, M.; Helwing, H. - Campylobacterinfektion bei kindern. *Immun. Infek.*, 11:55-60, 1983.
- Blaser, M.; Roberts, W.; Cravens, J.; Wang, W.L. - *Campylobacter* enteritis with canine infection. *Lancet.*, 2: 707, 1978.
- Butzler, J.P. & Skirrow, M.B. - *Campylobacter* enteritis. *Clin. Gastroenterol.*, 8:737-765, 1979.
- Fleming, M.P. - Incidence of *Campylobacter* infection in dogs. *Vet. Rec.*, 10:202, 1980.
- Fox, J.G. - *Campylobacter jejuni* associated diarrhoea in dog. *J. Amer. vet. med. Ass.*, 183:1430-1433, 1983.
- Harvey, S.M. - Hippurate hidrolysis by *Campylobacter fetus*. *J. clin. Microbiol.*, 11:435-437, 1980.
- Hasselbach, P.; Kirpal, G.; Görgen, M.; Bisping, W. - Untersuchungen zum Vorkommen von Keimen der Gattung *Campylobacter* bei Schweinen Teil II: Kulturelles Verhalten, Differenzierung und Resistenzprüfung der isolierten *Campylobacter*-Stämme. *Berl. Münch. tierärztl. Wschr.*, 97:113-119, 1984.
- Holt, P.B. - Role of *Campylobacter* spp in human and animal disease. *J. Roy Soc. Med.*, 74:437-440, 1981.
- Hosie, B.D.; Nicolson, T.B.; Henderson, D.B. - *Campylobacter* infections in normal and diarrhoeic dogs. *Vet. Rec.*, 105: 80, 1979.
- Kaijser, B.; Suedhem, A. - *Campylobacter jejuni*: a common cause of diarrhoea in Sweden. In: Newell, D.G. ed. *Campylobacter*, epidemiology, pathogenesis and biochemistry. Lancaster, Boston, MTP Press, 1982.
- Killan, H.A.W.; Crowder, J.G.; Shite, A.C.; Edmonds, J.N. - Pericarditis due to *Vibrio fetus*. *Amer. J. Cardiol.*, 17:723-728, 1966.
- Kist, M.; Keller, K.M.; Niebling, W.; Kilching, H. - *Campylobacter coli* septicaemia associated with septic abortion. *Infection*, 12:88-90, 1984.
- Modolo, J.R.; Bisping, W.; Kirpal, G. - Características bioquímicas de *Campylobacter* isolados de bezerros com e sem diarréia. *Rev. Microbiol.*, 19:1-5, 1988.
- Modolo, J.R.; Bisping, W.; Kirpal, G. - Suscetibilidade "in vitro" de *Campylobacter* isolado de bezerros contra 22 antimicrobianos. *Rev. Microbiol.*, 20:391-395, 1989.
- Nair, G.B.; Sarkar, R.K.; Chowdhury, S.; Pal, S.C. - *Campylobacter* infection in domestic dogs. *Vet. Rec.*, 116:237-238, 1985.
- Norby, R.; McCloskey, R.V.; Zachrisson, G.; Falsen, B. - Meningitis caused by *Campylobacter fetus* ssp *jejuni*. *Brit. med. J.*, 280:1164, 1980.
- Oslon, P.; Sanstedt, K. - *Campylobacter* in the dog: a clinical and experimental study. *Vet. Rec.*, 1:99-101, 1987.
- Prescott, J.P. - *Campylobacter jejuni* in man and domestic animals. *J. Amer. vet. med. Ass.*, 198:1524-1530, 1982.
- Primavesi, C.H. - Untersuchungen zur Antibiotikaempfindlichkeit von *Campylobacter jejuni*. *Hyg. Med.*, 8:138-146, 1983.
- Rübsamen, S. - Über den Nachweis von *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* aus mehreren Tierspezies mit und ohne Enteritiden bei Verwendung verschiedener Antibiotika-Suplement vergleichend. *Tierarztl. Umschan.*, 41:134-140, 1986.
- Seifert, U.; Weber, A. - Nachweis von *Campylobacter jejuni* bei Hunden und Katzen mit ohne Enteritiden. *Kleintier-Prax.*, 28:371-374, 1983.
- Skirrow, M.B. - *Campylobacter enteritis*: a "new" disease. *Brit. med. J.*, 2:9-11, 1977.
- Smibert, R.M. - Family Spirallaceae, genus *Campylobacter* in: Bergey's manual of determinative bacteriology 8 ed. Williams & Wilkens Company, Baltimore, 1974.
- Young, S.E.J. - Human *Campylobacter* infection 1977-1980. National data on based routine laboratory reporting. In: Newell, D.G. ed. *Campylobacter* epidemiology, pathogenesis and biochemistry. Lancaster, Boston, MTP Press, 1982.
- Weber, A.; Lembeck, C.; Kettner, A. - Nachweis von *Campylobacter jejuni* in Kotproben von Klinisch gesunden Briwtauben. *Berl. Münch. tierärztl. Wschr.*, 94:449-451, 1981.
- Veron, M.R.; Chatelain, R. - Taxonomic study of the genus *Campylobacter* Sebald and Veron and designation of the neotype strain for type species *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Veron. *Int. J. sist. Bact.*, 23:122-134, 1973.

Recebido para publicação em 23/03/90

CONSERVAÇÃO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *HAEMOPHILUS*

Angela Cristina Rodrigues Ghilardi¹
Marina Ortolan¹
Elizabeth Natal De Gaspari²

RESUMO

Há vários métodos de preservação de microrganismos e nem sempre é fácil a escolha do método mais adequado. Descrevemos neste trabalho um estudo comparativo com *Haemophilus influenzae* (biogrupo aegyptius) e *Haemophilus influenzae* b preservados por liofilização e conservação em miçangas (pérolas de vidro).

Conservamos, com sucesso, estes microrganismos por um ano em miçangas de forma semelhante a liofilização, porém com as seguintes vantagens: o método é simples de ser executado; centenas de raças podem ser aramazenadas por longos períodos em pequeno espaço; a recuperação das culturas é rápida com pouca ou nenhuma perturbação de outras culturas estocadas; somente uma porção de cultura é removida e descongelada ao passo que as demais permanecem congeladas; as miçangas descongelam rapidamente quando colocadas em meio sólido e a recuperação é imediata.

Palavras-chave: *Haemophilus*, conservação.

INTRODUÇÃO

A manutenção de microrganismos em uma coleção de culturas é de grande importância, pois não é suficiente que estes permaneçam apenas vivos, mas é extremamente relevante que estejam puros e semelhantes à linhagem original.

A morte celular pode ocorrer durante o processo de preservação e também durante a estocagem, sendo assim mudanças nas características originais podem acontecer através de mutações, perdas de plasmídio, razão pela qual o método utilizado para manutenção deverá minimizar a ocorrência desses eventos (11).

O processo de liofilização vem sendo utilizado há anos para preservação de uma grande variedade de componentes biológicos e microrganismos (10). A maior vantagem de sua utilização sobre outros métodos, consiste no fato de que o

material pode ser mantido estável por longos períodos não havendo a necessidade de condições especiais de estocagem. Ademais a distribuição de cepas para a comunidade interessada é imediata, não requerendo uma avaliação prévia.

A maioria das bactérias sobrevivem bem a liofilização mas alguns gêneros podem às vezes mostrar resultados menos satisfatórios. De acordo com dados descritos na literatura o gênero *Haemophilus* é assim considerado. Esses dados mostraram que várias espécies liofilizadas destes, inclusive o biogrupo aegyptius apresentaram uma diminuição na potência logarítmica na contagem após o processo de liofilização e durante a estocagem, no período de um ano (8).

Os métodos de preservação por congelação na faixa de -60° a -70° C vem sendo rotineiramente utilizados em diferentes laboratórios devido a disponibilidade de equipamentos, entretanto apresen-

1. Seção de Coleção de Cultura - Instituto Adolfo Lutz - 01246 - São Paulo - São Paulo - Brasil
2. Seção de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz - 01246 - São Paulo - São Paulo - Brasil.

tam desvantagens atribuídas aos possíveis danos ocasionados pelos repetidos processos de congelamento e descongelamento das amostras. Um método alternativo foi descrito (6) baseado no uso de suspensões bacterianas congeladas em miçangas para contornar este problema. As bactérias podem ser divididas em sensíveis e resistentes podendo-se atribuir aos gêneros *Haemophilus* e *Neisseria* uma maior sensibilidade.

O *Haemophilus influenzae* biogrupo aegyptius é o agente etiológico da febre purpúrica brasileira uma doença pediátrica fatal causada por uma infecção sistêmica que ainda não tem totalmente elucidados os elementos responsáveis pela sua patogenicidade (12) assim como o aspecto epidemiológico da doença no Brasil.

Desse modo na falta de dados mais consistentes quanto a avaliação dos referidos métodos de preservação objetivou-se neste trabalho um estudo comparativo de métodos de preservação de micro-organismos de gênero *Haemophilus* que se encontram há mais de uma ano estocados na coleção de cultura do IAL liofilizados e congelados em miçangas à -70°C.

MATERIAL E MÉTODOS

Bactérias – Foram estudadas: a. cepas epidêmicas de *Haemophilus influenzae* (biogrupo aegyptius) isoladas de sangue de pacientes durante a epidemia de febre purpúrica.
b. cepa padrão de *H. aegyptius* ATCC 111 116 (1).
c. cepa padrão de *H. influenzae* b

Cultivo – As bactérias foram cultivadas em tubos ou em placas de ágar BHI chocolate (Brain Heart Infusion - Difco) contendo 10% de sangue de cavalo, a 37°C, 18 a 24 horas em condições de microaerofilia.

Substâncias Crioprotetoras – Como crioprotetores foram utilizados: glicerol a 15% (Merk) em caldo nutritivo v/v; leite desnatado 10% (Nestlé), acrescido de glutamato de sódio 5% (Ajinomoto) (4).

Métodos de preservação – Liofilização – Após crescimento em placas de agar BHI chocolate aproximadamente 10^9 bac/ml foram ressuspensas em leite desnatado 10% com 5% de glutamato de sódio e a distribuição feita em ampolas de vidro com capacidade para 1 ml.

O material foi processado conforme normas gerais de liofilização para produtos biológicos (10), em um aparelho modelo 30P 2 (Edward's-England), por um período de duração aproximada

de 40 horas. Após liofilização as ampolas foram estocadas a 4°C.

Em miçangas – Preparo das miçangas – Miçangas importadas, foram previamente lavadas com detergente e água e a seguir lavadas com HCl 1N. Em seguida foram lavadas em água corrente até estabilização do pH entre 6.8-7.0 (6). Vinte e trinta miçangas, foram esterilizadas em autoclave a 121°C por 15 minutos em frascos de polipropileno (Entel) com capacidade para 2 ml (KMA-6.100).

Preparo das suspensões bacterianas – O crescimento bacteriano, em dois tubos de agar chocolate (6), foi ressuspenso em 1 ml de caldo nutritivo contendo glicerol a 15%. A seguir distribuída em frascos, contendo as miçangas, mantendo-a em contato por 10 minutos. O excesso da suspensão bacteriana foi removido do fundo dos frascos, para possibilitar que as miçangas individuais pudessem ser removidas quando necessárias. Os frascos foram numerados e colocados em um congelador a -70°C.

Avaliação da Viabilidade – A avaliação da viabilidade e da pureza das bactérias liofilizadas e estocadas por um período de um ano foi feita usando-se a técnica modificada de Miles-Misra (9). A cultura foi hidratada com 1 ml de NaCl 0,85%, correspondendo a uma diluição 10^{-4} e a partir desta, em diluição seriada até 10^{-7} . (tabela).

Usando-se uma pipeta calibrada 20 µl (duplicatas), de cada diluição foram semeadas em gotas na placas de agar BHI chocolate e incubadas nas condições recomendadas.

As bactérias preservadas em miçangas foram também avaliadas quanto à viabilidade e a pureza, como podemos observar na tabela. O frasco de polipropileno foi retirado do congelador e cinco miçangas de cada cepa conservada, foram eluidas em 0,5 ml de caldo nutritivo e a quantidade de bactérias viáveis por miçangas foi determinada como descrito (9).

A reprodutibilidade do método foi avaliada retirando-se o total de miçangas, preservadas de um frasco de polipropileno e colocando-as individualmente em tubos de agar BHI chocolate e a porcentagem de crescimento bacteriano avaliada. Quanto às bactérias liofilizadas, 10 ampolas de cada cepa foram reidratadas e semeadas em tubos de agar BHI chocolate.

Eletroforese em gel de poliacrilamida – A conservação do perfil de componentes bacterianos em diferentes métodos de preservação foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS - (duodecil sulfato de sódio). As

bactérias foram removidas das placas de agar BHI chocolate e ressuspensas em PBS, pH 7.2, a uma concentração de 2.4×10^8 bactérias/ml (Mackfarland). Alíquotas de 1 ml dessa suspensão foram transferidas para tubos de Eppendorf (Sigma) e centrifugados por três minutos a 5.000 rpm (Microfuge Incibras Spin III). Ao sedimento foi adicionado 100 µl de PBS. A 10 µl da suspensão concentrada adicionaram-se 10 µl de solução solubilizadora contendo 4% de SDS, 2% de mercaptoetanol, 20% de glicerol, 1.25M de Tris (hidroximetilaminometano) (pH 6.8) e 0,1% de azul de bromofenol. As amostras foram aquecidas por cinco minutos a 100° C. A eletroforese foi feita em um gel a 10%, segundo metodologia descrita por Laemmli (7). O estudo consistiu em comparar os perfis eletroforéticos dos componentes bacterianos antes e após um ano de estocagem mantidos por diferentes processos de preservação.

RESULTADOS

No estudo comparativo dos métodos de preservação a viabilidade, pureza e análise dos componentes foram avaliados após um ano.

Avaliação da viabilidade – A viabilidade das bactérias liofilizadas assim como as conservadas em miçangas foram expressas na mais alta diluição capaz de apresentar crescimento bacteriano, como podemos observar na tabela.

Avaliação da reprodutibilidade – A reprodutibilidade de bactérias conservadas em miçangas foi avaliada pela retirada simultânea das miçangas de uma partida. Pelo crescimento obtido avaliou-se a capacidade efetiva de adesão de um número suficiente de bactérias às miçangas individualmente, podendo-se atribuir ao método uma reprodutibilidade de 95% das miçangas utilizadas em uma partida. Quanto às bactérias conservadas

TABELA 1 - Avaliação da viabilidade de bactérias conservadas por liofilização e miçangas (-70° C).

Cepas	Liofilização +		Preservação em miçangas *	
	antes	após 1 ano	antes	após 1 ano
<i>H. aegyptius</i> ATCC-11116	5.6×10^8 bac/ml	8.7×10^6 bac/ml	2.4×10^4 bac/ml	1.2×10^3 bac/ml
<i>H. influenzae</i>	3.2×10^8 bac/ml	6.6×10^7 bac/ml	2.3×10^4 bac/ml	1.8×10^3 bac/ml
<i>H. influenzae</i> biogrupo (aegyptius)	1.8×10^8 bac/ml	5.9×10^6 bac/ml	2.8×10^4 bac/ml	4.5×10^3 bac/ml

+ quantidade aproximada de bactérias liofilizadas por ampola;

* quantidade aproximada de bactérias aderida por miçanga.

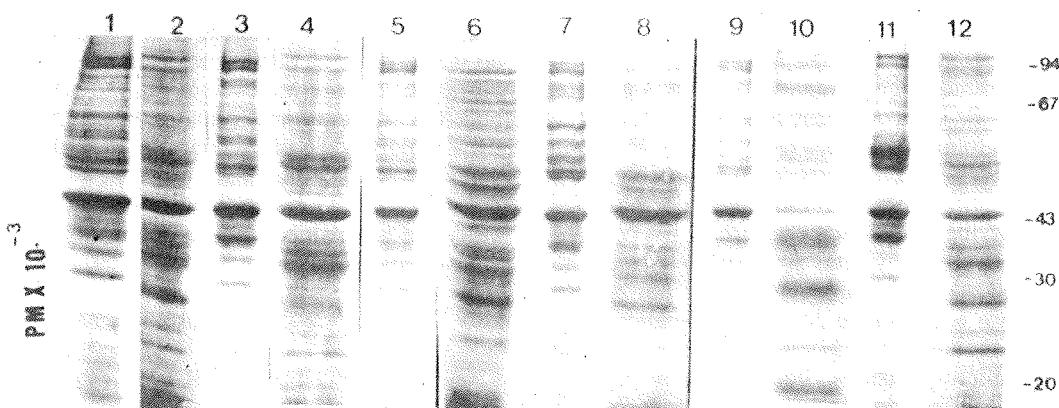


FIGURA 1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida de diferentes cepas de bactérias antes e após os processos de preservação.

Cepa de *H. aegyptius* padrão (1,2,3), Cepa epidêmica *H. influenzae* biogrupo aegyptius (4,5,6) Cepa epidêmica *H. influenzae* biogrupo aegyptius (7,8,9) Cepa de *H. influenzae* padrão. (10,11,12). (1,4,7 e 10) antes dos processos de preservação. (2,5,8 e 11) após preservação em miçangas (3,6,9 e 12) após liofilização

por liofilização observou-se uma reprodutibilidade de 100%.

Eletroforese em gel de poliacrilamida – A análise do perfil eletroforético dos componentes bacterianos das diferentes cepas submetidas aos diferentes métodos de preservação (miçangas e liofilização) não apresentaram diferenças significativas quando analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%. As bandas protéicas foram evidenciadas pela coloração por Coomassie Blue (5).

Na figura podemos analisar o perfil eletroforético dos componentes bacterianos presentes nas cepas utilizadas em nossos estudos antes de serem submetidas aos processos de preservação em miçangas e liofilização. Podemos observar um aumento da intensidade de coloração de componentes na região de 40 KDa (2).

DISCUSSÃO

Microbiologistas necessitam preservar microrganismos para fornecimento dos mesmos para investigações ou utilizações para finalidades diagnósticas.

Uma grande variedade de técnicas são disponíveis para a preservação dos mesmos, tornando-se difícil a escolha do método mais adequado. Esta escolha dependerá naturalmente de fatores importantes tais como manutenção da viabilidade, controle de mutações, pureza e freqüência das utilizações das culturas (11).

De acordo com os resultados obtidos em nossos experimentos, a viabilidade e a pureza das bactérias estocadas por liofilização preservaram-se de forma satisfatória confirmando os nossos estudos prévios, onde características antigênicas e imunobiológicas foram analisadas (3).

O processo de liofilização é um processo amplamente utilizado para preservação de materiais biológicos, incluindo microrganismos, frações sanguíneas, antibióticos, etc. A liofilização mantém as propriedades do material estocado por muitos anos sem a necessidade de acondicionamento especial. Entretanto, os laboratórios que necessitam estocar microrganismos liofilizados necessitam adquirir aparelhos de alto custo (liofilizadores).

Por outro lado as bactérias utilizadas em nossos experimentos estão conservadas em miçangas há um ano apresentando boa viabilidade, pureza e conservando também as suas referidas características antigênicas e imunobiológicas (3). Essa metodologia apresenta muitas vantagens sendo de

fácil manuseio, contornando-se o problema de descongelamento periódico das amostras.

Dados na literatura mostram a viabilidade de bactérias em miçangas sendo preservadas por longos períodos de tempo, além disso as miçangas permitem a utilização das bactérias em experimentos periódicos, evitando-se o subcultivo das mesmas o que acarreta modificações estruturais das cepas.

Desse modo, bactérias do gênero *Haemophilus* pode ser satisfatoriamente conservadas em miçangas a -70°C. O método apresenta vantagens por garantir a reprodutibilidade dos resultados quando utilizados para diferentes propósitos, é de baixo custo e econômico por não necessitar equipamentos específicos.

SUMMARY

Preservation of genera *Haemophilus* bacteria

A wide variety of techniques is available for the preservation of microorganisms and it may become difficult to choose the most suitable for a particular need.

We describe here a comparative study carried out with: *Haemophilus influenzae* (biogroup aegyptius), and *H. influenzae* b, preserved by processes of lyophilization and by freezing in glass beads.

We have successfully preserved these microorganisms over one year in glass beads similarly to those lyophilized, but with advantages such as: the method is simple to perform; many hundreds of strains can be stored for long periods in a small space; recovery of cultures is quick with little or no disturbance of other stored cultures; only the portion of culture removed is thawed whereas the bulk the stock cultures remains frozen; the beads thaw rapidly when placed on solid growth medium and recovery is immediate.

Hitherto, in our experience good levels of viability are maintained with the microorganisms on glass beads preservation.

Key Words: *Haemophilus*, preservation.

REFERÊNCIAS

1. American type culture collections Catalogue of bacteria, phages and RDna vectors. Sixteenth edition, p. 94, 1985.
2. Brener, D. J., Mayer, W. L.; Carbone, G. M., Harison, L. H. et al. - Biochemical, genetic and epidemiologic characterization of *Haemophilus influenzae* biogroup aegyptius (*Haemophilus argyptius*) strains associated with Brazilian Purpuric fever. *J. Clin. Microbiol.*, 26: 11524-1534, 1988.

3. De Gaspari, E. N & Ghilardi, A. C. R. - Resistência de camundongos a infecção experimental por *Haemophilus influenzae* (biogrupo aegyptius) Resumo XV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 1989.
4. Doebller, G. F - Cryoprotective componts - Review and discussion of structure and function. *Cryobiol.*, 3, 1966.
5. Fairbanks, G; Steak, T.L and Wallach, D. F. - Eletroforetic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, 10: 2606-2617, 1971.
6. Jones, D., Pell, A. P & Sneath, P. H. A. - Maintenance of bacteria on glass beads at - 60° C to - 70° C: In maintenance of microorganisms, ed Academic Press, London and New York, p. 37-41, 1984.
7. Laemmli, U. K. - Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.
8. Lapage, S. P., Shelton, J. E., Mitchel, T. G & Mackensie, A. R. - In: methods in microbiology (J. R. Morris and D. W Ribbons) vol 3 A, p 135-228. Academic Press, New York and London, 1970.
9. Miles, A. A. & Misra, S. S. - The stimation of the bactericidal power of bood. *J. Hyg*, Cambridge, 38: 732-749, 1958.
10. Rudge, R. H. - Maintenance of bacteria by freeze-drying: In maintenance of microorganisms, ed Kirsop, B. E and Snell, J. J. S, ed Academic Press, London and New York p. 25-35, 1984.
11. Snell, J. J. S. - General introduction to maintenance methods: In maintenance of microorganisms, ed Kirsop, B. E and Snell, J. J. S, ed Academic Press, London and New York, p. 11-21, 1984.
12. Weyant, S. R., Bibb, F. W., Stephens, S. D., Hoeloway, P. B., Moo Penn, F. W., Birkness, A. K., Helsel, O. L. & Mayer, W. L. Purification and characterization of a pilin specific for Brazilian Purpuric Fever associated *Haemophilus influenzae* biogrupo aegyptius strains. *J. Clin. Microbiol.*, 28: 756-763, 1990.

Recebido para publicação em 21/06/90.

AVALIAÇÃO DO MÉTODO DA PASSIVAÇÃO DO COBRE PARA A OBTENÇÃO DE MICROAEROFILIA E DO ÁGAR CEFOXITINA NO CULTIVO DE *CAMPYLOBACTER JEJUNI* E *CAMPYLOBACTER COLI*

Marcia Soares Pinheiro¹

Louis Barrucand²

Ilvan Delgado Ricciardi¹

Anita Tibana¹

RESUMO

Foi realizado um estudo sobre o efeito que os meios ágar sangue cefoxitina, ágar Skirrow e ágar Campy-BAP e os métodos de obtenção de microaerofilia que empregam os princípios da passivação do cobre, de envelopes geradores de gases (Anaerocult C - Merck) e da evacuação do ar atmosférico e substituição por uma mistura de gases, exercem sobre o crescimento de estirpes de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*, utilizando-se culturas puras e suspensões obtidas a partir da água de lavagem de 34 carcaças de frangos.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os métodos de obtenção de microaerofilia no crescimento das amostras testadas, assim como no isolamento primário de *Campylobacter* termofílicos a partir de carcaças de frangos. O meio ágar sangue cefoxitina e o método de obtenção de microaerofilia da passivação do cobre apresentaram um bom rendimento, constituindo-se numa alternativa prática e de baixo custo para o isolamento destes microrganismos em laboratórios de médios e pequeno porte.

Palavras-chave: *Campylobacter* termotolerantes, meios de cultura, microaerofilia.

INTRODÚCÃO

Campylobacter jejuni e *Campylobacter coli* estão entre os principais agentes de diarréia (5, 6, 12, 15, 16, 21, 23). O isolamento destes microrganismos, requer não somente a utilização de meios seletivos, como também uma atmosfera de microaerofilia adequada. Vários meios seletivos tem sido propostos, a maioria composto de uma base rica adicionada de sangue de carneiro ou cavalo suplementada com três ou mais antimicrobianos

(1, 4, 7, 8, 20). Em vista da dificuldade de obter sangue animal "não contaminado", tem sido desenvolvido mais recentemente, meios seletivos isentos de sangue (2, 3, 10) adicionados de carvão e suplementos enriquecedores e redutores. Por outro lado, estes microrganismos são muito sensíveis ao ar atmosférico, sendo inibidos na presença de elevadas tensões de oxigênio. Embora vários métodos de obtenção de microaerofilia estejam bem padronizadas, a maioria é de difícil aplicação em laboratórios com poucos recursos materiais. As-

1. Departamento de Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia;

2. Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21.944, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

sim, métodos alternativos tem sido recomendados, como o da passivação do cobre (11) e o da jarra com vela (24), a fim de possibilitar a pesquisa desses microrganismos em países pouco desenvolvidos. Tendo em vista a comprovada relevância de *C. jejuni* e *C. coli* e a crescente utilização de métodos alternativos por grande parte dos pesquisadores em nosso meio, foi realizada uma avaliação do meio seletivo ágar cefoxitina (13) e do método da passivação do cobre (11) quanto a sua eficiência no isolamento destes microrganismos a partir de carcaças de frangos.

MATERIAIS E MÉTODOS

1- Avaliação Quantitativa – A eficiência dos meios seletivos ágar Skirrow (20), ágar Camp-BAP (1) e ágar cefoxitina (13) constituído de ágar brucella, 5% de sangue de carneiro e cefoxitina sódica (30 μ g/ml - Mefoxin, Merck-Sharp-Dohme) e dos métodos de obtenção de microaerofilia por troca gasosa, pelo envelope gerador de gases e por passivação do cobre no crescimento de *Campylobacter* termofílicos, foi avaliada segundo a técnica descrita por Miles, et al (17).

Microrganismos – Foram utilizadas cepas de *Campylobacter jejuni* (CDG-G7 - Center for Disease Control), de *Campylobacter coli* (CDG-D145) e 10 de *Campylobacter* termofílicos isoladas de carcaças de frangos.

Preparo do Inóculo – As estirpes de *C. jejuni* e *C. coli* foram semeadas em caldo brucella (Merck) e inoculadas a 37°C durante 48 horas em atmosfera de microaerofilia. As culturas obtidas foram padronizadas na turvação equivalente à metade do tubo 1 da escala de MacFarland. A partir dessas suspensões, foram preparadas diluições decimais até 10⁻⁶ em água peptonada tamponada, pH = 7.0 ± 0.1 (22).

Inoculação nos Meios Seletivos – A partir das diluições 10⁻⁵ e 10⁻⁶ foram semeadas 3 alíquotas de 20 μ l na superfície de 3 placas de cada um dos meios seletivos. Como controle foi utilizado ágar brucella contendo 5% de sangue de carneiro sem antibiótico. As placas foram inoculadas a 42°C, durante 48 horas, em atmosfera de microaerofilia obtida de acordo com descrição a seguir. Para o cálculo das unidades formadoras de colônias (UFC) foram selecionadas as que apresentavam entre 6 e 60 colônias em cada inóculo.

Obtenção de Microaerofilia – Na técnica do envelope, foram utilizados envelopes Anaerocult C (Merck), preparados segundo as instruções do fa-

bricante e jarras de anaerobiose do tipo GasPak. Na técnica da troca gasosa, utilizou-se jarra de anaerobiose do tipo GasPak, com capacidade de 3.5 l. Após a exaustão parcial do ar (500mm de Hg) introduziu-se na jarra uma mistura de gases, contendo 10,9% de H₂; 9,9% de CO₂ e 79,2% de N₂ (White Martins). Na técnica da passivação do cobre segundo uma modificação de Jurgensen (11), utilizou-se como jarra os potes de Santa Marina, Colorina, de 1700ml. As placas semeadas foram colocadas na jarra, em posição invertida. Na parte superior foi colocado o fundo de uma placa de Petri forrado com papel absorvente. Em um recipiente, à parte, recobriu-se 1.0g de lã de aço (Bombril) com 15.0 ml de solução a 2,5% de sulfato de cobre pH 2.0. Após esgotar o excesso de líquido a lã de aço foi imediatamente colocada sobre o fundo da placa de Petri forrado com papel absorvente. Em um saco plástico de 40 x 200mm, contendo 12.0ml de água foi colocado um comprimido de Sonrisal (Sidney Ross Co., Rio de Janeiro).

2- Avaliação Quantitativa – Os meios de cultura seletivos e os métodos de obtenção de microaerofilia foram avaliados quanto a eficácia no isolamento primário de *C. jejuni* e *C. coli* a partir de carcaças de frangos pelo método da semeadura direta.

Amostras – Foram analisadas um total de 34 carcaças de frangos recém abatidos coletadas em abatedouros da cidade do Rio de Janeiro.

Preparo do Inóculo – Foi utilizada a técnica de lavagem das carcaças segundo as recomendações de Park et al (18) com algumas modificações. Para cada frango de cerca de 1 a 2 kg foram utilizados 250ml de água peptonada pH = 7.0 ± 0.1 (22). A suspensão obtida após a lavagem das partes internas e externas da carcaça, foi filtrada em uma camada dupla de gaze esterilizada e concentrada por centrifugação a 16.300 x g durante 20 minutos em centrifuga refrigerada. O sedimento foi ressuspenso em 5.0ml de caldo brucella (Merck).

Inoculação nos Meios Seletivos – A suspensão obtida em caldo brucella foi semeada em triplicata na superfície dos meios, que posteriormente foram incubados a 42°C durante 48 horas, em microaerofilia obtida através dos métodos descritos anteriormente.

Identificação das Estirpes de *C. jejuni* e *C. coli* Isoladas a Partir de Carcaças de Frangos – As colônias com características morfotintoriais de *C. jejuni* e *C. coli*, foram identificadas de acordo com o esquema proposto por Park et al (18). A diferenciação entre as espécies foi realizada através do teste de hidrólise do hipurato segundo Harvey (9).

3- Avaliação Estatística – As diferenças entre as UFC/ml encontradas no estudo quantitativo foram avaliadas através do teste de análise da variância e pelo teste de Tukey. Os dados obtidos na análise qualitativa foram avaliados pelo teste da diferença entre proporções para duas amostras (14).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da variância dos resultados obtidos com culturas puras da cepa *C. jejuni* CDC-G7 e as 10 cepas selvagens de *Campylobacter* termofílicos isoladas de carcaças de frangos, revelou não haver diferença significativa ($p > 0.05$) com relação ao efeito dos meios seletivos no crescimento destes microrganismos. Por outro lado, quando foi utilizada a cepa *C. coli* CDC-D145, verificou-se uma inibição estatisticamente significativa no seu crescimento ($p < 0.05$). O meio ágar Skirrow apresentou menor efeito inibidor que o ágar Camp-BAP, enquanto o ágar cefoxitina exerceu maior efeito inibidor sobre esta cepa. Entretanto, a diferença entre as UFC/ml obtidas nestes meios foi inferior a 1 ciclo logarítmico, o que em termos práticos não representa uma desvantagem com relação a espécimes que apresentem elevados índices de contaminação. Estas observações foram confirmadas avaliando-se o rendimento destes meios em relação ao ágar sangue (controle). O ágar Skirrow apresentou uma recuperação média de aproximadamente 97% das células de *C. coli*, comparado a 84% do ágar cefoxitina e 87% do ágar Camp-BAP. De um modo geral, pode-se concluir que os três meios seletivos testados apresentaram um bom rendimento com relação ao crescimento de *Campylobacter* termofílicos, não exercendo efeito inibitório significativo sobre estes microrganismos.

TABELA 1 - Comparação qualitativa entre 3 meios seletivos e 3 métodos de obtenção de microaerofilia no isolamento primário de *Campylobacter* termofílicos a partir de carcaças de frangos*.

Meios de cultura	Microaerofilia			Total no. de positivos (%)
	Troca gasosa	Sistema Anaerocult C	Passivação do cobre	
no. de positivos				
Skirrow	17 (50,0)	18 (52,9)	16 (47,1)	21 (61,8)
Campy-BAP	22 (64,7)	23 (67,7)	20 (58,8)	25 (73,5)
Cefoxitina	19 (55,9)	16 (47,1)	16 (47,1)	20 (58,8)
Total	22 (64,7)	24 (70,6)	21 (61,8)	

* Um total de 34 carcaças de frangos recém-abatidas foram utilizadas neste estudo.

Na análise quantitativa entre os métodos de obtenção de microaerofilia, foi verificado que os métodos da passivação do cobre, do envelope gerador de gases Anaerocult C e da troca gasosa não diferem entre si quanto ao efeito sobre o crescimento das cepas padrão *C. jejuni* CDC-G7 ($p > 0.05$) e *C. coli* CDC-D145 ($p > 0.05$) e das 10 cepas selvagens isoladas de carcaças de frangos.

Os resultados obtidos a partir da análise qualitativa estão apresentados na Tabela 1. A análise estatística revelou não haver diferença significativa ($p > 0.05$) entre o rendimento dos meios seletivos e dos métodos de obtenção de microaerofilia no isolamento primário de *C. jejuni* e *C. coli* a partir de carcaças de frango recém abatidos através do método da semeadura direta.

A partir destes resultados conclui-se que a eficiência dos meios no isolamento de *Campylobacter* termofílicos a partir de espécimes que possuem uma flora contaminante muito rica, está relacionada ao grau de seletividade de cada um deles. Assim, o ágar Camp-BAP mostrou-se mais eficiente no sentido de inibir o crescimento da microbiota contaminante dos frangos, sendo *C. jejuni* e *C. coli* isolados em cultura pura em várias ocasiões. Os meios ágar Skirrow e ágar cefoxitina se mostraram bem menos seletivos, apresentando contudo um bom rendimento. Uma vantagem do ágar cefoxitina foi que não se observou crescimento invasor de *Proteus* sp. como comumente ocorria no ágar Skirrow, dificultando o isolamento primário de *C. jejuni* e *C. coli* a partir de espécimes muito contaminadas, como as carcaças de frangos. Resultados semelhantes foram isolados por Bolton *et al* (3) em relação a eficiência do meio Skirrow, verificando a perda de 4 amostras positivas devido ao crescimento invasor de *Proteus* sp. e fungos saprofíticos. Por outro lado, o fato do suplemento seletivo do ágar

cefoxitina ser constituído por um antimicrobiano, a cefoxitina, disponível a nível comercial em nosso meio, como Mefoxin (Merck-Sharp-Dohme), torna o seu preparo bastante acessível, o que confirma as observações de Levi (20).

Embora nenhuma diferença estatística significativa tenha sido detectada entre os métodos de obtenção de microaerofilia, o do envelope Anaerocult C, apresentou maior rendimento. No entanto, embora se constitua num método prático, tem a desvantagem de elevar o custo de cada análise. Baseado no princípio da passivação do cobre e na utilização de antiácidos efervescentes, o sistema proposto por Jurgensen (11) mostrou-se além de simples e econômico, bastante eficiente, confirmado as observações de Pennie *et al* (19).

Em síntese, a utilização do meio ágar cefoxitina e do método da passivação do cobre constitui-se numa alternativa simples e econômica para o isolamento de *C. jejuni* e *C. coli* a partir de espécimes que apresentem um elevado nível destes microrganismos.

SUMMARY

Evaluation of cefoxitin medium and the microaerophilic environment produced by a combination of iron, copper and sodium bicarbonate for the culture of *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*.

Campylobacter jejuni is a common cause of diarrhea all over the world. The standard method for isolating *C. jejuni* and *C. coli* requires several special conditions, as blood agar made selective with the addition of three to five antimicrobial agents, and an incubation in a microaerophilic environment, which turns such procedure expensive and cumbersome for many laboratories. In the present study it was evaluated quantitatively the relative ability of a commercial gas generating envelop (Anaerocult C - Merck), the evacuation replacement technique and a combination of iron, copper and sodium bicarbonate (Jurgensen, Rev. Bras. Pat. Clin. 17, 1981), to produce a satisfactory environment for the culture of termophilic campylobacters on three selective media, Skirrow, Campy-BAP and a blood agar made selective with the addition of 30 µg/ml of cefoxitin (cefoxitin medium) (Mefoxin - Merck Sharp Dhome). For the economical method to obtain microaerophilic atmosphere described by Jurgensen, (11), we used inside a glass container of 1,7 L, as performed by the au-

thor, one botton of petri dish containing fine steel wool, previously soaked in a 2,5% aqueous solution of copper sulphate and a plastic bag containing an effervescent antiacid tablet (Sonrisal or AlkaSeltz) and 12,0 ml of tap water. The reaction of a fine steel wool and copper sulphate provided appropriate oxygen concentration (5 to 7,5%) and the effervescent antiacid tablet containing bicarbonate increased carbon dioxide concentration up to 5%.

In the quantitative study each half of a plate was inoculated with three drops (20 µl each) of the standardized suspension prepared from pure cultures of two reference strains and ten wild strains isolated from chickens. After incubation at 42°C for 48 h the results were reported as the number of CFU/ml. The analysis of variance showed that none statistical difference were observed between the three selective media and microaerophilic systems in relation to the growth of *C. jejuni* reference strains, 10 wild strains and on the isolates from chickens. Nevertheless, a small interference of the selective media was observed in relation to the growth of *C. coli* reference strain.

In the qualitative study, 34 chicken carcasses, were analysed for the primary isolation of termophilic campylobacters. The statistical analysis showed that the rates of isolation on the three selective media and three microaerophilic systems were not statistically significant.

Our results show that cefoxitin medium and the microaerophilic environment produced by a combination of cooper, iron and sodium bicarbonate could be an excellent alternative for isolating *C. jejuni* and *C. coli*.

Key Words: termophilic *Campylobacter*, culture media, microaerophilic environments.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, a CAPES e a FINEP pelo apoio financeiro. À Deusamar da Silva Goes e Raquel Neves Soares, pelo auxílio técnico e aos laboratórios de Microbiologia Oral e de Zoonoses e Endemias do Instituto de Microbiologia da UFRJ pela utilização de seus recursos materiais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Blaser, M. J.; Berkowits, I. D.; Laforce, F. M.; Cravens, J.; Reller, L. B. & Wang, W. L. – *Campylobacter* enteritis: clinical and epidemiological features. *Ann. Intern. Med.*, 9: 179-185, 1975.

2. Bolton, F. J. & Coates, D. – Development of a blood-free *Campylobacter* medium: screening tests on basal media and supplements, and the ability of selected supplements to facilitate aerotolerance. *J. Appl. Bacteriol.*, **54**: 115-125, 1983.
3. Bolton, F. J.; Hutchinson, D. N. & Coates, D. – Blood-free selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. *J. Clin. Microbiol.*, **19**(2): 169-171, 1984.
4. Bolton, F. J. & Robertson, L. – A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni/coli*. *J. Clin. Pathol.*, **35**: 462-467, 1982.
5. Fernandez, H.; Toledo, M. R. F.; Fagundes Neto, U. & Trabulsi, L. R. – Occurrence of *Campylobacter jejuni* in diarrhoeic and non-diarrhoeic children in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop.*, São Paulo, **27**: 102-104, 1985.
6. Franco, D. A. – *Campylobacter* species: considerations for controlling a foodborne pathogen. *J. Food Prot.*, **51**: 145-153, 1988.
7. George, H. A.; Hoffman, P. S.; Smibert, R. M. & Krieg, N. R. – Development of an improved culture medium form *Campylobacter fetus*. *J. Clin. Microbiol.*, **8**: 36-41, 1978.
8. Goosens, H. A.; De Boeck, M. & Butzler, J. P. – A new selective medium for the isolation of *Campylobacter jejuni* from human faeces. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, **2**: 389-394, 1983.
9. Harvey, S. M. – Hippurate hydrolysis by *Campylobacter fetus*. *J. Clin. Microbiol.*, **11**: 435-437, 1980.
10. Hutchinson, D. N. & Rolton, F. J. – An improved blood-free selective medium for the isolation of *Campylobacter jejuni* from faecal specimens. *J. Clin. Pathol.*, **36**: 956-957, 1983.
11. Jorgensen, C. A. – Caracterização preliminar, a nível de gênero, para bactérias anaeróbias predominantes em material clínico. *Rev. Bras. Pat. Clin.*, **17**: 74-77, 1981.
12. Karmali, M. A.; Penner, J. I.; Fleming, P. C.; Williams, A. & Hennessy, J. N. – The serotype and biotype distribution of clinical isolates of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* over a three years period. *J. Infect. Dis.*, **147**: 243-246, 1983.
13. Levi, A. – *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*: isolamento e caracterização de amostras obtidas na cidade do Rio de Janeiro. Tese de Mestrado do Instituto de Microbiologia da UFRJ, 1982.
14. Levin, J. – Elementary Statistics in Social Research, 2nd. ed. Harper & Row, Publishers, Inc. 1987.
15. Loureiro, E. C. B. & Lins, Z. C. – Observações sobre o isolamento de *Campylobacter jejuni* de crianças com gastroenterite aguda em Belém do Pará (nota prévia). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **25**: 50-52, 1983.
16. Mendes, E. N.; Queiroz, M. O. M.; Cisalpino, E. O.; Peres, J.; Penna F. J. & Figueiredo-Filho, P. P. – Ocorrência de *Campylobacter jejuni* em crianças com e sem diarréia em Belo Horizonte. *Rev. Microbiol.*, **18**: 25-30, 1987.
17. Miles, A. A.; Misra, S. S. & Irwin, J. O. – The estimation of the bactericidal power of the blood. *J. Hyg.*, **38**: 732-749, 1938.
18. Park, C. E.; Smibert, R. M.; Blaser, M. J.; Vanderzant, C. & Stern, N. J. – *Campylobacter*. In: Speck, M. L., ed., Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 2nd ed., Washington, p. 386-402, 1984.
19. Pennie, R. A.; Zunino, J. N.; Edward, C. R. J. & Guerrant, R. L. – Economical, simple method for production of the gaseous environment required for cultivation of *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.*, **20**: 320-322, 1984.
20. Skirrow, M. B. – *Campylobacter enteritis*: a "new" disease. *Brit. Med. J.*, **2**: 9-11, 1977.
21. Taylor, P. R.; Weinstein, W. M. & Bryner, J. H. – *Campylobacter fetus* infection in human subjects: association with raw milk. *Amer. J. Med.*, **66**: 779-783, 1979.
22. Tatcher, F. S. & Clark, D. S. – International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microrganisms in Foods. Their significance and methods of enumeration., 2nd ed., University of Toronto Press, 1978.
23. Thompson, J. S.; Cahoon, F. E. & Hodge, D. S. – Rate of *Campylobacter* spp. isolation in three regions of Ontario-Canadá, from 1978 to 1985. *J. Clin. Microbiol.*, **24**: 876-878, 1986.
24. Wang, W-L. L.; Luechtefeld, N. W.; Blaser, M. J. & Reller, L. B. – Effect of incubation atmosphere and temperature on isolation of *Campylobacter jejuni* from human stools. *Can. J. Microbiol.*, **29**: 468-470, 1983.

Recebido para publicação em 20/12/90.

**EFFICACY OF DIRECT PLATING AND SELECTIVE ENRICHMENT MEDIA FOR
DETECTING *CAMPYLOBACTER JEJUNI* IN FRESH EVISCERATED WHOLE
MARKET CHICKENS - SÃO PAULO - BRAZIL**

Sirdéia Maura Perrone Furlanetto¹

Dirceu do Nascimento²

Maria Lucia Cerqueira-Campos¹

Sebastião Timo Iaria¹

SUMMARY

Two methodologies were evaluated to determine the need of selective enrichment in the isolation of *Campylobacter jejuni* from whole chicken carcasses. They were direct selective media on Campy-BAP (CBAP) and vancomycin, trimethoprim polymyxin B-ferrous sulfite, sodium metabisulfite and sodium pyruvate (VTP-FBP) agars and selective enrichment in Doyle-Roman (DR) and Preston (P) broths followed by direct selective media on CBAP and VTP-FBP agars. The results were compared using the χ^2 test at significance level of 5%. No statistically significant differences were found between the two plating media or after enrichment in DR and P broths with subsequent plating on CBAP agar. DR and P broths combined with VTP-FBP agar showed a statistically significant difference in relation to all the other procedures, except between P/CPAB and P/VTP-FBP. DR/VTP-FBP was the least effective combination. DR/CBAP was the best among all combinations and statistically was as efficient as CBAP and VTP-FBP isolation agars. Considering the lack of statistically significant difference between the enrichment procedure and direct selective plating method, we conclude that there is no need for using enrichment broth for recovering *C. jejuni* from chickens carcasses.

Key Words: *Campylobacter jejuni*, chicken, enrichment and selective solid media, isolation.

INTRODUCTION

In the last few years *Campylobacter jejuni* has been recognized as an important cause of acute bacterial gastroenteritis in humans (3,4,6,14,21). Several workers (20,21) have reported its isolation from 5-14 percent of patients with diarrhoea and from 1 percent of asymptomatic persons. *Campylobacter* enteritis is a cosmopolitan disease, parti-

cularly prevalent in tropical developing countries (4,8). It is found to be more frequently in the summer months in temperate climates (3,6,14,15).

As *Campylobacter* species are widespread in the animal kingdom, cats, dogs, sheep, pigs, and especially poultry may constitute a source of human infection (12). A number of studies have shown the presence of this organism in the caeca or faeces of healthy chickens (5,23) and in raw

1. Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - Caixa Postal 4365 - CEP 01000, São Paulo, SP, Brasil.

2. Departamento de Nutrição da Escola de Farmácia - Universidade Federal de Ouro Preto, CEP 35400 - Ouro Preto, MG, Brasil.

foods of animal origin, particularly retail poultry products (5, 15, 17, 22, 23).

Grant *et al* (10) isolated *C. jejuni* from the rectal contents of 83% of the broiler chickens obtained from a live poultry market in New York city. The high counts observed (4.4×10^6 organisms per g of faeces) together with the known ability of the organism to survive at normal refrigeration temperatures, led them to state that in every home in which raw chicken meat is handled, the occupants are exposed to *Campylobacter* infection.

Smith & Muldoon (22) isolated *C. jejuni* from 5.3% of chicken carcass samples obtained at retail outlets. This low recovery rate could be due to the long period of sample storage prior to analysis (17). On the other hand, higher recovery rates of *C. jejuni* from chickens varying from 23 to 91% have been reported (5, 11, 12, 17, 19, 23).

Early isolation methods included direct plating procedures, developed to recover *C. jejuni* from faecal specimens, where the organism is present in relatively large numbers (3, 6, 14, 21). In view of the low numbers present in foods, several enrichment broths and direct isolation media have since been formulated and evaluated for the detection and enumeration of this organism in foods (2, 9, 17). However, most of the methods that have been proposed for use in foods have limitations such as being ineffective in recovering small numbers of *Campylobacter* or being time consuming (3, 18). A number of isolation media and enrichment broths are now officially recommended for detecting *C. jejuni* in foods (7, 24, 25).

The present study was undertaken to compare 2 direct plating media and 2 enrichment broths for their suitability in the detection of *C. jejuni* in naturally contaminated poultry, and to determine whether the use of an enrichment procedure was actually needed.

MATERIALS AND METHODS

Samples – A total of 42 eviscerated whole chickens, each one purchased at a different retail outlet in the City of São Paulo, Brazil, were examined for the presence of *C. jejuni*. The chicken carcasses were transported to the laboratory in insulated coolers immediately after purchase and bacteriologically examined within less than two hours after collection.

Media – Two selective isolation media were evaluated: Campy brucella agar (Campy-BAP, CBAP) (7) and Vancomycin, trimethoprim, poly-

myxin B - ferrous sulfite, sodium metabisulfite and sodium pyruvate agar (VTP-FBP agar). VTP-FBP agar is an enrichment broth described by PARK *et al* (18) complemented with 1.5% agar. Two selective enrichment media were also evaluated for their suitability to recover *C. jejuni* from eviscerated whole chickens: Doyle and Roman (DR) broth (9) and Preston (P) broth (7).

Microaerophilic incubation – All plates and culture flasks were incubated in anaerobic jars (BBL) under microaerophilic conditions created by introducing CampyPak II (BBL) gas generating envelopes. The final gas mix was 5% O_2 and 10% CO_2 .

Preparation of samples – Each chicken was washed by shaking and massaging in a sterile plastic bag containing 250 ml of nutrient broth (Difco). The washings were filtered through a double layer of sterile cheesecloth, and centrifuged at 16,300 x g for 20 min. at 4°C. The supernatant was poured off, and the pellet resuspended in 5 ml of brucella broth (Difco). Portions of this concentrate (50 x) were used to inoculate either the direct selective media or the enrichment broths for the enrichment-plating procedure (7).

Direct selective plating – From the concentrate obtained as described above, 3 loopfuls were aseptically transferred to the surface of CBAP and VTP-FBP agars, in duplicate, and streaked across the plates to obtain isolated colonies. Each inoculated plate was incubated under microaerophilic conditions at 42°C for 48 h. After incubation, at least three colonies from each plate were examined by the Gram stain, and by phase contrast microscopy for typical morphology and darting motility. Suspect colonies were cultured in semisolid brucella medium aerobically at 37°C for 24 h (7) and then subjected to confirmatory biochemical tests.

Enrichment-selective-plating procedure – Following inoculation for the direct selective plating, the remaining concentrate was divided into two equal portions of which one was transferred to a 125 ml Erlenmeyer flask containing 100 ml of DR broth (7, 9) and the other to a 125 ml Erlenmeyer flask with 100 ml of P broth (7). The inoculated flasks were incubated under microaerophilic conditions at 42°C for 48 h. After incubation, a loopful of each enrichment broth culture was streaked on the surface of CBAP and VTP-FBP agars, in duplicate, and the plates incubated under microaerophilic conditions at 42°C for 48 h. After incubation the procedure described for direct selective plating was followed.

Identification of the colonies – Presumptive colonies showing Gram negative rods, and motile cells with a corkscrew motion by phase-contrast

microscopy were confirmed as *C. jejuni* by the following biochemical tests: oxidase and catalase production, nitrate reduction, tolerance for 1% glycine, failure to grow at 3.5% NaCl, growth at 42°C but not at 25°C, growth inhibition of nalidixic acid, cephalothin resistance (7) DNA (16) and hippurate (7) hydrolysis and H₂S production (16). The identification of *C. jejuni* biotypes was carried out according to the scheme reported by Lior (16).

Statistical methods – To test the equivalence of the procedures used in this study, the data were analysed by the X² test (1) at a significance level of 5%.

RESULTS AND DISCUSSION

The present study, using the direct selective plating method and/or the selective enrichment procedure, found that 23 (54.7%) out of 42 eviscerated chicken samples analysed, were positive for *C. jejuni*. Similar results were obtained by Park *et al* (17) (32-62%), Lammerding *et al* (13) (38.2%), and Wesley *et al* (28) (50%).

Table 1 summarizes the results obtained from the samples plated directly on CBAP and VTP-FBP agar, and after enrichment in DR and P broths. By the direct selective plating procedure, *C. jejuni* was recovered from 13 (31%) and 11 (26.2%) of the samples plated on CBAP and VTP-FBP isolation agar, respectively.

After enrichment in DR and P broths with subsequent plating on CBAP agar, *C. jejuni* was recovered from 16 (38.1%) and 8 (19%) samples, respectively. On the other hand, using enrichment in DR and P broths combined with VTP-FBP agar 1 (2.4%) and 5 (12%) samples were positive for *C.*

jejuni, respectively.

Table 2 shows the statistical equivalence at the 5% level of the six isolation procedures tested for isolating *C. jejuni*. They are listed from greatest to least (left to right) according to their *C. jejuni* recovery rate, and those that are equivalent at the level are underscored by the same line. With the direct selective plating procedure no significant difference was observed in the effectiveness of CBAP (P₁) and VTP-FBP (P₂) agars. Among the enrichment selective plating procedures DR/CBAP (P₃) was the best (38.1%) of all combinations and statistically as efficient as CBAP (31%) and VTP-FBP (26.2%) isolations agars. The P/CBAP (P₅) combination also showed no statistical difference with the direct selective plating procedure.

Since CBAP and VTP-FBP agars gave equivalent results by the direct selective plating one would expect similar results after enrichment with DR or P broths. However it was found that the association DR/VTP-FBP (P₄) and P/VTP-FBP (P₆) gave a recovery rate as low as 2.4 and 12% respectively, resulting in the least effective combinations and showing a statistical difference in relating to the direct plating procedure. This result may indicate the possibility of some inhibition when VTP-FBP agar is combined with DR and/or P broths.

Further studies involving the use of these and other selective solid media combined with different broths are required to fully ascertain the significance of some of these results.

C. jejuni strains isolated from the positive samples were biotyped according to Lior's scheme (16). Among 23 positive samples of *C. jejuni* biotype I was most common, isolated from 10 (43.5%) samples, followed by biotype II (30.4%) and both biotypes I and II (26%).

TABLE 1 – Isolation of *C. jejuni* strains from 42 fresh eviscerated whole chicken samples, by the direct selective plating method and selective enrichment procedure.

Nº of chicken samples tested	Nº and % of <i>C. jejuni</i> — positive samples by:											
	Direct Plating ^a				Enrichment ^b							
	CBAP		VTP-FBP		DR/CBAP		DR/VTP-FBP		P/CBAP		P/VTP-FBP	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
42	13	31.0	11	26.2	16	38.1	1	2.4	8	19.0	5	12.0

a. CBAP, (Campy-BAP agar) (7); VTP-FBP agar (VTP-FBP broth (18) added of 1.5% agar); selective isolation agars.

b. DR, Doyle and Roman enrichment broth (9) and P, Preston enrichment broth (7) combined with CBAP and VTP-FBP agars.

TABLE 2 - Isolation procedure listed from greatest to least with respect to *Campylobacter jejuni* recovery for each procedure.

There are six procedure as follows

<u>CODE</u>	PROCEDURES
P ₁	CBAP, (Campy-BAP) (7)
P ₂	VTP-FBP agar (VTP-FBP broth (18) added of 1.5% agar)
P ₃	Doyle and Roman enrichment broth (9) combined with CBAP
P ₄	Doyle and Roman enrichment broth combined with VTP-FBP agar
P ₅	Preston enrichment broth (7) combined with CBAP
P ₆	Preston enrichment broth (7) combined with VTP-FBP agar
P ₃	P ₁ P ₂ P ₅ P ₆ P ₄

Procedure that are underscored by the same line do not differ significantly at the $\alpha = 0.05$ level.

The overall results in the present study indicated that, in view of the lack of a statistically significant difference between the enrichment procedure and direct selective plating method (which was in many instance superior in effectiveness), there is no need for the use of enrichment broths for recovering *C. jejuni* from whole chickens.

RESUMO

Campylobacter jejuni em carcaças de frangos, avaliação da eficiência de meios de plaqueamento e enriquecimento seletivo no seu isolamento

Com o fim de se testar a necessidade de enriquecimento seletivo para o isolamento de *Campylobacter jejuni* a partir de carcaças de frangos, foram empregadas duas metodologias, o plaqueamento direto em ágar Campy-BAP (CBAP) e ágar Vancomicina, trimetoprim, polimixina B - sulfato ferroso, metabissulfito de sódio e piruvato de sódio (VTP-FBP) e o enriquecimento seletivo em meio de Doyle-Roman (DR) e de Preston (P). Os resultados obtidos foram comparados estatisticamente através do teste do χ^2 fixando-se em 5% o nível de rejeição. A significância das diferenças dos resultados obtidos, entre os dois meios de plaqueamento direto CBAP e ágar VTP-FBP ou

após o enriquecimento seletivo nos meios de DR e P seguidos do plaqueamento em ágar CBAP, evidenciou não existir diferenças significativas. As combinações dos meios de enriquecimento seletivo DR e P com o ágar VTP-FBP, mostraram haver diferenças estatisticamente significantes em relação aos demais procedimentos, exceto entre as associações P/CBAP e P/VTP-FBP. A combinação DR/VTP-FBP mostrou ser a menos eficiente. A DR/CBAP foi a que apresentou melhores resultados frente as demais associações e estatisticamente foi tão eficiente quanto os meios de plaqueamento direto. Considerando-se que os resultados estatísticos mostraram não haver diferenças significantes entre a utilização do plaqueamento direto e o enriquecimento seletivo, concluímos não haver necessidade do enriquecimento seletivo para o isolamento de *C. jejuni* a partir de carcaças de frangos.

Palavras-chave: *Campylobacter jejuni*, frangos, meios de enriquecimento seletivo, meios de plaqueamento, isolamento.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by funds from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Projeto CNPq nº 4074721/86). We thank Dr. Pearl I. Peterkin from the Bureau of Microbial Hazards, Health and Welfare Canada for the suggestions. Appreciation is extended to R. C. Gamba and M. A. O. da Silva in the laboratory.

REFERENCES

- Berquó, E.; D.P.M.J., Sousa and S.L.D. Gothief., 1980. Bio-estatística, EPU. Edusp, São Paulo, 325 p.
- Beuchat, L.R., 1987. Efficacy of some methods and media for detecting and enumerating *Campylobacter jejuni* in frozen chicken meat. *J. Appl. Bacteriol.*, 62:217-221.
- Blaser, M.J., I.D. Berlowitz; F.M., La Force, J. Cravens, L. B. Reller and W.L.L. Wang, 1979. *Campylobacter* enteritis: clinical and epidemiologic feature. *Ann. Intern. Med.*, 91:179-185.
- Bokkenhoven, J.D., N.J. Richardson, J.H. Bryner, D.J. Roux, A.B. Schutte, H.J. Koornhof, E. Freimen and E. Hartman. 1979. Detection of enteric campylobacteriosis in children. *J. Clin. Microbiol.*, 9:227-232.
- Bruce, D. W. Zochowski and I.R. Ferguson, 1977. *Campylobacter* enteritis. *Brit. Med. J.*, 2, 1219.
- Butzler, J.P. and M.B. Skirrow, 1979. *Campylobacter* enteritis. *Clin. Gastroenterol.*, 8:737-765.
- Canada. Health and Welfare Canada. Health Protection branch. 1989. Isolation of *Campylobacter* from meat, poultry and milk: MFLP-46. In: Laboratory procedures of microbiological analysis of food. Montreal: Polyscience

8. Publ., (Compendium of analytical methods, v.3), p. 1-31.
8. De Mol, P. and E. Bosmans, 1978. *Campylobacter enteritis* in Central Africa. *Lancet i*: 604.
9. Doyle, M.P. and D.J. ROMAN, 1982. Recovery of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from inoculated foods by selective enrichment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**:1343-1354.
10. Grant, I.H., N.J. Richardson and V.D. Bokkenheuser, 1980. Broiler chicken as potential source of *Campylobacter* infection in humans. *J. Clin. Microbiol.*, **11**:508-510.
11. Harris, N.V., D. Thompson, D.C. Martin and C.M. Nolan, 1986. A survey of *Campylobacter* and other bacterial contaminants of pre-market chicken and retail poultry and meats, King Country, Washington. *Am. J. Public Health*, **76**:401-406.
12. Juvens, B.J. and M. Rogol, 1986. Incidence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* serogroups in a chicken processing factory. *J. Food Prot.*, **49**:290-292.
13. Lammerding, A.M., M.M. Garcia, E.D. Mann, Y. Robson, W.I. Dorward, R.B. Truscott and F. Titiger, 1988. Prevalence of *Salmonella* and thermophilic *Campylobacter* in Canada. *J. Food Prot.*, **51**:47-52.
14. Lauwers, W., M. De Boeck and J.P. Butzler, 1978. *Campylobacter enteritis* in Brussels. *Lancet i*, 604-605.
15. Leuchtefeld, N.W. and W.L.L. Wany, 1981. *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in a turkey processing plant. *J. Clin. Microbiol.*, **23**:266-268.
16. Lior, H. 1984. New extended biotyping scheme for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and "Campylobacter laridis". *J. Clin. Microbiol.*, **20**:636-640.
17. Park, C.E.Z.K. Stankiewicz, J. Lovett and J. Hunt, 1981. Incidence of *Campylobacter jejuni* in fresh eviscerated whole market chickens. *Can. J. Microbiol.*, **27**:841-842.
18. Park, C.E.Z.K. Stankiewicz, J. Lovett, J. Hunt and D. W. Francis, 1983. Effect of temperature, duration of incubation and pH of enrichment culture on the recovery of *Campylobacter jejuni* from eviscerated market chickens. *Can. J. Microbiol.*, **29**:803-806.
19. Ribeiro, C.D., 1978. *Campylobacter enteritis*. *Lancet ii*, 270.
20. Severin, W.P.J., 1978. *Campylobacter enteritis*. *Ned. Tijdschr Geneesk*, **122**:499-504.
21. Skirrow, M.B., 1977. *Campylobacter enteritis* a "new disease". *Brit. Med. J.*, **11**:9-11.
22. Smith, M.V. and P.J. Muldoon, 1974. *Campylobacter fetus* subsp *jejuni* (*Vibrio fetus*) from commercially processed poultry. *Appl. Microbiol.*, **27**:955-956.
23. Simmons, N.A. and F.J. Gibbs, 1979. *Campylobacter* ssp in oven ready poultry. *J. Infect.*, **1**:159-162.
24. Speck, M.L., 1984. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, American Public Health Association, 2nd ed.
25. U.S. Dept. Health Education & Welfare, 1984. Bacteriological Analytical Manual, 6th ed. U.S. Dept. Health & Welfare; Washington, D.C. United States Food and Drug Administration.
26. Veron, M. and R. Chatelain, 1973. Taxonomic study of the genus *Campylobacter* Sebald and Veron and designation of the neotype strain for the type species *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald an Veron. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **23**:122-134.
27. Wempe, J. M., C. A. Genigeorgis, T. B. Farber, and H. I. Yusufi, 1983. Prevalence of *Campylobacter jejuni* in tub California chicken processing plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**:355-359.
28. Wesley, R. D., B. Swaminathan, W. J. Stadelman, 1983. Isolation and enumeration of *Campylobacter jejuni* form poultry products by a selective enrichment method. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**:1097-1102.

Received for publication in 28/02/91.

RESISTÊNCIA A AGENTES ANTIMICROBIANOS DÉ AMOSTRAS DE *NEISSERIA GONORRHOEAE* ISOLADAS EM FLORIANÓPOLIS (SC)

Artur Smania Junior¹
Marcio Luiz Gil¹
Elza de Fátima Albino Smania¹
Cassia Maria Zoccoli²
Denise Michels²
Rudi Lopes³

RESUMO

Entre abril de 1988 e maio de 1990 foram isoladas 81 amostras de *Neisseria gonorrhoeae* de pacientes atendidos em laboratórios públicos e privados. Dentre os isolados, 54,32% foram resistentes à penicilina, 43,21% à ampicilina, 7,41% à cefalotina, 4,94% à eritromicina, 24,69% à estreptomicina, 7,41% à gentamicina e 69,14% à tetraciclina. Três amostras produziram β-lactamase, representando uma ocorrência de 3,7% de *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase na população estudada.

Palavras-chave: *Neisseria gonorrhoeae*, agentes antimicrobianos e β-lactamase.

INTRODUÇÃO

Neisseria gonorrhoeae é um patógeno obrigatório do homem com propriedades estruturais para colonizar o epitélio colunar. A infecção por este microrganismo é a causa mais comum das uretrites. No entanto, a localização da infecção no trato geniturinário, na maioria dos pacientes, não é exclusiva, podendo determinar também infecção no reto e faringe, artrite séptica e oftalmia neonatal (14).

Isolados clínicos de *N. gonorrhoeae*, obtidos nos últimos 40 anos, têm apresentado progressiva resistência aos agentes terapêuticos, resultando no abandono de algumas drogas e marcante aumento nas doses de penicilina e tetraciclina (6). Segundo

o Centers for Disease Control (CDC), em 1976 haviam sido isoladas amostras de *N. gonorrhoeae* produtoras de penicilinase (NGPP) em 11 diferentes países, e em 1977, foram confirmados por este Centro, casos em Nova York e em outros 16 estados americanos (4). Recentemente, também tem sido descrita resistência a drogas alternativas para terapia das NGPP (1, 8, 27).

Com o reconhecimento da resistência do gônoco para antimicrobianos, testes de sensibilidade para este microrganismo foram requeridos. No entanto, os procedimentos e critérios de interpretação que estavam sendo utilizados eram padronizados para testes com bactérias de crescimento rápido, e são considerados de valor questionável para microrganismos fastidiosos (10). Como

1. Depto. Microbiologia e Parasitologia – Centro de Ciências Biológicas Universidade Federal de Santa Catarina Caixa Postal – 476 – 88.049 – Florianópolis – SC
2. Laboratório Médico Santa Luzia Florianópolis – SC
3. Depto Autônomo de Saúde Pública Florianópolis – SC

exemplo, o National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomendava, para a penicilina que as amostras de *N. gonorrhoeae* com diâmetro do halo de inibição maior ou igual a 20 mm fossem considerados sensíveis e aquelas com diâmetro menor ou igual a 19 mm, resistentes. Porém, este critério era válido somente para amostras NGPP e não para amostras com resistência cromossômica (10). Por esta razão, o CDC passou a preconizar que amostras com diâmetro de halo menor ou igual a 25 mm sejam consideradas resistentes (5, 7).

Recentemente, o NCCLS, através do seu "Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing", padronizou para o teste de difusão os critérios de interpretação à penicilina (halo menor ou igual a 26 mm, resistente), à espectinomicina (halo menor ou igual a 14 mm, resistente), à ceftriaxone (halo menor ou igual a 34 mm, resistente) e à tetraciclina (halo menor ou igual a 30 mm, resistente). Assim como, critério de halo menor ou igual a 19 mm para resistência mediada por plasmídio para a penicilina e tetraciclina (13).

Considerando a magnitude do problema, e uma vez que em nosso meio não são realizados com freqüência testes de sensibilidade padronizados com amostras de *N. gonorrhoeae*, este trabalho teve por objetivo verificar o espectro de sensibilidade dos gonococos isolados e testar a produção de penicilinase das amostras que apresentaram resistência à penicilina.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de gonococos

Os gonococos foram obtidos de pacientes atendidos em laboratórios privados e públicos de Florianópolis (SC), no período de abril de 1988 a maio de 1990. Foram estudadas 81 amostras de gonococos, sendo 66 isoladas a partir de pacientes do sexo masculino (64 de exsudato uretral, uma da orofaringe e uma do líquido sinovial) e 15 do sexo feminino (material coletado do cérvico). Os espécimes foram obtidos com auxílio de "swab" de algodão estéril, exceto o líquido sinovial que foi por punção, e inoculados diretamente em placas contendo meio de Thayer-Martin. As culturas foram incubadas em microaerofilia (5-10% CO₂) a 36°C por 24 a 48 horas e posteriormente transportadas ao Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina, onde foram analisadas. As amostras, isoladas e identifica-

das, foram mantidas em meio semi-sólido enriquecido e estocadas a temperatura ambiente (24).

Antimicrobianos

Teste de sensibilidade a agentes antimicrobianos:

A sensibilidade a antimicrobianos foi verificada pelo teste de difusão das drogas impregnadas em discos, no meio de cultura(3). O meio utilizado foi o ágar chocolate suplementado (suplemento VX, Laborclin), usando-se como base o ágar GC (Difco). O inóculo foi uma suspensão de gonococo em solução fisiológica estéril (0,09%) com turvação correspondente a aproximadamente 10⁷ a 10⁸ UFC/ml. A semeadura nas placas foi realizada com auxílio de "swab" de algodão esterilizado. O diâmetro do halo de inibição foi medido após a incubação nas condições descritas anteriormente. O teste foi realizado com a ampicilina, céfalonina, eritromicina, estreptomicina, gentamicina, penicilina e tetraciclina.

Teste de produção de β-lactamase

Para as amostras, que no teste de sensibilidade apresentaram os valores dos diâmetros dos halos de inibição iguais ou inferiores a 19 mm para a penicilina, foi verificada a produção de β-lactamase através do método acidométrico (29). Para isso, foram dissolvidos 250 mg de ampicilina sódica (Fontoura Wyeth) em 1,0 ml de tampão fosfato contendo 0,8% de cloreto de potássio (peso/volume) e 0,1% de vermelho de fenol (solução de cor vermelha). No momento do uso, para cada 20 µl da solução acima, adicionavam-se mais 100 µl do tampão fosfato e 30 µl de uma suspensão espessa do gonococo, também preparada no mesmo tampão. Os tubos foram agitados e incubados a 37°C em banho de água e observados a cada 30 minutos durante 3 horas. Quando ocorreu a mudança de cor para amarelo a prova foi considerada positiva, sendo negativa com a permanência da cor vermelha.

RESULTADOS

Os resultados dos testes de sensibilidade das 81 amostras de *Neisseria gonorrhoeae* obtidas durante este estudo estão sintetizados na Tabela 1.

Três amostras resistentes à penicilina e 7 resistentes à tetraciclina apresentaram halo de inibição menor ou igual a 19 mm. Aquelas 3 resis-

TABELA 1 - Sensibilidade de 81 amostras de *Neisseria gonorrhoeae* a antimicrobianos.

Agentes Antimicrobianos	Amostras Resistentes (%)
Penicilina	54,32%
Ampicilina	43,21%
Cefalotina	7,41%
Eritromicina	4,94%
Estreptomicina	24,69%
Gentamicina	7,41%
Tetraciclina	69,14%

TABELA 2 - Modelo de resistência das 3 amostras de *Neisseria gonorrhoeae* produtoras de penicilina.

Amostras	Antibiograma					
MIP 89027	Amp ^r	Cef ^r	Er ^m	Es ^r	Gent ^m	Pen ^r
MIP 89031	Amp ^r	Cef ^r	Er ^m	Es ^r	Gent ^m	Pen ^r
MIP 90012	Amp ^r	Cef ^r	Er ^r	Es ^r	Gent ^m	Pen ^r
					Tet ^m	Tet ^r

tentes à penicilina e diferenciadas por este critério foram também resistentes aos outros β-lactâmicos testados e à estreptomicina, sendo uma delas ainda resistente à tetraciclina e outra à eritromicina e tetraciclina (com halo de inibição menor que 19 mm) (Tabela 2). As 3 amostras foram testadas quanto à produção de β-lactamase e foram positivas, representando uma coerência de 3,7% de NGPP na população estudada.

DISCUSSÃO

A habilidade do gonococo para adquirir resistência aos antimicrobianos é reconhecida desde a introdução dessas drogas para uso clínico (19, 22). A penicilina tem sido a droga escolhida para o tratamento das infecções por *N. gonorrhoeae* desde a década de 40. Porém em 1957 algumas amostras de gonococo já apresentavam resistência 20 vezes maior que em 1944 (22). Em 1972 o sucesso terapêutico só foi obtido com uma dose 50 vezes maior que a inicial (20).

Atualmente, além dos altos níveis de resistência à penicilina, os gonococos também estão adquirindo resistência a outras drogas de primeira linha (10). No estudo realizado por Conde-Glez et al. (8), 34,4% das amostras isoladas foram resistentes à penicilina, 33,4% à ampicilina, 39,0% à eritromicina e 41,3% à tetraciclina. Entre as amostras testadas por Ng et al. (21), 10,9% foram resistentes à penicilina, 78% à tetraciclina, 51% à estreptomicina e 37% à cefalotina.

Os resultados encontrados neste estudo, também mostraram altos percentuais de resistência dos gonococos aos antimicrobianos, nos casos que foram utilizados os critérios de sensibilidade descritos por Jones et al. (13). No entanto, a referência acima não inclui a padronização à eritromicina, à estreptomicina, à cefalotina e à gentamicina. Para estas drogas, foram utilizadas os critérios padronizados para testar bactérias comuns e de crescimento rápido (2,3), e os resultados foram distintos dos descritos na literatura, já que nossas amostras mostraram-se mais sensíveis.

Ainda com referência ao antibiograma, os resultados obtidos indicaram que a ampicilina foi mais efetiva com as amostras isoladas do que a penicilina. Estes dados concordam com os descritos por Thorsberry et al (26), no entanto, são distintos daqueles encontrados por Coovadia et al (9). É possível que essas diferenças decorram de mutações nos "loci" pen A, mtr, pen B e Env, que podem conferir níveis distintos de resistências para as drogas citadas (25).

Concomitantemente à progressiva resistência cromossômica à penicilina, vem aumentando também a proporção de amostras NGPP em várias partes do mundo (15, 23). Em Lisboa, a presença de NGPP aumentou de 1,1% em 1983, para 19,2% em 1985 e 27% em 1987 (28). Em Zurique a freqüência aumentou de 1,7% em 1981 para 6,7% em 1985 (11). No Brasil, somente na década de 80 foram relatados os primeiros casos de NGPP. Em Recife a freqüência aumentou de 1,4% em 1983 para 8,3% em 1986 (18). Além de Pernambuco, também foram descritos casos em Brasília (12) e São Paulo (16). Neste trabalho, a ocorrência de NGPP foi de 3,7% na população estudada, resultando inferior aos encontrados por outros autores em estudos realizados na mesma época. No entanto, segundo Magalhães (17), somente em 1983 foi descrito o primeiro caso de uretrite por NGPP no Brasil, ao passo, que na maioria dos países onde os índices são mais elevados, as linhagens NGPP surgiram já no final da década de 70.

Considerando-se que em nosso País estão presentes todos os fatores de natureza demográfica, econômica, social e comportamental que favorecem a disseminação das NGPP, será necessário o estabelecimento de um programa de controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis, que inclua a monitorização da sensibilidade das amostras de gonococos e pesquisa de NGPP. Assim, seria possível orientar uma prescrição antimicrobiana apropriada, evitando-se dessa forma dados mais alarmantes do que os atualmente notificados em países desenvolvidos.

SUMMARY

Resistance to antimicrobial agents of *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated at Florianópolis, Santa Catarina

Eighty one *Neisseria gonorrhoeae* strains were obtained from public and private laboratories, throughout the period from April 1988 to May 1990. Specimens were plated directly onto Thayer-Martin medium and incubated at 36°C under carbon dioxide (5-10%) atmosphere during 24-48 h. All strains isolated were maintained in a semi-solid medium and stored at room temperature.

Sensibility to seven antimicrobial agents was determined by the disk diffusion agar method. This test was performed on chocolate agar prepared with GC agar base and 1% VX as a supplement. The inoculum was produced as a suspension of gonococci in physiological salt solution prepared at turbidity equivalent to 10^7 - 10^8 CFU/ml. A swab was used to inoculate *Neisseria* over the surface of the medium in agar plates. The results obtained with these isolates were as follows: 54,32% were resistant to penicillin, 43,21% to ampicillin, 7,41% to cephalothin, 4,94% to erytromycin, 24,69% to streptomycin, 7,41% to gentamicin and 69,14% to tetracycline. Strains that appear resistant to penicillin inhibition zones smaller than 20 mm were tested for penicillinase production by an acidometric method. This test is based upon a color change showed by a pH indicador when acid is produced from the splitting of ampicillin to penicilloic acid. Sodium ampicillin was added in a buffer-salt solution containing 0,8% potassium chloride and 0,01% phenol red to a concentration of 250 mg/ml. Immediately before testing, 20 μ l of ampicillin (250 mg/ml) were added in 100 μ l of buffer, previously to the addition of 30 μ l of a thick suspension of gonococci made in the same buffer. Tubes were shaken and incubated at 37°C in a water bath. They were observed at 30 minutes intervals and the definitive reading was made after 3h. The test was considered positive or negative when a yellow or red color appeared, respectively. Three strains were β -lactamase producers, representing an occurrence of 3,7% off penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* in the studied population.

Key Words: *Neisseria gonorrhoeae*, antimicrobial agents, β - lactamase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ashford, W.A.; Adams, H. J. V.; Johnson, S.R., Thomsberry, C.; Potts, D. W., English, J. C.; Biddle, J.W. & Jaffe, H. H. Spectinomycin-resistant penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. *Lancet* ii:1035-1037, 1981.
- Barry, A. L. & Thomsberry, C. - Susceptibility testing: diffusion test procedures. - In: Lennette, E. H., Bellows, A. Hausler, W. I. Jr. & Shadomy, H. J. ed. - Manual of Clinical Microbiology. 4th, Washington, American Society of Microbiology, p. 978-987, 1985.
- Bauer, A. W.; Kirby, W. W. M.; Sherris, J. C. & Turck, M. - Antibiotic susceptibility testing by a standardized single-disc method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45:493-496, 1966.
- Centers for Disease Control. Follow-up on antibiotic resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.* 26:29, 1977.
- Centers for Disease Control. Chromosomally mediated resistant *Neisseria gonorrhoeae* - United States. *Morbid. Mortal Weekly Rep.* 33:408-410, 1984.
- Centers for Disease Control. STD treatment guidelines. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.* 34 (suppl.):1-35, 1985.
- Centers for Disease Control. Antibiotic-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*: policy guidelines for detection, management, and control. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.* 36(suppl.):15-185, 1987.
- Conde-Glez, C. J.; Calderón, E.; Echániz, G.; Solórzano, F. & Beltran, M. - Serogroup specificity and antimicrobial susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Mexico city. *J. Antimicrob. Chemother.* 21: 413-416, 1988.
- Coovadia, Y. M.; Van Den Ende, J.; Hoosen, A. A. & Kharsany, A. - Susceptibility of penicillinase-producing and non-penicillinase-producing strains of *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Durban, South Africa, to 15 - lactam antibiotics. *Sex. Transm. Dis.* 15:30-34, 1988.
- Doern G. V. & Jones R. N. - Minireview. Antimicrobial susceptibility testing of *Haemophilus influenzae*, *Branhamella catarrhalis*, and *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32:1747-1753, 1988.
- Eichmann, A. & Eugster, H. P. - *Neisseria gonorrhoeae* in Zürich. *Schweiz. Med. Wschr.* 117:1374-1379, 1987.
- Franchini, M. - Prevalência de *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicillinase no Distrito Federal. Informação comunicada no I Encontro Nacional sobre Doenças Sexualmente Transmissíveis e III Simpósio sobre Doenças Sexualmente Transmitidas no Brasil Central. Brasília. D. F. 1984.
- Jones, R. N.; Gavan, T. L.; Thomsberry, C.; Fuchs, P. C.; Gerlach, E. H.; Knapp, J. S.; Murray, P. & Washington II, J. A. - Standardization of disk diffusion and agar dilution susceptibility tests for *Neisseria gonorrhoeae*: Interpretive criteria and quality control guidelines for ceftriaxone, penicillin, spectinomycin, and tetracycline. *J. Clin. Microbiol.* 27:2758-2766, 1989.
- Keevil, C. W.; Major, N. C.; Davies, D. B. & Robinson, A.. - Physiology and virulence determinants of *Neisseria gonorrhoeae* grow in glucose-, oxygen- or cystine- limited continuous culture. *J. General Microbiol.* 132:3289-3302, 1986.
- Kouri, Y. H.; González, L. Pérez, M.; Menar, R.; Gadea, C. R.; Kraiselburd, E. & Torres-Bauza, L. J. - Effect of penicillin and spectinomycin given for urethritis and cervicitis with *Neisseria gonorrhoeae*: High prevalence of penicillin-resistant isolates. *Genitourin Med.* 65:342-346, 1989.

16. Lombardi, C.; Siqueira, L. F. G.; Santos Jr., M. F. Q.; Francisco, W. & Belda, W – *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase: primeira cepa isolada em São Paulo, SP (Brasil). *Rev. Saúde Públ.* São Paulo, 19:374-376, 1985.
17. Magalhães, M. – Uretrite causada por *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase: relato de um caso. *Rev. Bras. Pat. Clín.* 20:116-118, 1984.
18. Magalhães, M. – *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase no Recife, Brasil. *Rev. Microbiol.* 18:229-234, 1987.
19. Martin, J.E.; Lester, A.; Price, E.V. & Schmale, J.D. Comparative study of gonococcal susceptibility to penicillin in the United States 1955-1969. *J. Infect. Dis.* 122:459, 1970.
20. Morse, S.A. & Johnson, S.R. – Antimicrobial resistance among sexually transmitted pathogens. *Am. Soc. Microbiol. News* 53:201, 1987.
21. Ng, W.S.; Anton P. & Arnold, K. – *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated in Hong Kong: in vitro susceptibility to 13 antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 19:12-17, 1981.
22. Reyn, A.; Korner, B. & Bentzon, M.W. – Effects of penicillin, streptomycin, and tetracycline on *N. gonorrhoeae* isolated in 1944 and 1957. *Br. J. Vener. Dis.* 34:227-239, 1958.
23. Rothenberg, R. & Voigt, R. – Epidemiologic aspects of control of penicillinase - producing *Neisseria gonorrhoeae*. *Sex. Transm. Dis.* 15:211-216, 1988.
24. Smania, A.J.; Gil, M.L. & Smania, E.F.A.. – Um novo meio para a conservação de *Neisseria*. *Rev. Microbiol.* 21:366-368, 1990.
25. Sparling, P.F. – Antibiotic resistance in the gonococcus. – In: Roberts, R.B. – The gonococcus. New York, John Wiley & Sons, p. 111-135, 1977.
26. Thomsberry, C.; Baker, C.N.; Jones, R.N – In vitro antimicrobial activity of piperacillin and seven other – lactam antibiotics against *Neisseria gonorrhoeae* and *Haemophilus influenzae*, including beta-lactamase producing strains. *J. Antimicrob. Chemother.* 5:137-142, 1979.
27. Thomsberry, C.; Jaffe, H.; Brown, S.T.; Edwards, T.; Biddle, J.W. & Thompson, S.E.. – Spectinomycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Am. Med. Assoc.* 237:2405-2406, 1977.
28. Vaz Pato, M.V.; Pires, I.R.; Klinger, B.V.; Louro, D. & Rosa, H. – *Neisseria gonorrhoeae* productrices de penicillinase (NGPP) isolées à Lisbonne 1982 - 1987. *Path. Biol.* 36:639-642, 1988.
29. Young, H. – Identification and penicillinase testing of *Neisseria gonorrhoeae* from primary isolation cultures on modified New York city medium. *J. Clin. Microbiol.* 7:247-250, 1978.

Recebido para publicação em 19/12/90

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A NEW PARA-CHLOROPHENOL DEGRADING STRAIN OF *PSEUDOMONAS* FROM SAMPLES OF NATURAL WATERS

Sonia Korol
Patricia Natale
Juan Moretton
Pilar Santini
Miguel D'Aquino

SUMMARY

Five para-chlorophenol degrading bacteria were isolated from samples of natural waters. All the strains isolated were Gram negative rods, and oxidase positive. Evidence of the fast and complete mineralization of para-chlorophenol was obtained only for a strain of the genus *Pseudomonas* (strain CS2).

Parameters associated with growth rate, concentration of para-chlorophenol, toxicity, and xenobiotic biodegradation were studied for this new indigenous strain.

The support of growth by diverse organic chemicals is reported. Growth rate and removal of the substrate under study were determined simultaneously. Degradation of para-chlorophenol by strain CS2 was shown to be complete. No toxic effect of the undissociated form of para-chlorophenol was observed when the removal of this compound was tested at different pH. Removal of target substrate from mixtures containing alternative carbon source demonstrated the possibility of concurrent growth. Changes in the biodegradation rates have been observed in microbial populations pre-exposed to para-chlorophenol.

Key Words: Para-chlorophenol, degradation, *Pseudomonas*

INTRODUCTION

Para-chlorophenol (p-CP) is a common estuarine pollutant resulting from chlorination of domestic waste water, pulp mills, chemical and tannery industrial effluents, and the breakdown of such biocides as 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and pentachlorophenol (10). Because of the widespread occurrence of p-CP, a certain amount of this haloorganic compound may enter the environment in a number of ways. This phenol derivative is toxic to a wide spectrum of organism resulting

in a serious environmental pollution. Although, a variety of physicochemicals techniques is available for the cleanup of soil and surface water, interest in the use of microbial biodegradative activity is growing (7,8). There is, therefore a need to develop a microbial technology in order to remove the contaminants "at source".

Only a few microorganism able to degrade chlorinated phenols have been described. Among them, some strains of the genera *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, and *Aspergillus* are capable of utilizing chlorobenzoate and chlorophenols as the

Cátedra de Higiene y Sanidad. Facultad de Farmacia y Bioquímica.
U.B.A. Junín 956 - 1113 - Buenos Aires. Argentina.

unique source of carbon and energy (12). *Pseudomonas* B13 has demonstrated the ability to utilize p-CP (13). This widely studied microorganism (5,13) tolerates just a low concentration of phenol or p-CP in liquid cultures. Therefore, long incubation period are required before p-CP can be utilized in continuous cultures. The extreme sensitivity to chlorophenols makes this strain useless in waste treatment plants.

Our plan was to isolate a p-CP metabolizing bacteria, able to perform biodegradation even in the most rigorous conditions as found in industrial effluents. In present study, p-CP degrading bacteria were isolated from samples of surface waters with a different degree of contamination.

The degraders were characterized and kinetic parameters associated with growth rate, concentration of p-CP, and toxicity were studied for a new indigenous strain of *Pseudomonas* (CS2). These parameters were chosen for their significance in any application of biodegradation to the removal of chlorinated phenols from waste water or other polluted environments.

MATERIALS AND METHODS

Isolation and characterization of microorganism

The bacteria were isolated by enrichment of a number of 100mL, surface water samples from two polluted rivers located near Buenos Aires city area (Río de la Plata and Río Reconquista).

Enrichment was performed with the samples by subculturing periodically in the same medium. Traces of organic nutrients carried by the original inocula were rapidly lost.

The concentration of the organic substrate (p-CP) under assay was maintained between 50 and 100 mg/L throughout the enrichment period.

Both, culture and enrichment were performed on a synthetic minimal medium as previously described (1,6).

p-CP was purchased from E. Merck. All the other chemicals were analytical reagent grade, from Mallinckrodt Chemical Co and E. Merck. The solution was prepared by dissolving the necessary amount in sterile 0.1 N NaOH.

The mixed cultures obtained by enrichment were streaked on nutrient agar (Merck) and minimal medium plates (minimal medium plus 1.5% agar) supplemented with p-CP. The pure cultures isolated from these plates were examined for reac-

tion to Gram staining, morphology and biochemical tests. Biochemical tests for identification of the bacteria were performed as detailed in Manual of Clinical Microbiology (4). Sensitivity to antibiotics was tested by means of either Bacto sensitivity disks or Bacto-unidisks (Difco).

Biodegradation test

The isolated bacteria were adapted by inoculation in minimal medium supplemented with 80 mg/L of p-CP as the only source of carbon, and incubated in a rotatory shaker at 28°C for 5 days. The stock culture was stored at 5°C for no more than 3 days.

Biodegradation assay was performed in a New Brunswick Multigen TA Microfermentor aerobically operated with mechanical agitation, at 28°C with a working volume of 1,250 mL. The pH was maintained at 7.4 with 0.2 N NaOH added from an automatic titration unit. The system was inoculated with 5 mL of stock culture.

Batch experiments for the determination of initial substrate concentration, pH and alternative carbon sources (acetate and pyruvate) effects in the p-CP biodegradation, were performed in 500 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of minimal medium. The flasks were inoculated with 0.5mL of stock culture suspension and incubated at 28°C in a rotatory shaker.

During incubation 10mL samples were removed from the system at appropriate intervals. In order to determine the amount of remaining p-CP, the bacterial cells were separated by centrifugation, and the filtered supernatant fluid was submitted to spectrophotometrical analysis (Shimadzu UV 210 A Spectrophotometer) measuring the absorbance at 249 nm. A standard curve with p-CP in different concentration was running simultaneously.

Determination of cell viability was performed by spreading samples dilutions on the surface of nutrient agar plates.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation and characterization of p-CP degrading bacteria

Closely related bacteria capable of degrading p-CP were isolated from both aquatic habitats. A history of prior p-CP exposure was not required for the isolation of p-CP degraders.

The degradation of p-CP in the minimal medium started after a lag of 3 to 4 weeks. There was no correlation between p-CP degradation and the extent of initial bacterial growth. After the first degradation of p-CP, subsequent reinoculations in minimal medium resulted in a degradation period of only 24 h. After 3 reinoculations in minimal medium plus p-CP, the population remained mixed. When the mixed population was plated on nutrient agar plus p-CP, small, translucent colonies routinely predominated after 3 days of incubation. The colonies had the ability to utilize p-CP as the sole carbon source.

Table 1 shows a characterization of five p-CP degrading bacteria strains by physiological and morphological criteria.

Evidence of the fast and complete mineralization of p-CP was provided by a batch growth of strain CS2. The use of this fast degrader strain was considered more convenient for further kinetic studies.

Strain CS2, Gram negative, non sporulating, aerobic, small to medium size rod, showed biochemical characteristic of the genus *Pseudomonas* (Table 2). Table 3 shows the sensitivity of strain CS2 to antibiotics.

TABLE 1 – Characterization of p-CP degrading bacterial strains by physiological and morphological criteria

origin	Río de la Plata			Río Reconquista	
strain	CS2	CS3	CS4	RS1	RS2
Gram staining	-	-	-	-	-
morphology	rods	rods	rods	rods	rods
pigmentation*	-	yellow	-	-	brown
cytochrome oxidase	+	+	+	+	+
catalase	+	-	+	+	-
acid production to:					
glucose anaerobic	-	-	-	-	-
glucose aerobic	+	+	-	+	-
arabinose	-	+	-	+	-
xylose	-	+	-	+	-
sucrose	-	+	-	+	-
inositol	-	+	-	+	-
mannitol	-	+	+	+	+
lactose	-	+	-	-	-
sensitivity to antibiotics:					
novobiocin	R	S	R	S	S
chloramphenicol	R	S	R	S	S
tetracycline	S	S	R	S	S
colistin	S	R	S	R	R
polymyxin	S	R	S	S	R

Note: R, resistant; S, sensitive

* : nutrient agar or minimal medium (plus 1.5% agar) containing 50 mg/L of p-CP

TABLE 2 – Biochemical reactions of CS2 strain

Test	CS2 strain
Oxidase	+
Catalase	+
Motility	+
Nitrate reduction	-
Indole	-
Methyl red	-
Voges Proskauer	-
Urease	+
H ₂ S production (Kligler's medium)	-
ONPG	-
OF Glucose	oxidative
Arginine dihydrolase	+
Lysine decarboxylase	+
Ornithine decarboxylase	+
Phenylalanine deaminase	-
Starch: hydrolysis	-
Esculin hydrolysis	-
Gelatin hydrolysis	-
Acid production from:	
inositol	-
xilose	-
sucrose	-
maltose	+
mannitol	-
rhamnose	-
arabinose	-
lactose	-
Growth at 42°C	-
Growth at 4°C	-
Growth in Mac Conkey	+
Growth in Saboureaud	+
Cetrimide tolerance	-

TABLE 3 – Sensitivity to antibiotics of CS2 strain

Antibiotic	CS2 strain
Penicillin	R
Methicillin	R
Rifamycin	R
Rifampin	R
Paramomycin	S
Novobiocin	R
Oleandomycin	R
Erythromycin	R
Lincomycin	R
Tetracycline	S
Streptomycin	S
Gentamicin	S
Kanamycin	S
Colistin	S
Nalidixic acid	S
Trimetoprim	S
Ampicillin	R
Chloramphenicol	R
Polymyxin	S

Note: R, resistant; S, sensitive

TABLE 4 – Utilization of organic compounds by CS2 strain as the sole source of carbon and energy

Carbon source (mg/L)	80	800
Phenol	+	-
Catechol	+	-
Benzoate	+	+
Benzene	+	+
2-chlorophenol	-	-
3-chlorophenol	-	-
4-chlorophenol	+	-
Pentachlorophenol	-	-
Lactose	-	-
Glucose	+	+
Maltose	-	-
Mannitol	-	-
Sucrose	-	-
Arabinose	-	-
Citrate	+	-
Acetate	+	+
Pyruvate	+	+
Histidine	-	-
Asparagine	+	+
Glycine	-	-
Lysine	+	+

Note: Organic chemicals were sterilized separately.

Growth responses was recorded as negative (-) or positive (+) after 48 h of incubation in a rotatory shaker at 28°C.

Diverse organic compounds were tested as the sole carbon source for strain CS2 (Table 4). The strain under study was not able to use either 2-chlorophenol or 3-chlorophenol as the sole carbon source. These results suggested that the p-CP degradation could be performed by a highly stereospecific enzyme in an "NIH shift" type reaction. The NIH hydroxylation has been described in *Pseudomonas* and occurs with a sufficiently large number of enzymes and substrates that could be considered as a general phenomenon of aromatic hydroxylation (2,18).

Biodegradation test

Table 5 shows the effect of increased concentration of substrate on the p-CP removal kinetics by strain CS2 pre-exposed to p-CP. The removal kinetics shows no variation with increasing p-CP concentrations up to 100 mg/L (0.77 mM). Concentrations above this level significantly decrease the removal velocity. This response was reported as characteristic of toxic substrate metabolism. (3).

Shimp and Phaender (14) suggested that extended exposure (adaptation) to phenol resulted in adaptation to structurally related aromatic compounds like p-CP. Fig. 1 shows an extended lag pe-

TABLE 5 – Influence of initial substrate concentration on the p-CP removal by CS2 strain

Incubation (h)	Removal %			
	80	90	100	150
10	10.8	20.0	22.0	4.1
20	24.3	34.1	32.0	16.0
30	54.1	55.5	56.0	22.6
40	94.5	88.6	60.0	24.0
50	98.6	97.7	95.4	46.6

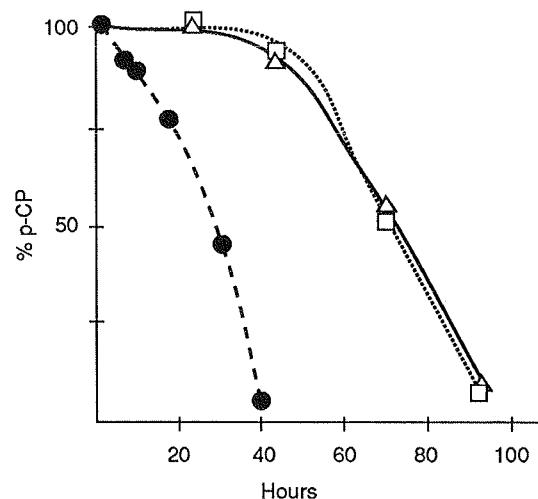


FIGURE 1 – Biodegradation rates of p-CP with CS2 strain. Batch experiment was performed in Erlenmeyer flasks containing minimal medium plus p-CP inoculated with non pre-exposed cells Δ , cells pre-exposed to 100 mg/L of phenol \square , or to 80 mg/L of p-CP \bullet .

riod when an unadapted strain was assayed with the p-CP concentration under study. The same strain pre-exposed to phenol showed no difference in the lag period. The p-CP adapted culture demonstrated a dramatic fall in the lag period. These results differ from those of Shimp and Phaender (14), probably due to the high stereospecificity of the enzymatic complex in p-CP degradation.

In spite of the use of chemical neutralization before the biological treatment of waste waters, the wastes of industrial process like tannery, suffer sudden pH variations along the day. There is a need of more information about the growth rate under excessively acid or alkaline conditions. Data from batch experiments for the determination of the pH influence on biodegradation are reported in Table 6. The strain under study showed a delay in the utili-

TABLE 6 - Effect of pH on the p-CP biodegradation by CS2 strain

pH	p-CP Added (mg/l)	Undissociated* p-CP (mg/l)	p-CP Removal %		
			24**	48	72
5	80	79.99	17.5	71.4	94.3
7	80	79.50	54.1	94.5	94.5
9	80	49.05	84.2	97.4	97.4

* : The amount of undissociated p-CP was calculated from the Henderson-Hasselbalch equation: $\log(\text{salt}/\text{acid}) = \text{pH} - \text{pK}_a$. The pK_a of p-CP is 9.2 at 20°C.

zation of p-CP at pH 5 (undissociated p-CP: 79.99 mg/L at 20°C). Stanlake and Finn (15) demonstrated that the growth of a chlorophenol (pentachlorophenol) degrader strain was inhibited by increases in the concentrations of the undissociated form of the substrate. In our case, the concentrations of the undissociated form of p-CP at pH 7 (79.50 mg/L at 20°C) resulted similar to those found at pH 5. At pH 7 the p-CP biodegradation during the first 24 h was considerable. The results suggested that the delay observed at pH 5 is related with the pH and do not correlate with toxic effects of the undissociated form of p-CP.

The kinetic of growth and substrate removal were determined in minimal medium with 80mg/L of p-CP as a sole carbon source. The experiments were performed in Microfermenor in order to avoid sudden variation in oxygen concentration, agitation, pH, and temperature during the growth period. Results are illustrated in Fig 2. The strain grew exponentially in the presence of p-CP with a growth rate of 0.21 doubling per hour (μ : 0.16 h⁻¹), biodegrading 95% of the substrate within 40 hours. The exponential phase of growth ended at 5.2×10^7 cells/mL.

The relative rate of biodegradation for man-made chemical in the presence of mixtures of alternative substrates in a matter of great practical importance in waste water treatment. Experimental evidence for sequential, concurrent or interactive substrate utilization patterns has been reported (16,17). Most of these studies on kinetics of biodegradation were performed using natural mixed microbial communities and glucose as non toxic substrate (9,11). In our case, the use of glucose in minimal medium containing p-CP resulted in a browning that inhibited the quantification of the substrate under study. Considering this last point, acetate and pyruvate was chosen as non toxic test compounds because the chemical structure did not interfere with p-CP determination and they were

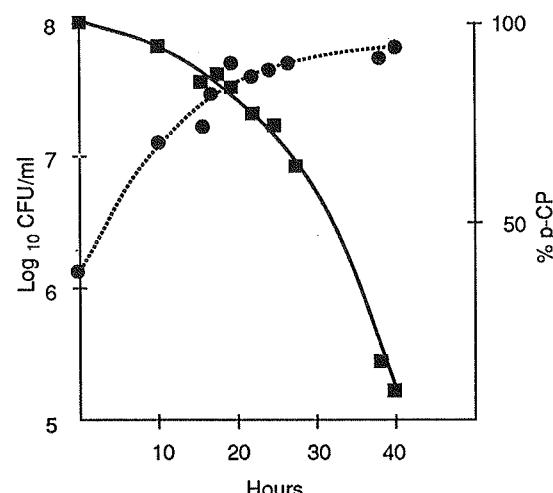


FIGURE 2 - Biodegradation of p-CP.
Growing cells of CS2 strain●.....
Remaining p-CP ■■■■■

TABLE 7 - Removal of p-CP (80 mg/l) from minimal medium containing the same concentration of acetate or pyruvate

Incubation (h)	Removal %		
	p-CP	p-CP + acetate	p-CP + pyruvate
8	10.8	15.4	13.1
16	10.8	27.6	20.5
24	24.3	51.3	26.3
32	54.1	82.1	56.4
40	91.9	94.9	92.3

readily metabolized by the strain CS2 as a sole carbon source. Batch experiments were carried out in Erlenmeyer flasks containing the same concentration of substrate under study and either acetate or pyruvate in 100 mL of minimal medium. Experimental results are shown in Table 7. In both cases the percentage of p-CP removed after 8 and 16 h incubation was higher than corresponding to the experiment reported in Fig 2.

The data reported suggest a concurrent substrate utilization and simultaneous growth on both substrates. The presence of a second substrate could result in the formation of an additional active cell mass, which in turn results in an overall increase in the rate of target substrate utilization. Further research is needed to describe the behavior of multi-substrate growth in order to obtain a better understanding of such a system.

We expect that the use of the isolated strain will provide the possibility of increasing the rate of destruction of, at least, certain toxic chemical that otherwise may be only too slowly transformed when released into natural waters.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted to miss Susana Castrovovo and Mr Jorge Lewonczuk for technical assistance. We wish to thank Dr. Ana Singerman for the careful revision of the manuscript.

RESUMO

Isolamento e caracterização de uma nova raça de *Pseudomonas* capaz de degradar p-clorofenol.

A partir de amostras de águas naturais foram isoladas cinco cepas bacterianas capazes de degradar o p-clorofenol, as quais foram caracterizadas como bacilos Gram-negativos e oxidase-positivas. Uma das cepas (CS2) foi caracterizada como pertencente ao gênero *Pseudomonas*, logrando uma mineralização rápida e completa.

Para esta cepa autóctone, se estudou a influência de diferentes parâmetros, tais como a concentração de p-clorofenol, toxicidade, biodegradação de compostos xenobióticos associados com a velocidade de crescimento.

A velocidade de crescimento e a remoção do substrato em estudo foram determinadas de forma simultânea. A forma não dissociada do p-clorofenol não mostrou efeitos tóxicos quando utilizado em diferentes pH. A remoção do substrato em misturas contendo fontes de carbono alternativas demonstrou a possibilidade de um crescimento concorrente. A pré-exposição das populações microbianas ao p-clorofenol, indicam mudanças nas velocidades de biodegradação observadas.

Palavras-chave: Para-clorofenol, degradação, *Pseudomonas*

REFERENCES

- D'Aquino, M., Korol, S., Santini, P. and Moretton, J. - Biodegradation of phenolic compounds. I. Improved degradation of phenol and benzoate by indigenous strains of *Acinetobacter* and *Pseudomonas*. *Rev. Lat-amer. Microbiol.*, 30: 283-288, 1988.
- Guroff, G., Daly, J.M., Jerina, D.M., Renson, J., Witkop, B. and Udenfriend, S. - Hydroxylation-induced migration: The NIH shift. *Science*, 157: 1524-1530, 1969.
- Hill, G.A. and Robinson, C.W. - Substrate inhibition kinetics phenol degradation by *Pseudomonas putida*. *Biotechnol. Bioeng.*, 17: 1599-1615, 1975.
- Hugh, R. and Gilardi, G.L. - *Pseudomonas* - In Manual of Clinical Microbiology. Third Edition. Edited by Lennette, E.H. Balows, A., Hausler Jr. W.J. and Truant, J.P. American Society for Microbiology. Washington D.C., p. 288-317, 1980.
- Knackmuss, H.J. and Hellwig, M. - Utilization and cooxidation of chlorinated phenols by *Pseudomonas* sp B13. *Arch. Microbiol.*, 117: 1-7, 1978.
- Korol, S., Orsingher, M., Santini, P., Moretton, J. and D'Aquino, M. - Biodegradation of phenolic compounds. II. Effects of inoculum, xenobiotic concentration and adaptation on *Acinetobacter* and *Pseudomas* phenol degradation. *Rev. Lat-amer. Microbiol.*, 31: 117-120, 1989.
- Morgan, P. and Watkinson, R.J. - Microbiological methods for the cleanup of soil and ground water contaminated with halogenated organic compounds. *FEMS Microbiol. Rev.*, 63: 277-300, 1989.
- Müller, R. and Lingens, F. - Microbial degradation of halogenated hydrocarbons: A biological solution to pollution problems? *Angew. Che. Int. Ed. Engl.*, 25: 779-789, 1986.
- Papanastasiou, A.C. and Mayer, W.C. - Kinetics of biodegradation of 2,4-dichlorophenoxyacetate in the presence of glucose. *Biotechnol. Bioeng.*, 24: 2001-2011, 1982.
- Pritchard, P.H., O'Neill, E.J., Spain, C.M. and Ahearn, D.G. - Physical and biological parameters that determine the fate of p-chlorophenol in laboratory test system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 1833-1838, 1987.
- Rozich, A.F. and Colvin, R.J. - Effects of glucose on phenol biodegradation by heterogeneous populations. *Biotechnol. Bioeng.*, 28: 965-971, 1986.
- Sahasrabudhe, S.R. and Modi, V.V. - Microbial degradation of chlorinated aromatic compounds. *Microbiological Sciences*, 4: 300-303, 1987.
- Schwien, U. and Schmidt, E. - Improved degradation of monochlorophenols by a constructed strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44: 33-39, 1982.
- Shimp, J.R. and Pfaender, F.K. - Effect of adaptation to phenol on biodegradation of monosubstituted phenols by aquatic microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 1496-1499, 1987.
- Stanlake, G.J. and Finn, R.K. - Isolation and characterization of a pentachlorophenol degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44: 1421-1427, 1982.
- Stuart, N.J., O'Mara, N.L. and Alexander, M. - Evidence for cometabolism in sewage. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40: 917-921, 1980.
- Stumm-Zollinger, E. - Effects of inhibition and repression on the utilization of substrates by heterogeneous bacterial communities. *Appl. Microbiol.*, 14: 654-664, 1966.
- Walsh, C. - Flavin and pterin dependent monooxygenases. - In Enzymatic Reaction Mechanisms. Edited by Walsh, C., Freeman, W.H. and Company USA, p. 406-431, 1979.

Received for publication in 28/02/91

OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS B₁ E G₁ EM AMENDOIM COMERCIALIZADO EM GOIÂNIA - GO, BRASIL

Valéria de Oliveira¹
Albenones J. Mesquita²
Álvaro Bisol Serafini²
José Leonides Ribeiro²
Maria do Rosário R. Silva²

RESUMO

Foram realizadas dosagens de aflatoxinas B₁ e G₁ em 104 amostras de amendoim em grão, sendo 68 de amendoim cru e 36 de amendoim torrado recoberto por pelúcias doce ou salgada. As amostras foram coletadas nos supermercados, feiras, armazéns ou trazidas ao laboratório pela comunidade. Os resultados revelaram que em 34,6% das amostras, a soma das aflatoxinas B₁ e G₁ ultrapassou o nível de 30 µg/kg estabelecido pela resolução 34/76, da CNNPA (Comissão Nacional de Normas e Padrões de Alimentos) do Ministério da Saúde, e que o percentual de amostras com nível de contaminação acima de 30 µg/kg não foi estatisticamente significante em relação ao tipo de grão. Em todas as amostras contaminadas por aflatoxinas B₁ o nível de contaminação estava acima de 30 µg/kg. Na maioria das amostras contaminadas o conteúdo de B₁ foi maior que G₁. Níveis elevados como 522,0 µg/kg foram encontrados para a soma dos valores médios de B₁ e G₁, enquanto níveis inferiores a 30 µg/kg não foram encontrados.

Palavras-chave: aflatoxina, amendoim.

INTRODUÇÃO

As aflatoxinas são metabólitos secundários, altamente tóxicos produzidos por fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente *Aspergillus flavus* Link e *Aspergillus parasiticus* speare que tem ampla distribuição na natureza, contaminando um grande número de produtos alimentícios.

Quimicamente, as aflatoxinas são cumarinas substituídas ligadas a deidrofurano. As mais comumente encontradas em alimentos, são as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂. As quatro substâncias são distinguidas com base nas suas fluorescências à

luz ultravioleta. As aflatoxinas B₁ e B₂ emitem fluorescência azul ("blue") e as aflatoxinas G₁ e G₂, verde ("green"). Em leite e derivados assume lugar de destaque a aflatoxina M₁, produto metabólico da aflatoxina B₁ ingerida pelo animal. Embora 17 substâncias do grupo das aflatoxinas sejam conhecidas, as mais importantes na natureza são as aflatoxinas B₁, G₁ e M₁ (12).

Incidentes como a morte de 100.000 filhotes de peru na Inglaterra, em 1960, onde a presença de aflatoxina foi detectada na torta de amendoim ingerida por estas aves, ou mesmo a presença de hepatomas em trutas criada em escala comercial e

1. Departamento de Análises Clínicas Bromatológicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás – Praça Universitária S/Nº – Cx. Postal 315 – CEP. 74.000 – Goiânia – GO
2. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás
Rua 235 com 1^a. Avenida – Cx. Postal 131 – CEP. 74.000 – Goiânia – GO

alimentadas com farelo de algodão contaminados por *A. flavus*, serviram para postular uma possível atividade cancerígena das aflatoxinas. Procurou-se então relacionar a contaminação de alimentos com esta toxina e hepatomas em seres humanos (4,6,9,10).

Aflatoxina produz morte em animais por dano direto no fígado, devido a necrose centrilobular, alteração dos condutos biliares, fibrose e hemorragia intestinal, como atestaram estudos subsequentes (10).

A contaminação de alimentos principalmente o amendoim por aflatoxina observada atualmente (3,5,7) oferece perigo potencial para a saúde pública, uma vez que das numerosas substâncias químicas naturais ou sintéticas as aflatoxinas parecem ser as mais potentes hepatocancerígenas (1,5,8). É portanto importante adquirir informações que possam ajudar num controle mais efetivo da contaminação dos produtos que são consumidos pela população.

O presente trabalho objetivou detectar e dosar aflatoxinas B₁ e G₁ em amendoim em grão cru ou torrado comercializado em Goiânia – GO.

MATERIAL E MÉTODOS

Sessenta e oito amostras de amendoim em grão cru, trinta e seis de amendoim torrado recoberto por película doce ou salgada foram coletados ao acaso pela Superintendência de Vigilância Sanitária da Secretaria de Saúde do Estado de Goiás nos diversos supermercados, ou adquiridos nas feiras livres, armazéns e trazidas ao laboratório pela comunidade.

A técnica de dosagem de aflatoxinas B₁ e G₁ utilizada para o experimento foi a da cromatografia em camada delgada, baseado no método (Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz) (9). Onde em 30g de cada amostra triturada em liquidificador, foi adicionado 10 ml de água destilada aquecida a 40° C e 100 ml de clorofórmio P.A., agitada por 60 minutos em agitador mecânico ou deixada em repouso por 12 horas, filtrada em papel de filtro whatman nº 04 e evaporada em banho-maria fervente.

O resíduo foi transferido para um funil de separação com 50 ml de solução de cloreto de sódio a 4% e 50 ml de metanol P.A. e agitado.

A extração dos lipídeos foi feita com três porções de 50 ml de n-hexano P.A., a das aflatoxinas com duas porções de 50 ml de clorofórmio P.A. Após evaporação em banho-maria o resíduo

foi diluído em 2 ml de clorofórmio P.A. e usado para cromatografar. 10, 20 e 30 µl da amostra e dos padrões de B₁ e G₁ foram aplicados em placas de sílica gel, para cromatografia em camada delgada, colocadas para desenvolver numa cuba contendo fase móvel de benzeno/acetato de etila/ etanol (60/38/2) ou clorofórmio/acetona (90/10). A leitura das placas foi realizada sob luz ultravioleta em 365 nm com a lâmpada a 30 cm da placa aproximadamente.

Após o desenvolvimento e leitura da cromatoplaca, foi aplicado uma gota de ácido sulfúrico P.A. a 25% sobre a mancha e observado. Se ocorresse mudança na fluorescência de azul para amarelo, confirmava-se a presença de aflatoxina. Este teste não é específico, pois muitos materiais reagem com ácido sulfúrico, mas o fato de não mudar de coloração para amarelo, denota a ausência de aflatoxina.

O cálculo da concentração de aflatoxina foi feito por comparação visual da intensidade de fluorescência dos padrões e da amostra pela seguinte fórmula:

$$\mu\text{g de aflatoxina} = \frac{S \times Y \times V}{W \times Z}$$

S = Microlitros de aflatoxina padrão de fluorescência igual à da amostra.

Y = Concentração de aflatoxina B₁ ou G₁ padrão em microgramas por ml.

V = microlitros do solvente requerido para diluir o extrato final.

Z = microlitros da mancha do extrato da amostra de intensidade de fluorescência igual à do padrão.

W = peso em gramas da amostra original, contida no extrato final.

A concentração dos padrões utilizados foi:

B₁ — 1,12 µg/ml e 3,1 µg/ml

G₁ — 1,12 µg/ml e 5,0 µg/ml

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas 104 amostras analisadas, 36 apresentavam uma concentração de aflatoxina B₁ acima de 30 µg/kg; os menores valores alcançados foram 49,3 µg/kg atingindo níveis de até 298,0 µg/kg como mostra a Tabela 1.

As amostras contaminadas por aflatoxinas G₁ tinham níveis que variavam de 14,9 µg/kg a 224,0 µg/kg como mostra a Tabela 2.

A concentração mais alta para a soma de aflatoxina B₁ e G₁ encontrada foi de 522,0 µg/kg.

Amostras contaminadas com a soma de afla-

TABELA 1 – Concentração de aflatoxina B₁ em amendoim

Nº de amostras	Média aritmética B ₁ µg/kg	Marcas	Percentual %
68	N.D.*	(várias)	65,48
04	49,3	D	3,85
08	74,6	A	7,69
10	112,0	F	9,61
06	149,3	B	5,77
05	224,0	C	4,80
03	298,0	E	2,88

N.D.* – Não detectada mancha fluorescente. Limite de detecção do método 8,0 µg/kg.

TABELA 2 – Concentração de aflatoxina G₁ em amendoim

Nº de amostras	Média aritmética B ₁ µg/kg	Marcas	Percentual %
80	N.D.*	(várias)	76,92
04	14,9	C	3,85
07	24,8	B	6,73
01	29,8	A	0,96
04	112,0	F	3,85
05	136,0	D	4,80
03	224,0	E	2,88

N.D.* – Não detectada mancha fluorescente. Limite de detecção do método 8,0 µg/kg.

TABELA 3 – Soma das médias aritméticas de aflatoxinas B₁ e G₁ em amendoim.

Nº de amostras	B ₁ + G ₁ µg/kg	Percentual %
64	N.D.*	
04	37,3	61,54
04	74,6	3,85
08	99,4	3,85
04	126,9	7,69
04	149,3	3,85
04	248,8	3,85
04	253,8	3,85
04	261,3	3,85
04	522,0	3,85

N.D.* – Não detectada mancha fluorescente. Limite de detecção do método 8,0 µg/kg.

toxinas B₁ e G₁ maior que 30 µg/kg não foram encontradas como mostra a Tabela 3.

A soma das concentrações de aflatoxinas B₁ e G₁ maior que 30 µg/kg foi encontrada em 35,29% das amostras de amendoim em grão cru, em 33,33% de grão torrado e 34,61% do total como mostra a Tabela 4.

Pelo teste do X² não observou-se diferença significativa entre os tipos de grão.

A legislação brasileira, resolução 34/76 da CNNPA (Comissão Nacional de Normas e Padrões

TABELA 4 – Amendoim contaminado por aflatoxina B₁ + G₁ por tipo de grão.

Tipo de grão	B ₁ + G ₁ acima de 30 µg/kg	Percentual %	Total
Cru	24	35,29	68
Torrado	12	33,33	36
Total	36	34,61	104

N.D.* – Não detectada mancha fluorescente. Limite de detecção do método 8,0 µg/kg.

de Alimentos) do Ministério da Saúde (2), fixa para os alimentos a tolerância de 30 µg/kg para aflatoxinas calculadas pela soma dos conteúdos de aflatoxinas B₁ e G₁, a Tabela 4 mostra que 34,6% das amostras analisadas estão com níveis acima do permitido pela legislação. Este percentual aproximou-se dos 39,0% obtidos por Miranda & Cols (3), em amostras de amendoim em Salvador – BA.

A Tabela 1 mostrou que em todas as amostras contaminadas o nível de aflatoxina B₁ estava acima de 30 µg/kg, o suficiente por si só para torná-las impróprias ao consumo e, na Tabela 2 verifica-se que metade das amostras contaminadas por aflatoxina G₁ apresentavam o nível acima de 30 µg/kg, diferindo de Ricciardi & Ferreira (5) que dosando aflatoxina B₁ em amendoim e doces de amendoim detectou 67,2% de amostras contaminadas onde apenas 24,5% estavam com níveis acima de 30 µg/kg.

Na maioria das amostras contaminadas o conteúdo de B₁ foi maior do que em G₁, o que é bastante grave uma vez que a aflatoxina B₁ é a mais tóxica (5, 8, 12).

Níveis altos como 522,0 µg/kg encontradas nas amostras analisadas tornaram-se preocupantes uma vez que já foram registrados surtos agudos de intoxicação em seres humanos como o ocorrido na Índia em 1974, onde uma hepatite epidêmica fatal apresentou taxa de mortalidade de 20% e onde 400 pessoas foram afetadas. Investigações posteriores revelaram que o milho componente principal da alimentação desta comunidade estava altamente contaminado com aflatoxina em concentrações de 250 a 15600 µg/kg (11).

Concluindo podemos afirmar que o amendoim que está sendo comercializado em Goiânia – GO, oferece riscos à população, quer pelo percentual de amostras com níveis de aflatoxinas B₁ e G₁ acima do permitido pela legislação, bem como altos níveis detectados.

Não houve diferença significativa nos níveis de contaminação por aflatoxina B₁ e G₁ no amendoim segundo o tipo de grão, cru ou torrado.

O controle deste tipo de contaminação deveria ser mais efetivo.

SUMMARY

The occurrence of aflatoxins B₁ and G₁ in peanuts dealt in Goiânia – Go, Brazil

Some dosages of aflatoxins B₁ and G₁ were made by thin layer chromatography in 104 samples of peanuts, being 68 in roasted peanuts, covered with a thin layer of sweet or salty covering. The samples were collected in supermarkets, market places, storehouses or brought to the laboratory by the community. The results showed that in 34,6% of the samples the amounts of aflatoxins B₁ and G were higher than 30 µg/kg the level established by the resolution 34/76 of CNNPA (Comissão Nacional de Normas e Padrões) of the health Ministry and that the number percent of samples with contamination level higher than 30 µg/kg was not statistically significant in relation to the kind of seeds. In all samples, contaminated with B₁ aflatoxin, the contamination level was above 30 µg/kg while in the samples, contaminated with G aflatoxin, 50% presented contamination levels higher than 30 µg/kg. In most contaminated samples the amount of B₁ was higher than G₁. Very high levels as 522,0 µg/kg were found in B₁ and G₁ aflatoxins while levels lower than 30 µg/kg were not found.

Key Words: aflatoxin, peanuts.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lin, M.T. – Biologia dos fungos Toxigênicos. In: Encontro Nacional de Micotoxinas: Problemas e Soluções. Anais. P. – 11-12, São Paulo, 1980.
- Ministério da Saúde – Brasil, Leis, Decretos, etc. Resolução 34/76, da CNNPA, Diário Oficial, Rio de Janeiro, 19 de janeiro de 1977. Secção 1 pt.1 P.710. Fixa padrões de tolerância para as aflatoxinas em alimentos.
- Miranda, M.S.; Carvalho, R.; Corral, F.; Oliveira, M. Z. & Bautista, A.R.P.I. – Pesquisa de aflatoxinas em amendoim comercializado em Salvador-BA. In: Encontro Nacional de Micotoxinas. Anais p. 22, São Paulo, 1988.
- Peres, A.C.D. – Determinação de Aflatoxinas B₁ e G₁. In: Encontro Nacional de Micotoxinas: Problemas e Soluções. Anais. p. 44-47, São Paulo, 1980.
- Ricciardi, J.A. & Ferreira, J.F. – Dosagem de aflatoxina B₁ em amendoim e doces de amendoim. *Rev. Bras. Farmácia*, 67:111-117, 1986.
- Sabino, M.; Pregnolato, W. & Tanus, M. T. – Aflatoxina em Alimentos in natura e preparados. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 29/30:65-71, 1969/1970.
- Sabino, M.; Inomata E.T. & Lamardo, L.C.A. – Variação dos níveis de aflatoxina B₁ em pasta de amendoim e paçoca consumidas no Estado de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42:39-44, 1982.
- Sabino, M. – Micotoxinas em alimentos. In: Encontro Nacional de Analistas de Alimentos. Curso de Micotoxinas em alimentos. Goiânia, p.01.02, 1986.
- Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo. Instituto Adolfo Lutz – Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz V. 01, 3^a ed. São Paulo, 1985.
- Tango, J.S. – Aflatoxina. Bol. Inst. de Tecnl. Alimentos. V. 1, 65/66: 1-11, 1974.
- Uboldi-Eiroa, M.N.O. – Micotoxinas e Micotoxicoses. *Bol. Inst. de Tecnl. Alimentos*, 16:335-441, 1979.
- World Health Organization • Mycotoxins • Geneva, Who, 1979 (environmental Health Criteria, 11) 127p.

Recebido para publicação em 08/01/90

RESISTÊNCIA TÉRMICA DE CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EM SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO (pH 7,0) E EM LEITE RECONSTITUÍDO

Irene Alexeevna Machoshvili¹
Thereza Christina Vessoni Penna¹
& Angelo José Colombo¹

RESUMO

Nove cepas de *Staphylococcus aureus*, isoladas de amostras de leite comercialmente pasteurizado, tiveram os seus parâmetros de resistência térmica determinados, utilizando-se duas metodologias diferentes (método do frasco e método dos tubos capilares), veiculadas em dois meios de aquecimento diversos: tampão fosfato valor de pH 7,0 e caldo de caseína-soja com 50% v/v de leite reconstituído. Em ambos os casos, a cepa F. de *S. aureus* demonstrou ser a mais termorresistente, apresentando valores de tempo de redução decimal de 245,51 seg e 197,91 seg, respectivamente em tampão fosfato e em leite reconstituído, à temperatura de 60°C. A resistência relativa (Z) da cepa F de *S. aureus* não apresentou diferenças significativas nos dois casos, confirmando que o tipo de metodologia não exerceu influência no resultado final.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, resistência térmica

INTRODUÇÃO

O *Staphylococcus aureus* é um dos agentes patogênicos mais comuns, responsável por surtos de toxinfecção alimentar. As peculiaridades do seu "habitat" tornam a sua presença largamente distribuída na natureza, sendo transmitido aos alimentos por manipuladores, na maioria portadores assintomáticos, e por animais, principalmente gado leiteiro portador de mamites, que apresenta altos índices de microrganismo no leite (Olson e cols., 1970; ICMSF, 1978; Iaria e cols., 1980; Clemente dos Santos e cols., 1981; Arantes e cols., 1982).

O agente causal de intoxicações alimentares no homem são enterotoxinas, produzidas por cepas específicas de *S. aureus* (Iaria, 1978); ICMSF, 1978; Iaria e cols., 1980).

As enteroxinas estafilocócicas são termorresistentes, suportando aquecimentos à temperatura de 100°C durante 30 minutos, sendo estáveis à temperatura de 4°C durante meses de armazenamento (Stumbo, 1973; Tatini, 1976; Linton, 1982). Alimentos fluidos, particularmente o leite, se forem mantidos por algumas horas às temperaturas ótimas para o crescimento de estafilococos, podem permitir produção de doses clínicas de enteroxinas (ICMSF, 1978). A pasteurização será capaz de diminuir de alguns ciclos logarítmicos a flora bacteriana, incluindo *S. aureus*, porém as enterotoxinas termorresistentes permanecerão ativas, mesmo se o leite pasteurizado for submetido ao processo de secagem (ICMSF, 1978; Firstenberg-Eden, 1979; Clemente dos Santos, 1981; Agel e cols., 1982).

1. Deptº de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP
Caixa Postal 66.355 05389 São Paulo, SP, Brasil

Práticas higiênico-sanitárias inadequadas na usina de beneficiamento podem contribuir para o aumento da população estafilocócica antes, durante e após o processo de pasteurização (Clemente dos Santos, 1981; Clemente dos Santos e cols., 1981; Agel 1982; Bouman e cols., 1982).

A ausência de condições higiênicas na produção de leite cru permitiu a ocorrência de populações que superaram níveis de (\log) 5,99 Unidades Formadoras de Colônias de *S. aureus* por mililitro, em 46% das amostras pesquisadas, procedentes de fornecedores da usina de Juiz de Fora (Clemente dos Santos e cols., 1981). Devido à habilidade de crescimento e produção de toxinas, em grande variedade de alimentos, em diversas condições de armazenamento e por apresentarem termorresistência no leite, maior que aquela observada para cepas de *Salmonella enteritidis* sorotípoo *senftenberg* e por outros microrganismos patogênicos de importância na pasteurização do leite, o *S. aureus* merece destaque especial no contexto sócio-econômico e na escolha do par tempo-temperatura de pasteurização (Stumbo, 1973); Clemente dos Santos e cols., 1981; Clemente dos Santos, 1981.

O desenvolvimento deste trabalho teve por objetivo a determinação dos parâmetros de resistência térmica de cepas de *S. aureus* em soluções tampão fosfato através do método do frasco, e em leite reconstituído, com teor de gordura de 3,2% m/v e resíduo seco desengordurado de 8,96% m/v, através do método do tubo capilar.

MATERIAL E MÉTODOS

Solução tampão Fosfato pH 7,0

Fosfato de sódio 12H₂O (14,3376 g) e fosfato de potássio (3,6312 g) foram dissolvidos em 2 litros de água destilada, o valor de pH foi ajustado para 7,0 e a solução esterilizada em autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Caldo de caseina-soja com 50% v/v de leite de vaca reconstituído

Composição:

Triptona.....	17,0 g
Peptona de soja.....	3,0 g
Cloreto de sódio.....	5,0 g
Fosfato de potássio dibásico....	2,5 g
D-glicose.....	2,5 g
Os solutos foram dissolvidos em 500 ml de	

água em ebulição. O meio foi filtrado, resfriado à temperatura de (45 ± 1)°C e adicionado de 500 ml de leite em pó reconstituído (26 g para 200 ml de água). O meio foi esterilizado em autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Microrganismo

As cepas de *S. Aureus* selecionadas para a realização do presente estudo foram isoladas de amostras de leite de vaca pasteurizado (teor de gordura a 3,2% m/v). Todas as cepas são produtoras de enzimas catalase e coagulase, e foram caracterizadas em função da fonte de origem humana ou bovina, do respectivo fagótipo e da capacidade de produção de enterotoxinas, recebendo a denominação de cepas A, B, C, D, E, F, G, H, e I (Vessoni Penna, 1985).

Tratamento térmico de cepas de *S. aureus* em solução tampão fosfato, através do método do frasco de 3 bocas (Machoshvili, 1990).

Cultura de 48 horas de *S. aureus*, desenvolvida na superfície de 7 ml de ágar inclinado (Ágar para Métodos Padronizados — BIOBRÁS), foi transferida para erlenmeyer contendo pérolas de vidro e barra magnética, com auxílio de 40 ml de solução tampão fosfato na proporção de 2 ml para cada tubo de ágar inclinado, obtendo-se contagens iniciais de 10⁷ UFC/ml. A suspensão foi homogeneizada por agitação magnética a 1060 rpm, durante 60 minutos, à temperatura de (4 ± 1)°C.

Aliquota de 500 ml de solução tampão fosfato foi transferida assepticamente para balão de 3 bocas estéril, provido de 100 g de pérolas de vidro. Um termopar acoplado a um termômetro digital foi introduzido em uma das extremidades do frasco e mergulhado abaixo da superfície da solução tampão fosfato. A abertura central do frasco foi utilizada para a introdução da haste do agitador mecânico. A terceira abertura foi utilizada para inoculação da suspensão de células vegetativas de *S. aureus* e retirada das amostras.

O conjunto foi mergulhado em banho de água termostaticamente controlado, de tal modo que a superfície da água do banho estivesse 2 centímetros acima da superfície da solução tampão fosfato. O conteúdo do frasco permaneceu sob agitação constante até atingir a temperatura de tratamento. Após alcançar o equilíbrio térmico, foi retirada uma amostra de 5 ml do conteúdo do frasco, para caracterizar o teste de esterilidade do meio de aquecimento.

Mantendo-se o meio sob agitação constante,

procedeu-se à determinação da resistência térmica da cepa de *S. aureus*. Inoculou-se 5 ml da suspensão de células de *S. aureus* e o cronômetro foi acionado para a contagem do tempo de tratamento térmico.

Aproximadamente 5 ml do meio foram retirados, a intervalos regulares de tempo, e imediatamente transferidos para tubos de ensaio estéreis, previamente resfriados, e levados ao banho de gelo e água, sendo agitados manualmente durante 20 segundos, para prevenir posterior destruição ou multiplicação dos microrganismos sobreviventes.

A viabilidade das células de *S. aureus* sobreviventes aos tratamentos térmicos foi determinada pelo método padrão de contagem em placas, por semeadura em profundidade (Ágar para Métodos Padronizados — BIOBRÁS). As placas foram incubadas à temperatura de $(33 \pm 1)^\circ\text{C}$ durante (48 ± 2) horas. Unidades Formadoras de Colônias foram contadas nas placas que apresentaram de 10 a 300 colônias. Os números de sobreviventes, em função dos tempos de tratamento, forneceram os tempos de redução decimal (D) das cepas de *S. aureus*, calculados a partir das inclinações das curvas de sobreviventes, para cada temperatura de tratamento, pelo método da regressão linear, através dos mínimos quadrados.

Tratamento térmico de cepas de *S. aureus* em leite reconstituído, através do método dos tubos capilares (Vessoni Penna, 1985)

Para cada par tempo-temperatura de aquecimento, foram empregados 20 (vinte) tubos capilares ($76 \text{ mm} \times 1,5 \text{ mm} \times 0,8 \text{ mm}$), inoculados com alíquotas de 0,01 ml de caldo de caseína-soja acrescido de 50% v/v de leite reconstituído, às concentrações entre 10^5 e 10^6 células por mililitro. Os tubos foram dispostos vertical e isoladamente em cestos de aço inoxidável, previamente estocados à temperatura de 4°C , durante tempo não superior a 2 horas.

Previamente ao tratamento térmico, os tubos capilares arranjados em cinco cestos foram mantidos em estufa à temperatura de $(33 \pm 1)^\circ\text{C}$ durante 15 minutos. Em seguida, os cinco cestos foram ao mesmo tempo imersos em 40 litros de água constantemente agitada, previamente estabilizada à temperatura de tratamento e termostaticamente controlada. Para cada temperatura de aquecimento, foram pré-fixados 5 tempos diferentes, cronometrados.

Ao final de cada tempo de tratamento, um cesto com 20 tubos capilares contendo amostras inoculadas teve o seu aquecimento interrompido por imersão em 40 litros de água e gelo com tem-

peratura variando entre 0° e 2°C .

Para cada cepa de *S. aureus* e temperatura de tratamento, seis tubos capilares contendo amostras inoculadas foram escolhidos ao acaso e submetidos aos mesmos procedimentos utilizados para os demais tubos, excetuando-se o tratamento térmico. Foram denominados tubos controles correspondentes ao tempo zero e ao número inicial de células de cada cepa de *S. aureus* submetida ao aquecimento.

Para cada tempo-temperatura de tratamento, 2 capilares vazios e outros 2 contendo 0,01 ml de tampão-fosfato esterilizado foram dispostos nos cestos de aço inoxidável, ao lado dos 20 tubos capilares contendo amostras inoculadas, e submetidos aos mesmos procedimentos que estes últimos, servindo de controle das condições de esterilidade durante o trabalho realizado. Os tubos capilares, submetidos ou não ao tratamento térmico, foram imersos em acetona 99% m/v durante 5 minutos, em seguida em solução sulfocrômica por 6 minutos e duas vezes em 20 ml de água destilada por 3 minutos.

Cada tubo capilar foi transferido para tubo de ensaio contendo 3 ml de caldo de caseína-soja (DIFCO). Os tubos capilares foram fragmentados dentro dos tubos de ensaio e estes incubados a $(33 \pm 1)^\circ\text{C}$ durante (24 ± 2) horas e (48 ± 2) horas. Havendo turvação do meio, procedia-se à confirmação da presença e pureza da cepa em estudo, por inoculação do meio de ágar de Baird-Parker (DIFCO), submetendo-se as culturas desenvolvidas à coloração de Gram e às provas catalase e coagulase.

Os valores de tempo de redução decimal e das constantes de destruição térmica foram calculados através do Número Mais Provável de Sobrevidentes (Stumbo, 1973). O método de regressão linear, através dos mínimos quadrados, foi aplicado no cálculo das inclinações das retas, que forneceram os valores de Z.

RESULTADOS

Na Tabela 1 estão representados os tempos de redução decimal (valores D), calculados a partir das inclinações das retas que representam as curvas de sobrevidentes das cepas A, B, C, F, H e I de *S. aureus*, submetidas aos tratamentos térmicos em solução tampão fosfato (pH 7,0), à temperatura de 60°C , utilizando-se o método do frasco de 3 bocas.

A cepa F de *S. aureus*, que exibiu o maior tempo de redução decimal à temperatura de 60°C (245,51 s), foi submetida a tratamentos térmicos

TABELA 1 - Tempos de redução decimal (valores D), equações das curvas de sobreviventes e coeficientes de correlação das cepas A, B, C, F, H e I de *S. aureus*, à temperatura de 60°C, em solução tampão fosfato (pH 7,0).

Cepa	D _{60°C} (s)	Equação da curva de sobreviventes	r
A	114,36	Log N = 8,0800 - 0,00870	-0,997
B	160,78	Log N = 6,3759 - 0,00620	-0,850
C	130,83	Log N = 7,4442 - 0,00760	-0,997
F	245,51	Log N = 7,7707 - 0,00410	-0,966
H	144,23	Log N = 6,8378 - 0,00690	-0,991
I	169,18	Log N = 8,2712 - 0,00590	-0,987

TABELA 2 - Tempos de redução decimal (D), equações das curvas de sobreviventes e coeficientes de correlação da cepa F de *S. aureus*, às temperaturas de 60°C, 61°C, 62°C, 63°C, 64°C e 65°C, em solução tampão fosfato(pH 7,0).

Temperatura	D(s)	Equação da reta	r
60	1245,51	Log N = 7,7707 - 0,00410	-0,966
61	142,33	Log N = 7,9484 - 0,00700	-0,995
62	107,15	Log N = 7,6875 - 0,00930	-0,993
63	61,16	Log N = 6,9996 - 0,01640	-0,985
64	38,05	Log N = 6,9464 - 0,02630	-0,977
65	24,16	Log N = 6,7843 - 0,04140	-0,988

na faixa de temperaturas de 60°C a 65°C, veiculada em solução tampão fosfato valor de pH 7,0.

Na Tabela 2 estão representados os tempos de redução decimal (D) da cepa F de *S. aureus*, submetida a tratamentos térmicos às temperaturas de 60°C a 65°C, em solução tampão fosfato pH 7,0.

A Figura 1 representa graficamente as inclinações das retas que forneceram os valores da Tabela 2.

A Tabela 3 apresenta os tempos de redução decimal, calculados a partir das curvas de sobrevivência das cepas A, B, C, D, E, F, G, H, e I de *S. aureus*, veiculadas em caldo de caseína-soja com 50% v/v de leite microrganismo, submetidas às temperaturas de 58°C, 60°C, 62°C, 64°C, 66°C e 68°C. A população inicial de cada cepa é representada pelo número de Unidades Formadoras de

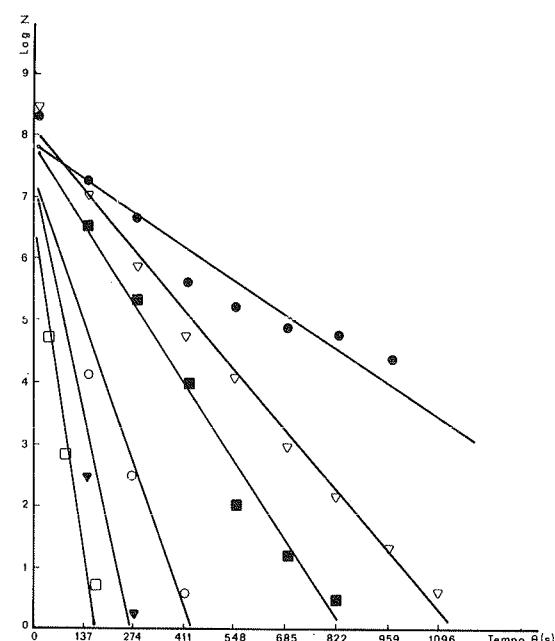


FIGURA 1 - Curvas de sobreviventes e parâmetros de resistência térmica da cepa F de *S. aureus* em solução tampão fosfato pH 7,0, às temperaturas de 60°C (●), 61°C(▽), 62°C(■), 63°C(○), 64°(▼), e 65°C (□).

Colônias por mililitro de amostra.

As curvas de tempo de destruição térmica (TDT) foram construídas a partir dos tempos de redução decimal, referentes à cepa de *S. aureus* ensaiada. O método de regressão linear, através dos mínimos quadrados, foi aplicado no cálculo das inclinações das retas que forneceram os valores Z, representados na Tabela 3.

DISCUSSÃO

A temperatura utilizada na incubação das cepas de *S. aureus* em tubos de ágar inclinado, a partir dos quais se preparou as suspensões bacterianas utilizadas nos tratamentos térmicos em solução tampão fosfato, foi de 33°C, considerada ótima de crescimento, e teve como finalidade a obtenção de número elevado de células, em fase estacionária de desenvolvimento. Este fato permitiu a utilização do método padrão de contagem em placas, por semeadura em profundidade, para a enumeração das células viáveis, seguido de incubação durante 24 e 48 horas, à temperatura de (33 ± 1)°C (APHA, 1976).

Na avaliação da densidade de células sobreviventes aos tratamentos térmicos pelo método dos tubos capilares, com populações por vezes extre-

TABELA 3 - Tempos de redução decimal (D) das cepas A, B, C, D, E, F, G, H, e I de *S. aureus*, às temperaturas de 58°C, 60°C, 62°C, 64°C, 66°C e 68°C, em leite reconstituído, e os respectivos valores Z.

Cepa	População inicial (UFC/ml)	58°C	60°C	62°C	64°C	66°C	68°C	Z(°C)
A	$1,54 \times 10^5$	173,28	60,67	24,12	8,19	5,42	2,45	5,43
	$2,33 \times 10^5$	227,82	86,97	32,20	11,60	5,61	2,89	5,19
B	$1,76 \times 10^6$	-	77,71	28,92	6,75	3,70	1,45	4,60
	$1,58 \times 10^6$	213,80	54,85	18,29	6,80	2,59	1,46	4,59
C	$5,38 \times 10^4$	280,28	163,68	76,44	24,21	9,41	3,83	5,17
	$2,70 \times 10^4$	186,83	102,25	37,87	14,06	7,06	2,83	5,38
D	$1,58 \times 10^6$	77,71	29,14	9,71	3,56	1,78	0,97	5,14
	$2,73 \times 10^5$	88,27	31,78	10,90	4,19	2,22	1,14	5,25
E	$1,94 \times 10^5$	169,74	85,65	35,64	13,23	5,73	2,48	5,33
F	$3,73 \times 10^5$	529,67	197,91	73,10	25,59	13,25	4,87	4,94
G	$1,37 \times 10^5$	304,97	117,30	33,24	14,79	7,23	-	4,82
	$1,87 \times 10^4$	286,49	110,97	39,28	15,16	6,11	2,64	4,87
H	$2,02 \times 10^5$	594,12	202,01	78,73	26,88	10,54	3,98	4,61
I	$4,98 \times 10^5$	198,03	69,25	22,55	9,35	4,76	-	4,87
	$1,03 \times 10^5$	257,77	88,33	22,64	8,89	3,38	-	4,20

mamente reduzidas, o método do Número Mais Provável, utilizando o caldo de caseína-soja, foi preferido ao método da semeadura. A confirmação da presença de *S. aureus* nos tubos de caldo de caseína soja foi realizada em meio específicos de Ágar de Baird Parker, e a quantificação da população pelo método da semeadura em profundidade, utilizando ágar de caseína-soja, que assemelha-se em composição ao caldo de caseína-soja. O método do Número Mais Provável, com caldo de caseína-soja, permitiu a recuperação de populações tão reduzidas quanto de uma única célula sobrevivente. Se o tempo máximo de 48 horas de incubação, das células tratadas em caldo de caseína-soja for prolongado, a verificação da viabilidade celular tornase difícil, senão impossível, prevendo-se até que a fase logarítmica de morte tenha sido atingida. Por esta razão a semeadura confirmatória em ágar de Baird Parker foi realizada após incubação de 24 e 48 horas a $(33 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Normalmente, o método do frasco é o preferido na determinação da resistência térmica de microrganismos mesófilos, às temperaturas inferiores a 100°C , devido a uma série de vantagens, dentre as quais destaca-se a ausência de uma fase lag inicial nos traçados das curvas de sobreviventes, em decorrência

do aquecimento instantâneo das células inoculadas no meio de aquecimento (Stumbo, 1973). O método do tubo capilar, proposto por Stern & Proctor (1954), pode ser utilizado na determinação de parâmetros de resistência térmica de células e esporos bacterianos, para amplo intervalo de temperatura, incluindo valores inferiores a 100°C . O método do tubo capilar apresenta a grande vantagem de submeter ao tratamento térmico simultâneo o número de amostras que for necessário, recebendo todas tempos de aquecimento e resfriamento idênticos. Também neste caso os tempos de tratamento dispensam correção, visto que os tempos de aquecimento e de resfriamento, se existentes, podem ser desprezados.

Das cepas de *S. aureus* estudadas, a cepa F, produtora de enterotoxina E, foi aquela que apresentou os maiores parâmetros de resistência térmica, para todas as temperaturas experimentais, quando adaptada ao caldo de caseína-soja com 50% v/v de leite reconstituído (tubos capilares) e em solução tampão fosfato (frasco de 3 bocas).

Os tempos de redução decimal obtidos para as cepas F e H de *S. aureus* à temperatura de 62°C em caldo de caseína-soja com 50% de leite reconstituído, foram muito próximos (Tabela 3). Porém, como a cepa F apresentou maior valor Z que a cepa

H, os valores D respectivos se distanciaram para temperaturas mais elevadas, confirmando ser a cepa F mais termorresistente. A cepa F apresentou parâmetros de resistência térmica muito próximos daqueles característicos de cepas mais sensíveis de *Mycobacterium tuberculosis* (Stumbo, 1973).

Walker (1966) obteve, à temperatura de 62°C, os tempos de redução decimal de 21 seg, 12 seg e 45 seg para cepa 161-C de *S. aureus* aquecida respectivamente em leite com teor de gordura 3,6%, leite desnatado e soro de leite com 0,4% de gordura e valor de pH de 6,5.

Stiles (1965) estudou a termorresistência de cepa 196-E de *S. aureus* em leite desengordurado, com valor de pH 6,5 e obteve Z igual a 7,2°C e tempo de redução decimal de 203,21 seg à temperatura de 62°C; em solução tampão com valores de pH 4,5; 5,5; 6,5 e 7,5 para os quais foram obtidos os valores Z de 10, 11°C; 9,61°C; 9,11°C; 8,24°C respectivamente, e os tempos de redução decimal correspondentes foram de 37,57 seg; 51,33 seg; 89,23 seg e 39,01 seg à temperatura de 62°C.

A utilização dos tubos capilares e do método do frasco na determinação dos parâmetros de resistência térmica indica a ocorrência de diferenças significativas. Os tempos de redução decimal obtidos pelo método do frasco apresentaram-se superiores aos obtidos pelo método dos tubos capilares, à temperatura de 60°C. Esta discrepância pode ter sido devida ao tipo de metodologia e ao meio de aquecimento utilizado.

A observação dos dados obtidos na resistência térmica da cepa F de *S. aureus* pelo método do frascos (em tampão fosfato) confirma os resultados obtidos pelo método dos tubos capilares (em caldo de caseína-soja com 50% v/v de leite reconstituído). Em ambos os casos, a cepa F demonstrou ser a mais termorresistente, apresentando valores Z próximos tanto em solução tampão fosfato, quanto em caldo de caseína-soja com leite reconstituído. O valor Z calculado para a cepa F em solução tampão fosfato, a partir do logaritmo dos tempos de redução decimal da Tabela 2, foi de 5,00°C. Para o caldo de caseína-soja com 50% de leite reconstituído, este valor foi de 4,94°C.

Concluindo podemos afirmar que: das cepas de *S. aureus* estudadas, a cepa F, produtora de enterotoxina, apresentou os maiores parâmetros de resistência térmica, para todas as temperaturas experimentais, veiculada tanto em caldo de caseína-soja com 50% v/v de leite reconstituído como em solução tampão fosfato (pH 7,0);

- a utilização das metodologias do frasco e dos tubos capilares apresentou diferenças significativas nos tempos de redução decimal porém houve con-

cordância nos resultados das resistências relativas da cepa F de *S. aureus*.

AGRADECIMENTOS

- Aos Técnicos Especializados Eva Ramos Geraldo de Sousa e Gledson Manso Guimarães, pelo auxílio em laboratório.

- Aos Técnicos Administrativos Angela Maria Lima e Juarez Vieira de Souza, pela datilografia dos trabalhos.

SUMMARY

Thermal inactivation studies on *Staphylococcus aureus* strains in potassium phosphate solution at pH 7,0 and in reconstituted milk

Heat resistance parameters have been determined for nine strains of *Staphylococcus aureus*, by determining the D and Z values, using the flask method and the capillary tube method. The heating medium were potassium phosphate buffer solution at pH 7,0 and casein-soy broth added with 50% v/v reconstituted milk. The temperature ranged between 60°C and 66°C. For both methods used and heating medium, the *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strain termed F showed the greatest thermal resistance parameters, exhibiting mean D_{60°C} value of 245,51 seconds and 197,91 seconds, respectively, in buffer and in milk. The mean Z value, for different work sets, was around 5.00°C. The mean D values, were obtained from the number of positive growth samples and death vegetative cells from Halvorson equation by using the capillary tube method; and from the survivor curve by using the flask method. The mean Z values were obtained from the thermal death time curves.

Key Words: *Staphylococcus aureus*, heat resistance

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agel, E.N.; Friend, B.A.; Long, C.A.; Shahani, K.M. - Bacterial content of raw and processed human milk. *J. Food Protection*, 45:533 - 36, 1982.
2. Apha - American Public Health Association - *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 2. ed., Washington, D.C., 1976. 702p.
3. Arantes, M.A.A.; Lima, E.G; Castro, O.C. - Prevalência de portadores de *Staphylococcus aureus* entre trabalha-

- dores de uma fábrica de produtos alimentícios. *Rev. Goiana Med.*, 28:151-8, 1982.
4. Bouman, S.; Lund, D.B.; Driessen, F.M.; Schmidt, D.G. - Growth of thermostable streptococci and deposition of milk constituents on plates of heat exchangers during long operating times. *J. Food Protection*, 45:806-12, 1982.
 5. Clemente dos Santos, E.; Genigeorgis, C.; Farver, T.B. - Prevalence of *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk used for commercial manufacturing of Brazilian Minas cheese. *J. Food Protection*, 44:172-6, 1981.
 6. Clemente dos Santos, E. - Survival and growth of *Staphylococcus aureus* in commercially manufactured Brazilian Minas cheese. *J. Food Protection*, 44:177-84, 1981.
 7. Firstenberg-Eden, R.; Rosen, B.; Mannheim, C.H. - A field topic seasonal and processed milk. *J. Food Protection*, 42:683-5, 1979.
 8. Iaria, S.T. - *Staphylococcus aureus em doces vendidos em padarias e confeitarias do município de São Paulo. Produção de enterotoxina estafilocócica e fagotipagem a partir das cepas isoladas (1975/1976)*. São Paulo, 1978. Tese Livre-Docência - Instituto de Ciências Biomédicas da USP.
 9. Iaria, S.T.; Furlanetto, S.P.M.; Cerqueira-Campos, M.L. - Pesquisa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico nas fossas nasais de manipuladores de alimentos em hospitais. *Rev. Saúde Públ.*, 14:93-100, 1980.
 10. ICMSF - International Commission in Microbiological Specifications for Foods. *Microrganisms in foods*. 1. Their significance and methods of enumeration. 2. ed., Toronto, University of Toronto Press, 1978. 434p.
 11. Linton, A.H. - *Microbes, Man and Animals*, Wiley, New York, 1982. 342p.
 12. Machoshvili, I.A. - *Resistência térmica de cepas de Staphylococcus aureus em solução tampão fosfato e em leite de soja*. São Paulo, 1990. 134p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.
 13. Olson, J.C.; Casman, E.P.; Baer, E.F.; Stone, J.E. - Enterotoxicogenicity of *Staphylococcus aureus* cultures isolated from acute cases of bovine mastitis. *Appl. Microbiol.*, 20:605-7, 1970.
 14. Stern, J.A. & Proctor, B.E. - A micro-method and apparatus for the multiple determination of rates of destruction of bacteria and bacterial spores subjected to heat. *Food Technol.*, 8:139-43, 1954.
 15. Stiles, M.E. & Witter, L.D. - Thermal inactivation, heat injury, and recovery of *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci.*, 48:677-81, 1965.
 16. Stumbo, C.R. - *Thermobacteriology in food processing*, 2. ed. New York, Academic Press, 1973. 236p.
 17. Tatini, S.R. - Thermal stability of enterotoxins in food. *J. Milk Food Technol.*, 39:432-8, 1976.
 18. Vessoni Penna, T.C. - Parâmetros de resistência térmica de cepas de *Staphylococcus aureus* no leite. São Paulo, 1985. 300p. Tese Doutoramento - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.
 19. Walker, G.C. & Harmon, L.G. - Thermal resistance of *Staphylococcus aureus* in milk, whey and phosphate buffer. *Appl. Microbiol.*, 14:584-590, 1966.

Recebido para publicação em 30/12/90

FLORA BACTERIANA HETEROTRÓFICA EM OSTRAS (*CRASSOSTREA RHIZOPHORAE*) E ÁGUAS DA BAÍA NORTE, ILHA DE SANTA CATARINA, BRASIL

* R.L., Cerutti & T.C.P., Barbosa

RESUMO

A população bacteriana das águas da Baía Norte da ilha de Santa Catarina foi estudada utilizando-se a ostra *Crassostrea rhizophorae* como biondicador. Foram realizadas avaliações quali-quantitativas de bactérias heterotróficas originárias da água do mar e de ostras de três locais da Baía. Nas ostras, analisou-se a massa digestiva e o corpo inteiro do animal. Os resultados mostram altas concentrações de bactérias na água e nos bivalves. A maior acumulação de microrganismos foi detectada no trato digestivo das ostras. Enterobactérias predominam na água enquanto as *Pseudomonadaceae* são mais frequentes nos bivalves.

Palavras-chave: bactérias heterotróficas, bivalves, ostras, *Crassostrea rhizophorae*.

INTRODUÇÃO

A água das baías e estuários normalmente contém milhões de bactérias em cada mililitro; esta microflora é constituída de grupos marinhos autóctones e de outras espécies de origem terrestre; parte dessas bactérias, de origem entérica, são lançadas ao mar pelos efluentes domésticos e atuam como indicador de contaminação fecal(12). Assim, a descarga dos efluentes urbanos contribui duplamente para o crescimento bacteriano, seja pelo aporte de resíduos orgânicos ou pela introdução de novas espécies(2).

As substâncias orgânicas, dissolvidas ou suspensas na água atuam como importante fonte de nutrientes para os microrganismos heterotróficos. Em baías poluídas e portos a concentração de matéria orgânica pode atingir valores próximos a 100mg de substância orgânica por litro. A composição e o tamanho das populações bacterianas ou fúngicas de um corpo de água dependerá portanto da concen-

tração e composição dessas substâncias (13).

A contaminação do mar devida ao lançamento de efluentes origina dois tipos de problemas relevantes em saúde pública: riscos associados a banhos em locais contaminados e riscos ligados ao consumo de animais habitantes destas zonas(14). Neste último caso é importante citar que os mais incriminados são os moluscos bivalves (ostras e mexilhões), que sendo filtradores são responsáveis pela acumulação de resíduos e bactérias associadas(2,5). O mecanismo de acumulação e sobrevivência destes microrganismos em bivalves está relacionado ao fenômeno digestivo(4) e a utilização direta dos órgãos envolvidos nesse processo parece mais confiável quando se visa avaliar as cargas bacterianas do meio exterior(10).

Numerosos trabalhos na área de poluição bacteriana classificam o comprometimento de zonas costeiras utilizando-se das contagens de coliformes fecais e totais(1). O cultivo de bactérias heterotróficas pode auxiliar na avaliação do compro-

* Bolsista de Aperfeiçoamento do CNPq
Departamento de Biologia/CCB - Universidade Federal de Santa Catarina - C.P. 476 - 88049 - Florianópolis - SC.

metimento da água à nível de atividade decompositora. A constatação de altas densidades bacterianas indica intensa quantidade de nutrientes orgânicos, assimiláveis por esta microflora(7).

O estudo conjunto das microfloras heterotróficas e coliformes é importante e recomendável quando se trata de avaliações do comprometimento da qualidade de águas receptoras de efluentes domésticos, utilizáveis para banho e consumo de animais(6). A utilização de um animal filtrador como indicador da contaminação bacteriana é importante porque fornece informações anteriores ao momento da coleta(3).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o comprometimento das águas da baía norte da ilha de Santa Catarina. Este estudo fez-se necessário devi-

do a existência de projetos de implantação da ostreicultura na região. Com este intuito, tentou-se simultaneamente avaliar os coliformes e bactérias heterotróficas totais na água, estendendo a análise das heterotróficas totais às ostras nativas (*Crassostrea rhizophorae*).

METODOLOGIA

Estabeleceram-se três pontos de coleta na Baía Norte da Ilha de Santa Catarina, demarcados na Figura 1. Todos os pontos recebem, direta ou indiretamente, canalizações de efluentes domésticos. Os números correspondem as estações de coleta: 1 - Estação da Ponta do Coral, que recebe

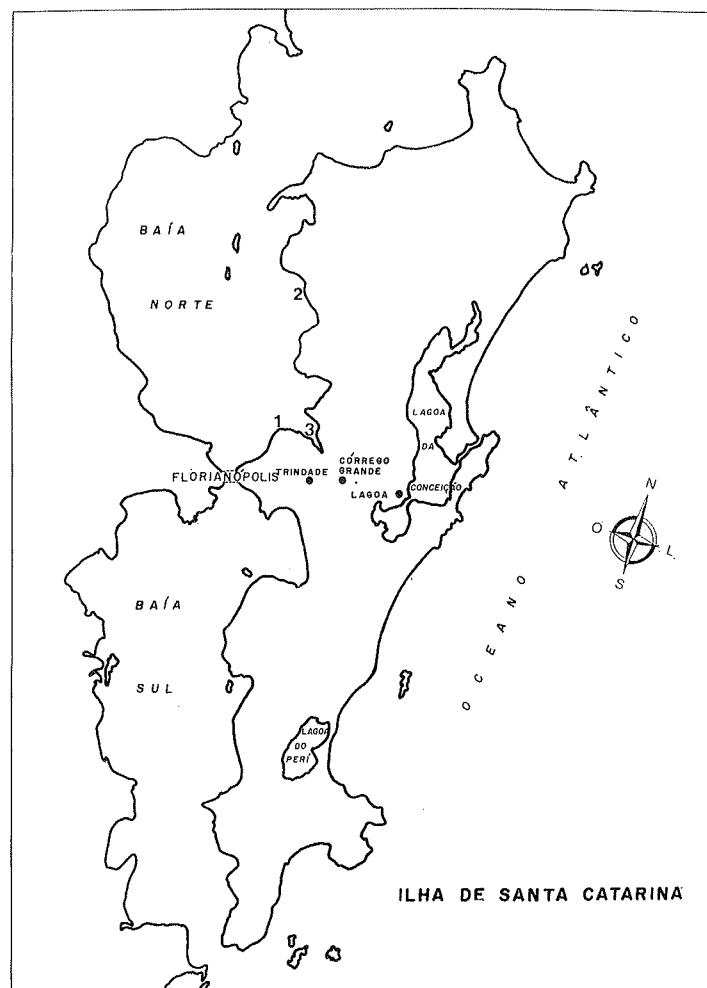


FIGURA 1 - Ilha de Santa Catarina. Locais de Coleta: 1- Ponta do Coral; 2 - Santo Antônio de Lisboa; 3 - Mangue do Itacorubi.

efluentes do centro da cidade Florianópolis;
 2- Estação de Santo Antonio de Lisboa, que recebe efluentes das comunidades de Cacupé, Santo Antônio de Lisboa e Sambaqui, além dos efluentes diluídos do Mangue do Itacorubi e Ponta do Coral, conforme as correntes marinhas que atuam na região;
 3 - Estação do Mangue de Itacorubi, que recebe efluentes do centro da cidade e dos bairros Santa Mônica, Itacorubi, Pantanal e Campus Universitário.

Amostras mensais de água e ostras (*C. rhizophorae*) coletadas à maré baixa foram acondicionadas em recipientes de poliestireno com gelo a uma temperatura média de 5°C e transportadas ao laboratório para análise bacteriológica. A temperatura da água local foi medida em todas as coletas.

Em laboratório, as ostras foram escovadas sob água corrente. Um exemplar foi aberto assépticamente. A massa digestiva (intestino e glândula digestiva) foi retirada, pesada e triturada em maceradores manuais de vidro jateado, adicionando-se 5 ml de água do mar estéril. Um segundo indivíduo foi aberto, o corpo inteiro, exceto a água intervarvar foi recolhido, pesado e macerado da mesma forma. A água do mar, solução homogênea de massa digestiva e de corpo inteiro foram semeados em ágar 2216E(11) que propicia o crescimento de bactérias heterotróficas totais do meio marinho. As culturas, em duplicatas, foram enumeradas após 7 dias de incubação à 25°C em obscuridade.

Tentativas de enumeração de coliformes totais na água do mar foram efetuadas, utilizando-se da técnica de MF (Millipore 0,45μ) cultivadas em AEMB (Agar Eosine-Metilene Blue Teague-MERCK), incubado a 37°C por 48 horas(1).

A partir das amostras de água e de ostras provenientes das estações 1 e 3, isolaram-se 54 cepas bacterianas (28 da água do mar e 26 das ostras). As cepas foram submetidas aos seguintes testes para identificação do grupo taxonômico: fermentação da glicose, catalase, oxidase, crescimento sobre AEMB (Agar Eosine-Metilene Blue Teague), crescimento a 5 e a 44°C, coloração de Gram, morfologia e mobilidade segundo a metodologia corrente.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Os dados provenientes das amostragens das estações 1, 2 e 3, totalizando 16 coletas estão expressos na Tabela 1.

A água do mar de todas as estações apresenta oscilações das densidades bacterianas heterotróficas

Estação 1			
meses	água do mar	massa digestiva	corpo inteiro
março			
abril	2100	5800000	26000
maio	390000	320000	68000
junho	110000	250000	1100000
setembro	28000	160000	87000
novembro	34000	120000	620000
dezembro	2100	9000	4400
Estação 2			
meses	água do mar	massa digestiva	corpo inteiro
março	18000	35000	34000
abril	14000	1300000	50000
maio	4000	690000	82000
junho	98000	1500000	230000
setembro	3700	150000	150000
novembro	10000		21000
dezembro			
Estação 3			
meses	água do mar	massa digestiva	corpo inteiro
março			
abril			
maio	200000	800000	190000
junho	910000	1500000	580000
setembro			
novembro	39000	82000	8700
dezembro	160000	2000	430000

TABELA 1 - Enumerações de bactérias heterotróficas nas três estações de coleta. Os resultados são expressos em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama (massa digestiva e corpo inteiro) ou mililitro (água do mar).

variando de 1000 a 100.000 UFC ml⁻¹. As densidades elevadas são mais frequentes nas estações 1 e 3. Estes valores são próximos ao citados por outros autores(9, 10) para locais poluídos. As densidades bacterianas aqui encontradas têm estreita relação com a qualidade da água da baía, pois todos os sítios de coleta sofrem efeitos de contaminação natural (mangues) e antropogênica (efluentes e resíduos). Em zonas abrigadas, como a que se refere o estudo, a dispersão da carga poluidora é mais lenta e ocorre uma acumulação de resíduos orgânicos que atuam como nutrientes para o crescimento bacteriano. Numerosos trabalhos relatam que proliferações bacterianas têm estreita relação com o alto nível trófico de algumas regiões como as zonas costeiras(7,13).

Coliformes totais foram detectados esporadicamente nas três estações; no mês de setembro, a estação 2 apresentou 100 coliformes em 100 ml de água, no mês de novembro as estações 1 e 3 apresentaram valores superiores a 300 UFC por 100 ml. A ausência de periodicidade aqui observada re-

sultou em dados pouco confiáveis e inconsistentes, mas que indicam uma provável poluição fecal na Baía Norte.

As contagens obtidas na massa digestiva das ostras oriundas das três estações de coleta são frequentemente superiores a 100.000 UFC g⁻¹). Para o corpo inteiro estes valores oscilam muito (1.000 até 1.000.000 UFC g⁻¹). As densidades bacterianas das ostras (massa digestiva e corpo inteiro) variam de um local para outro como também variam em relação às densidades bacterianas da água do mar (vide tabela). *Crassostrea rhizophorae* assim como outras espécies de ostras apresentam uma microflora bacteriana comensal(9) que pode ser detectada em meios de cultura para heterotróficas marinhas. O uso da ostra como bioindicador é discutível, neste caso, pois a sua flora comensal é quantificada juntamente com as heterotróficas totais. A utilização da massa digestiva na análise bacteriana destes animais evidenciou altas concentrações de bactérias neste órgão, corroborando resultados de outros autores (8, 10).

Em relação à análise qualitativa, do total de cepas isoladas da água do mar, 50% pertenciam ao grupo das Enterobacteriaceae, 38,5% eram Pseudomonadaceae, 7,6% Vibrionaceae e 2,6% foram cocci não identificados. Nas ostras, 50% das cepas isoladas e analisadas eram Pseudomonadaceae, 21,4% Enterobacteriaceae/Photobacterium, 17,9% Vibrionaceae e 10% foram cocci não identificados. Tais resultados revelam uma possível seleção bacteriana nos bivalves, que acumulam e favorecem o estabelecimento de uma flora mais adaptada às condições internas do animal. É natural, portanto, que nas ostras sobrevivam microrganismos marininhos, mais adaptados a este ambiente como algumas Pseudomonas. Resultados semelhantes foram observados em *Mytilus edulis* (4). A instalação das microfloras no animal é temporária, e alguns ensaios de contaminação bacteriana em mariscos, recuperaram *Serratia marcescens* no intestino do animal até o máximo de 24 horas, enquanto que as pseudomonadáceas são encontradas mesmo após 72 horas(3). No presente trabalho a detecção menos representativa de Enterobactérias nas ostras talvez seja uma comprovação deste fato.

Fatores como a resistência bacteriana à degradação enzimática, adaptação ao meio marinho e a habilidade em utilizar o conteúdo digestivo do animal(4) como fonte de nutrientes são provavelmente os fatores essenciais da seleção bacteriana pelos bivalves.

A falta de relação entre a quantidade de entrobactérias na ostra e na água não deve inibir estu-

dos similares visando a detecção de bactérias contaminantes, pois na verdade não existe uma real simultaneidade entre a amostra de água e a amostra do bivalve. A primeira fornece resultados instantâneos da massa d'água no momento da coleta, a segunda corresponde a integração total ou parcial do molusco às características bacteriológicas e ambientais de massas d'água que se sucederam antes da coleta.

Os resultados aqui obtidos são insuficientes quanto a indicação da contaminação bacteriana da baía. Faz-se necessário um estudo mais longo, sazonal, efetuando uma análise mais precisa das bactérias, no mínimo à nível de gênero, antes de implantar qualquer sistema de ostreicultura ou mitilicultura na região. O aprofundamento deste estudo, avaliará o comprometimento local, tempo de sobrevivência das bactérias contaminantes na água, seleção bacteriana e tempo necessário para a depuração dos bivalves cultiváveis antes da sua comercialização.

SUMMARY

Heterotrophic bacteria in oysters and waters of North Bay, Santa Catarina, Brazil

The bacterial populations in North Bay, Santa Catarina Island (SC, Brazil) were studied, using *Crassostrea rhizophorae* as bioindicator. The heterotrophic bacterial contend, in the water and oysters, collected at three different sites in the bay was analysed. Digestive gland and hind gut, and the whole tissue of the animal's body were also studied. Higher levels of bacterial contamination were found in both, water and oysters, and bacterial accumulation was clearly shown in the digestive gland and hind gut of oysters. Qualitative analysis revealed Enterobacteriaceae, mainly in the water. Pseudomonadaceae were predominant in oysters tissue.

Key Words: heterotrophic bacteria, bivalve, oysters, *Crassostrea rhizophorae*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. American Public Health Association - Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. 2^a Ed. Washington, APHA, 1985.
2. Ayres, P.A., Burton, H.W. & Cullum, M.L. - Sewage and shellfish in Techniques for the Study of mixed populations. Academic Press. N.Y. 51-62, 1978.
3. Barbosa, T.C.P. - Le processus d'accumulation des bacté-

- ries chez les mollusques bivalves. Étude expérimentale chez *Mytilus edulis*. *These de doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale*, Brest, France. 134p, 1987.
4. Barbosa, T.C.P. & Prieur, D. - Comparative Study of the bacterial flora of seawater and *Mytilus edulis* stored 10° C. *Proceedings 2nd Biennal Water Quality Symposium: Microbiological aspects*. 229-232. Viña del Mar, Chile, 1990.
 5. Bayne, B.L. - Marine mussels: their ecology and physiology. Cambridge University Press. London. 506p, 1976.
 6. Hagler, A. & Hagler, L.M. - Microbiologia Sanitária. In Tratado de Microbiologia. vol. 1. Isaac Roitman, Luiz R. Travassos, João Lúcio Azevedo. Ed. Manole. São Paulo. 186p, 1988.
 7. Jacq, E.- Etude des peuplements bactériens planctoniques et dans deux systèmes côtiers de Bretagne: la Rade de Brest et la zone frontale d'Ouessant. *These de doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale*, Brest, France. 127p, 1986.
 8. Kueh, C.S.W. & Chan, K. - Bacteria in bivalve shellfish with special reference to the oyster. *J. Appl. Bact.* 59: 41-47, 1984.
 9. Lovelace, T.E., Tubiash, H. & Colweel R.R. - Quantitative and qualitative commensal bacterial flora of *Crassostrea virginica* in Chesapeake bay. *Proceedings of the National Shellfisheries Association*, 58: 82-87, 1968.
 10. Minet, J.; Barbosa, T.C.P.; Prieur, D. & Cormier, M. - Mise en évidence le processus de concentration des bactéries par la moule *Mytilus edulis* (L.). *C.R. Acad. Sci. Paris*. Vol. 18: 41-44, 1988.
 11. Oppenheimer, C.H. & Zobell, C.E. - The growth and viability of sixty three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure. *J. Mar. Res.* 11: 10-18, 1952.
 12. Plusquellec, A. - Contribution à l'étude de la pollution bactérienne des eaux littorales. Cas particulière de la baie de Concarneau. La forêt. *These de 3ème Cycle Oceanog. Biol.* Université de Bretagne Occidentale. 202p, 1984.
 13. Rheinheimer, G. - Aquatic Microbiology. 2nd Edition. John Wiley & Sons. N.Y. 235p, 1980.
 14. Riichi, P. & Sakasaki, R. - Halophilic vibrio infections. In: food borne infections and intoxications. Academic Press. 115-118, 1968.

Recebido para publicação em 12/11/90

EMPREGO DE ALGUMAS FONTES NITROGENADAS NA OBTENÇÃO DE BIOMASSA DE *OSCILLATORIA LIMNETICA*

Bluma Linkowski Faintuch
Sunao Sato
Eugenio Aquarone¹

RESUMO

Foi realizado um estudo do rendimento de biomassa e de proteínas totais da cianobactéria *Oscillatoria limnetica* em meios sintéticos com diferentes fontes de nitrogênio. Utilizaram-se nitrato de potássio, uréia e cloreto de amônio, em cinco diversas concentrações cada um. A melhor produção de biomassa da *O. limnetica* foi conseguida em meios contendo nitrato de potássio a 2,57 g/l, porém com uma oferta de 1,0 g/l, obtiveram-se resultados bastante favoráveis, assim como com a uréia e o cloreto de amônio em baixas concentrações. As concentrações protéicas determinadas ficaram na faixa de 30,3 - 82,7%. Conclui-se que valores satisfatórios de biomassa e proteína podem ser obtidos com concentrações econômicas de nitrato no meio de cultura, ou empregando-se baixas concentrações de uréia e amônio, a um custo ainda mais reduzido.

Palavras-chave: *Oscillatoria limnetica*. Biomassa. Cianobactéria.

INTRODUÇÃO

As cianobactérias representam uma das fontes alternativas de proteínas e sua utilização como complemento alimentar já foi ensaiada em condições experimentais e industriais.

A maior experiência disponível relaciona-se à *Spirulina maxima*, mas muitas investigações foram realizadas também com espécies do gênero *Oscillatoria* (5,9,10).

O gênero *Oscillatoria* ainda não é bem aproveitado em termos de suprimento alimentar, mesmo sabendo-se que contém alto teor protéico, em parte por apresentar teores de DNA/RNA extremamente elevados. Este gênero não possui um sabor atraente e algumas espécies, como a *Oscillatoria brevis* (4) excretam compostos de odor desagradável como a geosmina.

Características do gênero – As "Oscillatorias" são cianobactérias formadas apenas de células vegetativas que possuem tricomas livres, solitários, pluricelulares, retilíneos e com inflexões.

As necessidades nutritivas e a tolerância ao oxigênio permitem às cianobactérias desenvolverem-se nas camadas ricas de O₂ dos ambientes aquáticos, próximos à interface ar-água. Porém algumas cianobactérias crescem junto com as bactérias vermelhas e verdes em ambientes aquáticos ricos em H₂S. É o caso da *O. limnetica* que exibe tanto fotossíntese oxigênica quanto anoxigênica.

Uma das principais dificuldades para a ampla utilização destas fontes de biomassa diz respeito aos custos de produção elevados, devidos em parte à necessidade de consumo de fontes nitrogenadas dispendiosas.

Neste trabalho, definiram-se fontes experimen-

1. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Caixa Postal 30786 São Paulo, SP, Brasil

tais de nitrogênio visando a diminuição de custo de produção, e o estabelecimento de novas opções para a produção de biomassa a partir da *O. limnetica*.

MATERIAL E MÉTODOS

Estudou-se uma cepa de *O. limnetica* proveniente do "Centro di Studio dei Microorganismi Autotrofi" da Universidade de Florença, Itália.

A cepa foi ativada por repicagem em tubos contendo o meio de cultivo em ágar, mantidos por uma semana em estufas a 30°C e 3 Klux de intensidade luminosa e, em seguida, conservados a temperatura ambiente e luz do dia.

A composição do meio (6) básico utilizado é mostrada na Tabela 1, com exceção da fonte nitrogenada que variou com os experimentos. Os compostos nitrogenados e suas concentrações, usados nos experimentos são mostrados na Tabela 2.

O pH inicial do meio era 9,5 ± 0,2. Para crescimento em nitrato utilizava-se este pH e para meios contendo uréia ou amônio o pH era ajustado para 8,4 ± 0,2 com solução de ácido clorídrico diluído 1:3.

TABELA 1 - Composição do meio de cultura utilizado

	g/L	Solução de microelementos	mg/L
NaCl	0,92	SnCl ₂ · 2H ₂ O	304
Na ₂ SO ₄	1,88	MnCl ₂ · 4H ₂ O	173
K ₂ HPO ₄	0,50	CoCl ₂ · 6H ₂ O	194
Na ₂ CO ₃	8,89	SeCl ₂ · 2H ₂ O	146
Na ₂ HCO ₃	15,15	BaCl ₂ · 2H ₂ O	2846
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,05	LiCl	293
KNO ₃	2,57	CuSO ₄ · 6H ₂ O	186
MgSO ₄ · H ₂ O	0,25	NiSO ₄ · 6H ₂ O	717
		NaMoO ₄ · 2H ₂ O	121

Sol. de Fe - EDTA - 1ml

Sol. de microelementos - 1ml

TABELA 2 - Fontes de Nitrogênio e suas concentrações

Fontes de Nitrogênio	Concentrações (g/L)
KNO ₃	0,5 - 1,0 - 2,57 - 5,0 - 10,0
(NH ₂) ₂ CO	0,1 - 0,3 - 0,5 - 0,75 - 1,0
NH ₄ CL	0,1 - 0,2 - 0,3 - 0,5 - 0,8

Sol. de Fe - EDTA - 1ml

Sol. de microelementos - 1ml

Para a obtenção da concentração celular de inóculo desejada foram usados erlenmeyers de 500 ml com 40% do meio, agitados a 100 rpm, 30°C e 3,5 Klux.

Para a obtenção da biomassa usaram-se erlenmeyers de 500 ml com 160 ml de meio e 40 ml de inóculo. Este inóculo, preparado como descrito no parágrafo anterior, correspondia a uma massa de 50 mg/L.

Os erlenmeyers eram colocados em "shakers" por 10 dias com temperatura, agitação e intensidade luminosa iguais aos usados para o crescimento dos inóculos.

Valores de pH e biomassa foram determinados diariamente.

A concentração da biomassa era medida em espectrofotômetro Procyon SC 90 em comprimento de onda de 625 nm. O teor protéico total determinado no final do ensaio, foi medido pelo método de Kjeldahl (2,3) verificando-se o teor de nitrogênio total e convertendo-o em proteína por simples multiplicação fatorial.

RESULTADOS

KNO₃ como fonte nitrogenada - Na biomassa produzida no meio com KNO₃, o rendimento mais vantajoso consubstanciou-se naquele contendo 2,57 g/L, porém é conveniente assinalar que também com ofertas consideravelmente mais baixas (0,5 e 1,0 g/L), os resultados foram apenas ligeiramente afetados, com menos de 20% de diferença na biomassa.

Não houve fase lag de crescimento e em todas as concentrações a fase estacionária foi atingida no oitavo dia (Figura 1).

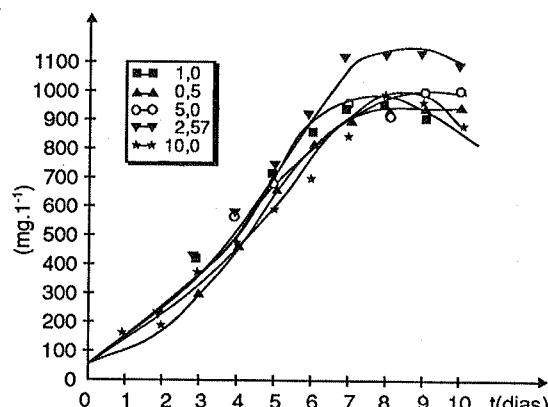


FIGURA 1 - Concentração de biomassa da *Oscillatoria limnetica* em função do tempo, para diferentes concentrações de KNO₃ (g/L).

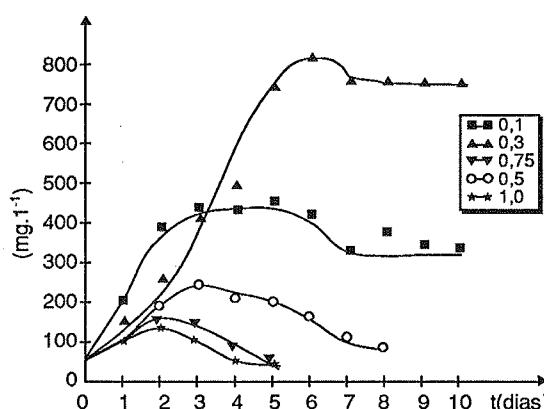


FIGURA 2 - Concentração de biomassa da *Oscillatoria limnetica* em função do tempo, para diferentes concentrações de uréia (g/L).

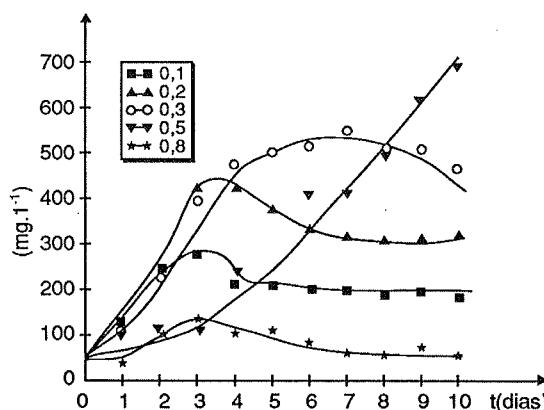


FIGURA 3 - Concentração de biomassa de *O. limnetica* em função do tempo para diferentes concentrações de NH_4Cl (g/L).

O pH do meio de cultura durante o ensaio praticamente não se alterou. Variou de 9,8 no início do experimento até 10,6, para todas as concentrações de KNO_3 utilizadas.

Uréia como fonte nitrogenada – Percebe-se uma resposta numericamente muito satisfatória com baixas concentrações de uréia.

A produção de biomassa em meio com 0,3 g/l foi o dobro da obtida em meios com 0,1 g/l. Não houve fase lag de crescimento, sendo que a fase estacionária foi atingida no sexto dia do experimento, com uma excelente concentração de biomassa (Figura 2).

No meio em que a concentração de uréia foi 0,1 g/l a fase estacionária se iniciou no segundo dia, prolongando-se por mais três dias, seguidos de declínio.

A variação de pH do meio de cultura contendo diferentes concentrações de uréia no crescimento da *O. limnetica* foi de 8,8 a 10,6, denotando uma elevação progressiva desta medida.

NH_4Cl como fonte de nitrogênio – Com a utilização de NH_4Cl no meio de crescimento observou-se que mesmo em altas concentrações deste sal, não houve despigmentação da cultuta podendo-se efetuar leituras no espectrofotômetro até o final do experimento.

A *O. limnetica* teve seu melhor desempenho na concentração de 0,5 g/L, na qual chegou ao final do ensaio sem atingir a fase estacionária. Nota-se também uma fase lag de crescimento. A segunda melhor produção de biomassa ficou com o nível de 0,3 g/L (Figura 3). O comportamento do pH já mencionado reproduziu-se nestes meios acidificados sem modificações importantes, e sem influência apreciável das concentrações de nutrientes.

Teor protéico da biomassa – O conteúdo protéico de *O. limnetica* foi maior nos meios com KNO_3 a 0,5 g/L e NH_4Cl a 0,5 g/L (Tabela 3).

TABELA 3 - Porcentagem proteica obtida nos vários ensaios

Fontes de N	Conc. (g/l)	% Proteínas	
		Totais	
KNO_3	0,5	78,5	
	1,0	70,2	
	2,57	63,8	
	5,0	46,4	
	10,0	30,3	
Uréia	0,1	64,8	
	0,3	79,8	
NH_4Cl	0,3	52,6	
	0,5	82,7	

DISCUSSÃO

O meio de cultura utilizado no crescimento da *O. limnetica* por outros autores (5,8) difere do nosso, embora valendo-se de nitrato de amônio como fonte principal de nitrogênio, e de constituintes minerais comparáveis aos do meio da Paoletti *et al* (6). Temos adotado para o crescimento da *O. limnetica* o mesmo meio recomendado para *Spirulina*, uma vez que estas cianobactérias crescem juntas em lagos naturais (9).

Após o carbono, e também deixando-se de lado o hidrogênio e o oxigênio, que podem ser obtidos da água, o nitrogênio é quantitativamente o elemento mais importante da matéria seca das células das algas.

Quando o nitrogênio é fornecido na forma oxidada de nitrato ele precisa primeiramente ser reduzido para ser incorporado em moléculas orgânicas.

Em meios contendo diferentes concentrações de KNO_3 a *O. limnetica* desenvolveu-se bem, registrando-se a sua maior produção de biomassa no meio contendo 2,57 g/L.

A segunda fonte de nitrogênio investigada a uréia, tem um custo bastante inferior ao do nitrato, além do que cada molécula de uréia fornece dois átomos de nitrogênio, enquanto cada molécula de KNO_3 apenas um.

A uréia normalmente precisa ser hidrolisada antes que seu nitrogênio possa ser incorporado às células das algas(1).

A *O. limnetica* teve seu melhor crescimento em meio contendo a uréia a 0,3 g/L. Com valores superiores a esta concentração de uréia no meio não obtivemos boa produção de biomassa, sugerindo um fenômeno de inibição.

A terceira fonte nitrogenada utilizada foi o cloreto de amônio, que pode ser eficientemente utilizado pela maioria das algas⁷.

Quando em proporções adequadas, o nitrogênio é rapidamente assimilado pela alga carente do mesmo, até quatro a cinco vezes mais rapidamente do que por células normais. Entretanto, a concentração de cloreto de amônio a 0,8 g/L foi inibitória ao crescimento do microorganismo, sendo que a melhor produção ficou com a concentração de 0,5 g/L.

Em alguns dos nossos ensaios não observamos a fase lag (indução) de crescimento, por iniciarmos o experimento com uma pequena quantidade de inóculo, mas onde os microorganismos já vinham crescendo em meio completo.

Note-se que os inóculos, que estavam sendo cultivados em meio de KNO_3 , não passaram por exaustão do nitrogênio acumulado antes de serem testados com nutrientes ou concentrações diferentes.

Todavia, não é provável que este fato tenha interferido significativamente na análise e interpretação das curvas de crescimento estudadas nesta investigação, exceto no que se refere à redução da fase lag em algumas culturas. Conforme já demonstrado todos os dados foram aqui examinados de forma comparativa, o que tende a anular variáveis comuns a todos eles. Outrossim, diante do pequeno inóculo utilizado e da rápida velocidade de crescimento obtida na maioria das curvas, o nitrogênio armazenado na fase pré-inoculação não poderia repercutir prolongadamente sobre o comportamento do microrganismo.

Uma análise dos valores de pH revela que graças aos tampões presentes no meio de cultura, as

oscilações desta variável foram sempre modestas, ao longo dos ensaios, nunca alcançando níveis superiores a 11,0, que poderiam ser tóxicos para a cultura.

A *O. limnetica* apresentou o seu maior conteúdo protéico, de valor 82,73%, em meio com cloreto de amônio a 0,5 g/L. Este valor excede um pouco as médias disponíveis na literatura, mas vem ao encontro das proporções alcançadas com outros meios, a saber o de uréia a 0,3 g/L (79,75%), e analogamente o de KNO_3 na concentração de 0,5 g/L (78,5%).

A análise dos resultados expostos permite as seguintes conclusões:

O desenvolvimento deste organismo em meios utilizando uréia teve sucesso na presença de até 0,3 g/L e com cloreto de amônio de 0,5 g/L, observando-se intolerância a estas fontes e inibição do crescimento com proporções mais elevadas.

Em todas as etapas analisadas a produção de biomassa mostrou-se mais expressiva no meio de KNO_3 a 2,57 g/L, mas com índices geralmente favoráveis, sobretudo nos primeiros dias do ensaio, para os meios à base de nitrato de potássio com 1,0 g/L, uréia com 0,1-0,3 g/l e amônio 0,3-0,5 g/L.

Observaram-se concentrações protéicas de *O. limnetica* na faixa de 30,3 – 82,7%. Os valores mais elevados de proteína associaram-se a culturas mais concentradas neste substrato, quando da introdução de uréia e amônio.

Como decorrência das considerações anteriores, ficou demonstrada a possibilidade de cultivo da *O. limnetica* em meios contendo fontes e concentrações nitrogenadas diversificadas e bastante econômicas, sem prejuízo do rendimento de biomassa e proteína desta cianobactéria.

ABSTRACT

Use of different nitrogen sources in the production of biomass of *Oscillatoria limnetica*

Analysis of the production of biomass and the total protein concentration obtained with the cyanobacteria *Oscillatoria limnetica* was undertaken, employing synthetic media and three different nitrogen sources. The selected substances were potassium nitrate, urea and ammonium chloride, in five concentrations for each nutrient. The best yield of biomass corresponded to the mixture containing 2.57 g/l of KNO_3 . Nevertheless, with a reduction of salt, to 1,0 g/L, almost as good results of biomass could be observed, as well as with urea and ammonium in low proportions. Protein con-

centrations were distributed in the range of 30.3-82.7%. It is concluded that satisfactory rates of biomass and protein can be reached with economical amounts of potassium nitrate, or with low concentrations of urea and ammonium salt, at more favorable cost.

Key Words: *Oscillatoria limnetica*. Biomass. Cyanobacteria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Allison, R.K.; Skipper, H.E.; Ried, M.R.; Short, W.A.; Hogan, G.L. - Studies on the photosynthetic reaction. II Sodium formate and urea feeding experiments with *Nostoc muscorum*. *Plant Physiol.* **29**: 154, 1954.
2. American Public Health Association - *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 14 ed. New York, APHA, AWWA, WPCF, 1975.
3. CETESB - *Normalização técnica*, São Paulo, Edição particular, 1978.
4. Naes, H.; Utkilen, H.C.; Post, A.F. - Geosmin production in the cyanobacterium *Oscillatoria brevis*. *Arch. Microbiol.* **151**: 407 - 410, 1989.
5. Oren, A & Padann, E. - Induction of anaerobic, photoautotrophic growth in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *J. Bacteriol.* **133** (2): 558-563, 1978.
6. Paoletti, C. Pushparaj, B.; Tomaselli, L. - Richerche sulla nutrizione minerale di *Spirulina platensis*. In: *Atti Congr. Naz. Soc. Ital. Microbiol.*, 17, Padova, 1975.
7. Syrett, P.J. - *Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences*. 1981.
8. Van Liere, L. & Mur, L.R. - Light-limited cultures of the blue-green alga *Oscillatoria agardhii*. *Mitt. Int. Ver. Theor. Amgew. Limnol.* **21**:158-167,1978.
9. Van Rijn, J. & Shilo, M. - Nitrogen limitation in natural populations of cyanobacteria (*Spirulina* and *Oscillatoria* spp) and its effect on macromolecular synthesis. *Applied and Environmental Microbiology* **52**(2): 340-344, 1986.
10. Yanagimoto, M. & Saiyoh, H. Evaluation tests of a large spiral blue green alga, *Oscillatoria* sp, for biomass production. *J. Ferment Technol.* **60**(4) 305-310, 1982.
11. Zarrouk, Contribution à l'Etude d'une Cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima*. Thesis, University of Paris, France, 1966.

Recebido para publicação em 11/10/90

PARTIAL CHARACTERIZATION OF A BROWN PIGMENT PRODUCED BY *AZOSPIRILLUM LIPOFERUM*

Rosa G. B. Oliveira
Mario L. de Souza

SUMMARY

Nineteen strains of *Azospirillum lipoferum* and forty one of *Azospirillum brasiliense* were examined for pigment production in three supplemented media with L-tyrosine. Two strains of *A. lipoferum* synthesized the pigment in tyrosine supplemented liquid NFb medium. A strong brown pigmentation was only produced by *A. lipoferum* USA5a. This strain was used as a brown pigment producer in this study. When L-tyrosine was replaced by 21 aminoacids and D-L malic acid by other carbon sources, it was found that the pigment was produced with L and D-L tryptophan and sodium lactate in the same intensity as that of non-modified medium. Iron was an essential element for pigmentation.

The brown color suggests that the pigment could be melanin. Although positive results have been obtained in some tests for melanin characterization, this pigment is clearly distinguished from melanin by the absorption spectrum. In addition, no tyrosinase activity was found in the crude extracts of the cells examined with L-tyrosine and L-DOPA. This brown pigment seems to be related to the catabolism of tyrosine.

Key Words: Tyrosine, bacterial pigment, *Azospirillum lipoferum*.

INTRODUCTION

The melanins are a group of black or brown or even yellow pigments of biological origin that occur in animals, plants, fungi and bacteria (14). They may be classified according to the substrate used for pigment synthesis (14). For example, the eumelanins are synthesized from tyrosine (14).

Tyrosinase (E.C.1.14.18.1) is a copper containing enzyme which catalyses the first reactions of the melanin production. Tyrosine is first ortho-hydroxylated to L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), then L-DOPA is oxidized to dopaquinone, which undergoes further nonenzymatic oxi-

dation and polymerization, yielding melanin (9,11,14).

Among soil bacteria, melanin formation has been observed in species of the genera *Streptomyces* (1), *Rhizobium* (4), *Azospirillum* (10) and *Azotobacter* (12). However, black or brown pigments produced from tyrosine, other than melanins, have also been described in *Pseudomonas aeruginosa* (16), *Bacillus subtilis* (2), *Morganella-Providencia* group (8) and *Serratia marcescens* (15).

Azospirillum spp are nitrogen-fixing microorganisms that occur free living in the soil or associated with the roots of cereal crops, grasses and

1. Instituto de Microbiologia – Universidade Federal do Rio de Janeiro – Centro de Ciências da Saúde – Bloco I, Ilha do Fundão – CEP 21941 – Rio de Janeiro – Brasil

tuber plants (6). There are a few pigmentation reports in this genus (6,10). The objective of this paper is to describe the ability of *A. lipoferum* USA5a to produce a brown pigment from tyrosine.

MATERIAL AND METHODS

Microorganisms – *Azospirillum lipoferum* USA5a, isolated from soil under grasses, Snake River USA, was used as a pigment producer. Eighteen strains of *A. lipoferum* and forty one of *A. brasiliense* were also used in the screening of microorganisms for pigment production. Cultures were maintained in semisolid potato-malate-saccharose (BMS) medium containing 0.05% yeast extract (6).

Culture media – Liquid nitrogen-free malate (NFb) medium was used as the basic medium for pigment production. The composition of this medium (g/liter) was the following: D-L malic acid, 5.0; K₂HPO₄, 0.5; MgSO₄ · 7H₂O, 0.2; NaCl, 0.1; CaCl₂, 0.02; trace element solution (Na₂MoO₄ · 2H₂O, 0.2g; MnSO₄ · H₂O, 0.235g; H₃BO₃, 0.28g; CuSO₄ · 5H₂O, 0.008g; ZnSO₄ · 7H₂O, 0.024g; distilled water, 1000 ml) 2ml; Fe EDTA (1.64% solution), 4ml; vitamin solution (biotin, 0.01 g; pyridoxin, 0.02 g; distilled water, 100 ml), 1 ml; KOH, 4.0; pH adjusted to 7.0 with KOH. For a semisolid medium add 1.75 g agar/liter; for a solid medium add 15.0 g agar/liter (6).

Screening of microorganisms for pigment production from tyrosine – Bacteria were grown in tryptic soy broth, peptonesuccinic acid (MPSS) broth (6) and liquid NFb medium containing L-tyrosine (600 µg/ml) for pigment production (4,15). Flasks with 20 ml of each medium were inoculated with 0.2 ml of a 24 hour culture grown in semisolid BMS medium. Cultures were inoculated in two batches, one was incubated stationary and the other was continuously shaken at 140 rpm in a gyratory shaker (New Brunswick Scientific Co., Inc.), at 32°C.

Bacterial growth and pigment production were evaluated visually after 6 days of incubation. Alternatively, cells were removed by centrifugation and the pigment production was measured in the supernatant fraction (OD₄₃₀) (2).

Influence of medium composition on pigment production – The composition of the liquid

NFb medium containing L-tyrosine (600 µg/ml) was modified for studying the influence of medium components on pigment production.

D-L malic acid was replaced by other carbon sources. The influence of 21 proteic aminoacids in place of tyrosine was also examined. L-alanine, L-valine, L-leucine, L-isoleucine, L-proline, L-phenylalanine, L-methionine, glycine, L-serine, D-L treonine, L-cysteine, L-asparagine, L-glutamine, L-aspartic acid, L-glutamic acid, L-lysine, L-arginine, L-histidine, D-L-ethionine, L and DL tryptophan were used. Fe EDTA was replaced by other Fe sources. The concentrations of these examined compounds were similar to those of the replaced substances.

CuSO₄ · 5H₂O was added at various concentrations (from 0 to 10 µM). The influence of 0.08% NH₄Cl and Mn²⁺ was also examined. The effect of initial pH was studied from pH 6 to 9.

Flasks with the modified medium were inoculated and then incubated with shaking for six days at 32°C.

The semisolid and solid NFb medium supplemented with L-tyrosine were also examined.

Partial characterization of the brown pigment – *A. lipoferum* USA5a was grown in liquid NFb medium with L-tyrosine (600 µg/ml) for one week, with shaking. Then, the culture was harvested by centrifugation at 18000 g for 15 min, and the supernatant was used as a source of pigment. The supernatant was acidified to pH 1.5 with 6N HCl and allowed to stand overnight. The precipitated pigment was recovered by centrifugation (18000 g for 15 min), then was dissolved in water and lyophilized.

The solubility of the lyophilized pigment in water, 0.5N NaOH, 0.5N HCl, ethanol and methanol was examined. Flocculation of the pigment solubilized in 0.5N NaOH by 0.5 mM Fe Cl₃ · 6H₂O and decoloration by 5% H₂O₂ were also investigated (2, 5, 7). The melanin precipitation test of Blackbeerg and Wanger was also used (3).

The absorption spectrum of the brown pigment soluble in 0.5N NaOH was done with a Spectronic 1201 spectrophotometer on a range of wavelengths from 200 to 800 nm.

Enzyme activity – *A. lipoferum* USA5a was grown in liquid NFb medium with 0.08% NH₄Cl and in liquid NFb medium without Fe EDTA, but supplemented with L-tyrosine, at 32°C, for 24 h with shaking. The cell lysates were prepared by sonication as described by Kelley *et al.* (5).

The assay using L-tyrosine as the substrate was done by the method of Kelley *et al.* (5). The cell lysate (500 µl) was incubated at 32°C and 42°C with L-tyrosine, 4 mM in 10 mM phosphate buffer, pH 6.4, in a total volume of 1 ml. Melanin formation was determined visually after 60 min of incubation.

The assay for tyrosinase activity using 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine as the substrate was done by the method of Yoshimoto *et al.* (17). The cell lysate (500 µl) was incubated at 32°C with 1.5 ml of 4 mM L-DOPA in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 6.8. The conversion of L-DOPA to dopachrome was followed by monitoring the increase of absorbance at 475 nm after 60 min of incubation (9).

Hydrazone formation test – For the realization of this test, *A. lipoferum* USA5a was cultivated in 200 ml liquid NFB medium with 0.08% NH₄Cl and in liquid NFB medium without FeEDTA, but supplemented with L-tyrosine. After 24 hours of incubation, with shaking, the cells were removed by centrifugation (18000 g for 20 min.), then they were washed twice in saline and subsequently resuspended in a final volume of 10 ml saline. To this suspension, 10 ml of 0.2% tyrosine were added, and the mixture was incubated for 120 min at 32°C. Then, the p-hydroxyphenylpiruvic acid formed from the tyrosine was determined by hydrazone formation test (13).

RESULTS

Screening of microorganisms for pigment production from tyrosine – Nineteen strains of *A. lipoferum* and forty one of *A. brasiliense* were examined for pigment production in three media supplemented with L-tyrosine. Twelve strains of *A. lipoferum* synthesized the pigment in tyrosine supplemented liquid NFB medium. The intensity of the pigmentation in this medium ranged from weak yellow to strong brown pigmentation. Shaking cultures were more pigmented than cultures maintained under static conditions. *A. lipoferum* USA5a was the only strain that produced a strong brown pigmentation in this medium.

No pigment was produced, after 6 days of incubation, in tryptic soy broth and MPSS broth.

Culture condition for pigmentation – *A. lipoferum* USA5a, in liquid NFB medium with L-tyrosine, produced the brown pigment in the first hours of growth (the pigment measured in the su-

pernatant fraction of an 18 h culture had an optical density of 0.26 at 430 nm) and pigmentation reached the maximum in a three days culture (OD₄₃₀ of 2.26).

When D-L malic acid was replaced by sodium acetate, sodium lactate and succinic acid, pigment production also occurred. However, no pigment was produced when the strain grew with citric acid, fumaric acid, pyruvic acid, D-fructose and D-glucose (Table 1).

Among the aminoacids examined, L-and D-L-tryptophan were able to induce brown pigment production (Table 1).

It was observed that the addition of NH₄Cl to the medium reduced the pigment synthesis. However, iron was an essential element for pigmentation. No pigmentation was observed in the medium without iron. The best source of this element was Fe EDTA, the other sources examined did not produce pigmentation as the one presented by Fe

TABLE 1 – Influence of the medium composition on pigment synthesis by *A. lipoferum* USA 5a.

- a – Medium components examined
- b – Pigment production was evaluated visually and was scored semi-quantitatively from - (no visible pigment) to ++ (maximum pigment observed). Flasks were observed after incubation for 6 days at 32°C in a shaker.

Medium composition ^a	Amount of pigment formed ^b
1. Liquid NFB medium + L-tyrosine	++
2. Liquid NFB medium + L-tyrosine + NH ₄ CL	+
3. Malate replaced by:	
sodium acetate	±
sodium lactate	++
citric acid	-
fumaric acid	-
succinic acid	+
pyruvic acid	-
D-fructose	-
D-glucose	-
4. L-tyrosine replaced by:	
L and D-L tryptofan	++
The other aminoacids	-
5. Fe EDTA replaced by:	
ferric chloride	±
ferric ammonium citrate	±
ferrous ammonium sulphate	±
ferrous sulphate	±
6. Liquid NFB medium + L-tyrosine without Cu ²⁺	++
7. Liquid NFB medium + L-tyrosine without Mn ²⁺	++
8. Liquid NFB medium + L-tyrosine without Fe EDTA	-

EDTA. The elements Cu²⁺ and Mn²⁺ were not essential, *A. lipoferum* USA5a synthesized the pigment in the medium without them (Table 1).

The initial pH of the medium was not an important factor, the pigment production was observed with initial pH of 6, 7, 8 and 9. In the medium with initial pH 7 was observed, after 6 days of incubation, alkalization to pH 9.3.

Neither semisolid NFB medium nor solid NFB medium supplemented with L-tyrosine induced the pigment production.

Partial characterization of the brown pigment — Figure 1 shows the absorption spectrum of the brown pigment in 0.5N, produced by *A. lipoferum* USA5a.

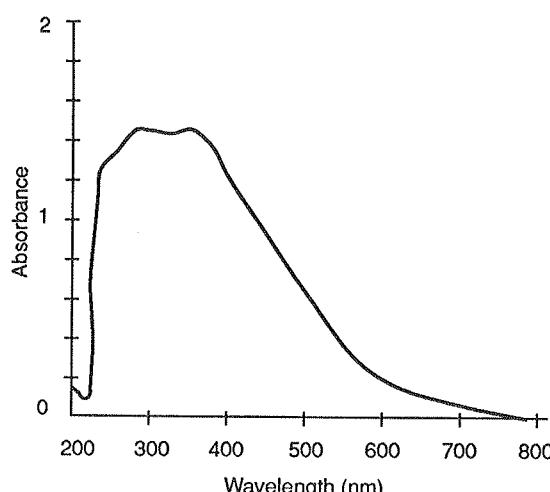


FIGURA 1 — Absorption spectrum of the brown pigment from the *Azospirillum lipoferum* USA5a in 0.5N NaOH

This pigment was easily dissolved in water after the precipitation with 6N HCl, but the lyophilized powder obtained did not dissolve either in water or in organic solvents (ethanol and methanol) or in 0.5 HCl. The pigment was soluble in 0.5N NaOH. Flocculation by FeCl₃ 6H₂O and H₂O₂ decoloration were positive, but the precipitation test with Blackberg-Wanger reagent was negative.

Enzyme activity — No tyrosinase activity was found in the crude extracts of *A. lipoferum* USA5a grown without tyrosine in liquid NFB medium supplemented with NH₄Cl when tyrosine and L-DOPA were used as a substrate.

However, some increase of absorbance at 475 nm could be detected in the assay mixture when L-DOPA was used as a substrate with the crude

extract of *A. lipoferum* USA5a grown in liquid NFB medium supplemented with tyrosine and in the absence of Fe EDTA. But, the same result was obtained when one strain, which is not a pigment producer, *A. brasiliense* 6V, was examined by this procedure.

Hydrazone formation test — In order to correlate the brown pigmentation with the tyrosine catabolism, the presence of the corresponding keto acid (p-hydroxyphenyl pyruvic acid) from the tyrosine by oxidative deamination was researched in *A. lipoferum* USA5a cultures by hydrazone formation test. Positive results were obtained.

DISCUSSION

The formation of granular brown-black melanin pigment by *A. brasiliense* ATCC 29145 in aging cultures has been reported by Sadasivan and Neyra (10). This strain did not produce the pigment in liquid culture, but readily produced it in a semisolid nitrogen free medium and more slowly on certain solid media (10). In this work we are describing a brown pigment produced by *A. lipoferum* USA5a in liquid NFB medium that has different characteristics from those presented by *A. brasiliense* pigment.

This pigmentation occurs when L-tyrosine is added to the liquid NFB medium. The brown color suggests that the pigment could be melanin. However, some results obtained have not corroborated this hypothesis. First, copper, a component of tyrosinase, was not needed to produce the pigment. Then, various tests for melanin characterization were used with the brown pigment produced from tyrosine by *A. lipoferum* USA5a. Although positive results have been obtained by some tests, this pigment is clearly distinguished from melanin by its solubility in water after precipitation with 6N HCl, the non precipitation with the Blackberg-Wanger reagent and the presence of two peaks in absorption spectra. It is known that neither hot nor cold distilled water extracts any color from melanin, and this substance in solution gives an absorption curve without characteristic peaks (7). In addition, non significant tyrosinase activity was found in the crude extracts of cells, examined with L-tyrosine and L-DOPA. Thus, this brown pigment produced by *A. lipoferum* USA5a should not be classified as melanin as the latter are normally defined.

The results presented here show that *A. lipo-*

erum USA5a contains an enzyme which catalyses the oxidative deamination of L-tyrosine to its corresponding α . keto acid, the first step of tyrosine catabolism. The brown pigment seems to be related to the intermediates of tyrosine catabolism as it was found in *Serratia marcescens* (15) and in *Morganella-Proteus-Providencia* group (8). The nature of this pigment is still unknown.

RESUMO

Caracterização parcial de um pigmento produzido por *Azospirillum lipoferum*

Dezenove cepas de *Azospirillum lipoferum* e quarenta e uma de *Azospirillum brasiliense* foram examinadas para a produção de pigmento em três meios suplementados com L-tyrosina. Doze cepas de *A. lipoferum* apresentaram essa capacidade no meio NFB líquido enriquecido com L-tyrosina. Uma pigmentação marrom intensa foi produzida apenas por *A. lipoferum* USA5a. Esta cepa foi utilizada como a produtora do pigmento marrom neste estudo.

Quando L-tyrosina foi substituída por 21 aminoácidos e D-L ácido mágico por outras fontes de carbono, verificou-se que o pigmento foi também intensamente produzido com L e DL triptofano e lactato de sódio. A presença de ferro foi essencial para a ocorrência da pigmentação.

A cor marrom apresentada pelo pigmento sugere tratar-se de melanina. Embora tenha se comportado como esta substância em alguns testes de caracterização de melanina, o pigmento produzido por *A. lipoferum* USA5a apresenta características distintas. Além disso, nenhuma atividade da tirosinase foi encontrada nos extratos de células examinados com L-tyrosina e L-DOPA. Este pigmento marrom parece estar relacionado com o catabolismo da tirosina.

Palavras-chave: tirosina, pigmento bacteriano, *Azospirillum lipoferum*.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thanks Professor Adam Drozdowicz for useful suggestions during the course of this investigation and Dra. Johanna Dobereiner for providing strain *A. lipoferum* USA5a. This work was supported by FINEP (Project 4.3.89.0631.02).

REFERENCES

1. Arai, T. & Mikami, Y. – Chromogenicity of *Streptomyces*. *Appl. Microbiol.* 23:402-406, 1972.
2. Barnett, T. A. & Hageman, J. H. – Characterization of a brown pigment from *Bacillus subtilis* cultures. *Can. J. Microbiol.* 29:309-315, 1983.
3. Blackberg, S. N. & Wanger, J. – Melanuria. *J. A. M. A.* 100:334-335, 1933.
4. Cubo, M. T., Buendia-Claveria, A. M., Beringer, J. E. & Ruiz-Sanz, J. E. – Melanin production by *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1812-1817, 1988.
5. Kelley, S. K., Coyne, V. E., Sledjeski, D. D., Fuqua, W. C. & Weiner, R. M. – Identification of tyrosinase from a periphytic marine bacterium. *FEMS Microbiol. Lett.* 67:275-280, 1990.
6. Krieg, M. & Dobereiner, J. – Genus *Azospirillum*. In: Krieg, M. R. and Holt, J. G., eds. – Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1984.
7. Lingappa, Y., Sussman, A. S. & Bernstein, I. A. – Effect of light and media upon growth and melanin formation in *Aureobasidium pullulans* (De By) Ann (*Pullularia pullulans*). *Mycopathol. Mycol. Appl.* 20:109-128, 1963.
8. Muller, H. E. – Production of brownish pigment by the *Morganella-Proteus Providencia* group. *Zbl. Bakt. Hyg. A260*:428-435, 1985.
9. Pomerantz, S. H. & Murthy, V. V. – Purification and properties of tyrosinases from *Vibrio tyrosinaticus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 160:73-82, 1974.
10. Sadashivan, L. & Neyra, C. A. – Cyst production and brown pigment formation in aging cultures of *Azospirillum brasiliense* ATCC 29145. *J. Bacteriol.* 169:1670-1677, 1987.
11. Sariaslani, F. S. – Microbial enzymes for oxidation of organic molecules. *Crit. Rev. Biotechnol.* 9:171-256, 1989.
12. Shrivprasad, S. & Page, W. – Catechol formation and melanization by Na^+ dependent *Azotobacter chroococcum*: a protective mechanism for aeroadaptation. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1811-1817, 1989.
13. Singer, J. & Volcani, B. E. – An improved ferric chloride test for differentiating *Proteus - Providence* group from other Enterobacteriaceae. *J. Bacteriol.* 69:303-306, 1955.
14. Swam, G. A. – Structure, chemistry and biosynthesis of the melanins. In: Herz, W., Grisebach, H. & Kirley, G. W., eds. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. New York, Springer Verlag 1974. vol. 31. p. 521-582.
15. Trias, J., Viñas, M., Guinea, J. & Loren, J. G. – Brown pigmentation in *Serratia marcescens* cultures associated with tyrosine metabolism. *Can. J. Microbiol.* 35: 1037-1042, 1989.
16. Yabuuchi, E. & Ohyama, A. – Characterization of "pyomelanin" – producing strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 22: 53-64, 1972.
17. Yoshimoto, T., Yamamoto, K. & Tsuru, D. – Extracellular tyrosinase from *Streptomyces* sp-KY-453: purification and some enzymatic properties. *J. Biochem.* 97:1747-1754, 1985.

Received for publication in 01/02/91

EFEITO DE DIFERENTES NÍVEIS DE FÓSFORO SOBRE A ATIVIDADE DE FOSFATASES ÁCIDAS E A COMPOSIÇÃO MINERAL DE ALGUNS FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS

Sérgio Pacheco¹

José Cambraia¹

Maria C. M. Kasuya¹

RESUMO

A atividade de fosfatases ácidas nos fungos ectomicorrízicos *Rhizopogon reaii*, *Suillus sp.*, *Pisolithus tinctorius* 185, *Pisolithus tinctorius* 298 e *Paxillus involutus* aumentou com a diminuição dos níveis de P no meio de cultivo. Em *Rhizopogon nigrescens* não se observou variação significativa na atividade desta enzima. A maior atividade fosfatásica foi encontrada no fungo *P. involutus*, a qual foi cerca de 16 vezes maior do que em *P. tinctorius* 185. A relação entre a atividade na ausência de P e na presença de 128 µM deste elemento (P_0/P_{128}) variou de 1,5 a 110 nos fungos *R. nigrescens* e *P. involutus*, respectivamente. Em *P. tinctorius*, a produção de matéria seca e os teores de P e de Ca aumentaram enquanto os de N não se modificaram com o aumento dos níveis de P no meio de cultivo. Observou-se uma elevada correlação entre os teores miceliais de P e de Ca com a produção de matéria seca, mas não com a atividade das fosfatases. Na ausência de P, o teor de Mg aumentou significativamente em relação àqueles em que o P estava presente, os quais não diferiram entre si. Além disso, o Mg apresentou alta correlação com a atividade fosfatásica, sugerindo um envolvimento de síntese protéica no processo de indução enzimática pela deficiência de P.

Palavras-chave: Fosfatases ácidas, fungos ectomicorrízicos, composição mineral.

INTRODUÇÃO

O P da solução do solo, além de estar em geral em níveis muitos baixos, apresenta uma parte significativa em forma orgânica não disponível para as plantas, especialmente em solos sob florestas (6, 11). O aproveitamento desse P orgânico pelas plantas parece ser dependente da atividade de fosfatases ácidas presentes na superfície celular de raízes ou de fungos ectomicorrízicos com elas associados (6, 10, 17).

A capacidade de fungos micorrízicos produzem fosfatases ácidas tem sido demonstrada em diversos estudos (11, 12). Estas enzimas, produzidas

principalmente sob condições de deficiência de P, parecem ser bastante importantes para aquisição deste elemento tanto pelos fungos quanto pelas plantas com eles simbioticamente associados (10, 12, 13).

A atividade destas enzimas é bastante variável entre os fungos endo- e ectomicorrízicos (13). Isto se deve ao fato delas existirem em diferentes formas (3, 8) e de serem influenciadas por diversos fatores do meio ambiente tais como: pH, temperatura, tipo e concentração do substrato e, principalmente, pelos níveis de P do meio (2, 4, 5, 7, 8).

Contudo, apesar dos diversos trabalhos já feitos nesta área na tentativa de elucidar os fatores

1. Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, 36.570 — Viçosa, MG.

que controlam a atividade destas enzimas, muitos pontos permanecem ainda obscuros especialmente com relação aos fungos que estão sendo utilizados em associações micorrízicas no Brasil.

Assim, este trabalho teve como objetivo estudar o efeito de diferentes níveis de P no meio de cultivo sobre a atividade de fosfatases ácidas, a composição mineral e a produção de matéria seca em seis fungos ectomicorrízicos comumente encontrados ou utilizados para estabelecer associações micorrízicas com plantas dos gêneros *Pinus* e/ou *Eucalyptus*, no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção da massa fúngica – Os fungos *Rhizopogon nigrescens*, *Rhizopogon reaii*, *Suillus sp*, *Pisolithus tinctorius* 185, *Pisolithus tinctorius* 298 e *Paxillus involutus* foram cultivados em solução nutritiva de CLARK, pH 5,4 (10), com um quinto da força iônica original, com as seguintes concentrações de fósforo: 0, 4, 8, 16, 32, 64 e 128 µM, em 3 repetições. Após 30 dias de crescimento no escuro, sob temperatura de 27 ± 1°C e agitação manual, os micélios produzidos foram removidos do meio nutritivo, lavados com água desmineralizada e utilizados para as diversas análises.

Determinação da atividade de fosfatases ácidas – Os micélios, após lavagem em água desmineralizada, foram transferidos para frascos Erlenmeyer contendo 4 ml de tampão universal pH 5,0, modificado por ANTIBUS *et alii* (2). Após incubação por uma hora, em banho-maria a 30°C,

usando p-nitrofenilfosfato de sódio como substrato, a reação foi paralisada pela adição de 4 ml de NaOH 0,5M e o p-nitrofenol produzido foi determinado pela leitura da absorbância a 410 nm (2). A atividade enzimática avaliada, expressa em unidades internacionais (UI) por grama de matéria seca, representa atividade superficial facilmente acessível ao substrato (2, 8).

Determinação dos elementos minerais e da matéria seca – O N total foi determinado por meio da reação do íon amônio com fenol alcalino, após digestão sulfossilicílica das amostras para redução nitrato e do N orgânico a íon amônio (9). O P foi determinado pelo método de LINDEMAN (15) e o Ca e o Mg por espectrofotometria de absorção atômica, após mineralização das amostras com uma mistura nítrico-perclórica (1).

A matéria seca micelial foi determinada gravimetricamente após secagem a 105°C até obtenção de peso constante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade de fosfatases ácidas superficiais ou extracelulares aumentou com decréscimo da concentração de fósforo no meio cultivo, para todos os fungos estudados, exceto para *R. nigrescens* (Tabela 1). A atividade fosfatásica neste fungo, além de ter sido a mais baixa dentre todos os fungos estudados, não se modificou significativamente em nenhum dos níveis de P do meio de cultivo. A maior atividade fosfatásica foi encontrada no fungo *P. involutus* a qual, na ausência de P, foi

TABELA 1 - Efeito de diferentes níveis de P sobre a atividade de fosfatases ácidas em seis fungos ectomicorrízicos.

Níveis de P µM	Fungos Ectomicorrízicos						
	F ₁ ¹	F ₂	F ₃	UI . g ⁻¹	F ₄	F ₅	F ₆
0	14,1aD ²	41,8aC	45,1aC	84,3aB	49,3aC	1347,0aA	
4	13,2aB	22,2bB	18,5bB	27,0bB	40,6bB	954,5bA	
8	11,3aB	9,8cB	11,8cB	14,8bB	14,7cB	296,3cA	
16	9,6aB	6,1dB	8,1dB	7,7bB	6,0dB	87,4dA	
32	10,4aB	5,7dB	6,9dB	16,9bA	5,8dB	7,9dC	
64	9,7aB	5,6dB	6,2dB	20,5bA	6,6dB	7,7dB	
128	9,6aA	4,1dB	4,8dB	11,2bA	5,3dB	12,3dA	

1. F₁ = *Rhizopogon nigrescens*; F₂ = *Rhizopogon reaii*; F₃ = *Suillus sp*; F₄ = *Pisolithus tinctorius* 185; F₅ = *Pisolithus tinctorius* 298; F₆ = *Paxillus involutus*.

2. Médias seguidas da mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott(16).

TABELA 2 - Efeito de diferentes níveis de P sobre a de matéria seca e os teores de P, N, Mg e Ca em *P. tinctorius* 185.

Níveis de P μM	Matéria Seca mg	P mg . g ⁻¹ MS	N	Mg	Ca
0	5,6g ¹	0,39d	57,02a	2,65a	1,67c
4	12,6f	0,42d	56,15a	1,03b	1,91c
8	20,0e	0,91d	61,48a	0,89b	1,46c
16	25,1d	1,50c	63,92a	0,84b	1,84c
32	32,0C	1,49c	71,58a	0,90b	3,18b
64	53,3b	3,64b	58,58a	1,13b	6,09a
128	56,8a	6,88a	57,84a	1,37b	5,84a

1. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott (16).

TABELA 3 - Coeficientes de correlação de Pearson entre matéria seca micelial, teores de P, de Mg e de Ca e atividade de fosfatases ácidas em *P. tinctorius* 185.

Variáveis	P	Mg	Ca	Passe ¹
Matéria Seca	0,88	-0,29	0,89	-0,54
P		0,06	0,81	-0,38
Mg			-0,04	0,89
Ca				-0,27

1. Fosfatases ácidas.

cerca de 16 vezes maior do que no segundo fungo melhor colocado, que foi o *P. tinctorius* 185. A relação entre a atividade na ausência de P e no nível de 128 μM de P (P_0/P_{128}) variou de 1,5 até 110 vezes nos fungos *R. nigrescens* e *P. involutus*, respectivamente, evidenciando ainda mais as diferenças entre as espécies estudadas. A atividade fosfatásica de *P. tinctorius* 185 foi, de modo geral, superior à dos demais fungos na faixa de concentração de P de 32 a 128 μM. Resultados como estes têm sido obtidos por outros autores com alguns dos fungos usados aqui e com outras espécies (4, 5, 12, 13). O aumento na atividade destas enzimas tem sido atribuído a um aumento na síntese de novo (7), ou a uma desrepressão de moléculas pré-existentes (3), induzida por deficiência de P no meio nutritivo. Qualquer que seja a explicação, há a indicação de que as fosfatases podem ser importantes na absorção de P em situações em que sua disponibilidade no solo é limitada, especialmente em certos solos de florestas (4).

Em *P. tinctorius* 185, a produção de matéria seca e os teores de P e de Ca da massa micelial aumentaram significativamente com os níveis de P no

TABELA 4 - Desdobramento da correlação entre produção de matéria seca micelial e os teores de P, de Mg e de Ca e atividade de fosfatases ácidas em *P. tinctorius*¹.

Variáveis	P	Mg	Ca	Passe ²	MS
P	0,38	0,01	0,43	0,06	0,88
Mg	-0,02	-0,11	-0,02	-0,14	-0,29
Ca	0,31	0,00	0,53	0,04	0,89
Passe	-0,14	-0,10	-0,15	-0,15	-0,54

1. Efeitos diretos na diagonal e indiretos fora da diagonal

2. Fosfatases ácidas

meio de cultivo (Tabela 2). Os teores miceliais de P e de Ca, em relação aos encontrados em fungos mantidos em meio livre de P, aumentaram apenas quando as concentrações de P no meio atingiram 8 e 16 μM, respectivamente. Os teores destes dois elementos apresentaram alta correlação com a produção de matéria seca ($r = 0,88$ e $0,89$, respectivamente) (Tabela 3) e, conforme mostrou a análise de trilha destas correlações (14), os dois elementos tiveram efeito direto sobre a produção de matéria seca micelial. (Tabela 4). A análise de trilha indica, ainda, que tanto P quanto o Ca têm efeitos indiretos bastante importantes, isto é, um é importante para a aquisição do outro e ambos afetam a produção de matéria seca. Esta interação não foi aqui abordada mas merece ser melhor analisada em estudos subsequentes. O elevado coeficiente de determinação (92,7%) sugere que, em conjunto, as variáveis estudadas podem ter influência significativa sobre a produção de matéria micelial.

Os teores de Mg e de N não se modificaram com o aumento dos níveis de P, exceto que na ausência de P o teor de Mg foi significativamente superior àqueles em que P estava presente. O teor de Mg no fungo não se correlacionou significativamente com os dos demais elementos minerais ou com a produção de matéria seca, mas sim com a atividade da fosfatase ácida ($r = 0,89$). Em razão da importância do Mg para a atividade ribossomal, suspeita-se que o aumento da atividade fosfatásica esteja relacionado com a síntese de novas moléculas da enzima.

SUMMARY

Effect of different levels of P on acid phosphatase activity and mineral composition of some ectomycorrhizal fungi.

Acid phosphatase activity of six ectomycor-

rhizal fungi increased with decreasing P level in the culture medium, except in *Rhizopogon nigrescens*. The highest activity was found in *Paxillus involutus*, and this activity was about 16 times higher than that of *Pisolithus tinctorius* 185. The P_{128}/P ratio varied from 1.5 to 110 in *R. nigrescens* and *P. involutus*, respectively. Mycelial dry weight yield and P and Ca content but not N content increased with P level in *P. tinctorius* 185. Mg content was lower when P was present but did not change with increasing P in the culture medium. There was a high correlation between Mg and phosphatase activity suggesting an involvement of protein synthesis on enzyme induction by P starvation.

Key Words: Acid phosphatase, ectomycorrhizal fungi.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro do CNPq. Os autores agradecem ainda ao CNPq a distinção conferida pela concessão de bolsas de Pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Allan, J. E. — *The preparation of agricultural samples for analysis by atomic absorption spectroscopy*. Varian Techtron, 1969. 15p. (Bull. 12/69).
2. Antibus, R. K.; Kroehler, C. L. & Linkins, A. E. — The effects of the external pH, temperature, and substrate concentration on acid phosphatase activity of ectomycorrhizal fungi. *Can. J. Bot.*, 64: 2383-2387. 1986.
3. Berjaud, C. & d'Auzac, J. — Isolement et caractérisation des phosphatases d'un champignon. Effets de la carence en phosphate. *Physiol. Vég.*, 24: 263-172. 1986.
4. Berjaud, C.; Doumas, P.; Coupé, M. & d'Auzac, J. — Properties of soluble acid phosphatases in an ectomycorrhizal fungus and in host plants subjected or not to Pi starvation. *Agronomie*, 7: 95-99. 1987.
5. Bousquet, N.; Mousain, D. & Salsac, L. Influence de l'orthophosphate sur les activités de *Suillus granulatus* en culture *in vitro*. *Physiol. Vég.*, 24: 153-162. 1986.
6. Bielecki, R. L. — Phosphate pools, phosphate transport and phosphate availability. *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, 24: 225-252. 1973.
7. Calleja, M. & d'Auzac, J. — Carence phosphates et phosphatases: comparaison de champignons mycorhizes et saprophytes. In: *Les Mycorhizes Biologie et Utilisation*. Colloque de l'INRA, INRA, Paris, 13: 107-112. 1982.
8. Calleja, M. & d'Auzac, J. — Activités phosphatases et carence phosphatée chez des champignons supérieurs. *Can. J. Bot.*, 61: 79-86. 1983.
9. Cataldo, D. A.; Schrader, L. E. & Youngs, V. L. — Analysis by digestion and colorimetric assay of total nitrogen in plant tissues high in nitrate. *Crop. Sci.*, 14: 854-856. 1974.
10. Clark, R. B. — Characterization of phosphatase on intact maize roots. *J. Agric. Food Chem.*, 23: 458-460. 1975.
11. Cosgrove, D. J. — Metabolism of organic phosphates in soil. In: McLaren, A. D. & Peterson, G. H. (eds), *Soil Biochemistry*. N. York, Marcell Dekker. 1967. p. 216-228.
12. Dighton, J. — Phosphatase production by mycorrhizal fungi. *Plant. Soil.*, 71: 455-462. 1983.
13. Ho, I. & Zak, B. — Acid phosphatase activity of six ectomycorrhizal fungi. *Can. J. Bot.*, 57: 1203-1205. 1979.
14. Li, C. C. *Path Analysis. A Primer*, Pacific Grove, California, The Boxwood Press. 1975. 346p.
15. Lindeman, W. — Observation on the behavior of phosphate compounds in *Chlorella* at the transition from dark to light. In: *United Nations* (ed.). Second United Nations International Conference on the Peaceful uses of Atomic Energy, Genebra, 24: 8-15. 1968.
16. Scott, A. J. & Knott, M. — A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics*, 30: 507-12. 1974.
17. Woolhouse, H. W. — Differences in the properties of the acid phosphatase of plant roots and their significance in the evolution of edaphic ecotypes. In: Rorison, I. H. (ed), *Ecological Aspects of the Mineral Nutrition of Plants*. Oxford, Blackwell Scient. Publ., 1969. p. 357-380.

Recebido para publicação em 13/11/90

INTOXICAÇÃO POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* PROVOCADA POR QUEIJO "TIPO MINAS"

Maria Lúcia Pereira¹
Maria Auxiliadora de Lara¹
Ricardo Souza Dias¹
Luiz Simeão do Carmo¹

NOTA BREVE

RESUMO

Queijo "tipo Minas" padrão produzido de forma não industrial em uma fazenda do município de Itatiaiuçu, MG, apresentando $2,0 \times 10^7$ UFC de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico/g, provocou intoxicação em sete pessoas em Belo Horizonte, MG.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, Toxiinfecção.

INTRODUÇÃO

O queijo "tipo Minas" é considerado um produto de ampla aceitação comercial e se faz presente nos hábitos alimentares de nossa população. Apesar da legislação brasileira exigir a utilização de leite pasteurizado para o preparo do mesmo, é intensa a comercialização do produto não obediente à especificação legal. A qualidade microbiológica do queijo entre outros fatores, fica assim afetada o que o torna potencialmente capaz de conter microrganismos responsáveis por diferentes processos patológicos no homem.

No dia 7 de agosto de 1990, em Belo Horizonte, MG, quatro pessoas de uma mesma família apresentaram náuseas, vômitos, diarréia, dores abdominais e sudorese. Um membro dessa família levou para o seu local de trabalho algumas fatias de queijo "tipo Minas" que foram oferecidas no lanche a duas colegas, provocando nessas, num período médio de quatro horas, os mesmos sintomas. No dia seguinte, a faxineira da família lanchou do mesmo queijo, que havia sido mantido sob refrigeração, manifestando, de forma idêntica,

o mesmo quadro clínico, sugerindo que o queijo fosse o responsável pela intoxicação.

O alimento foi obtido numa fazenda de Itatiaiuçu, MG, tendo sido processado de forma caseira e com leite não pasteurizado.

Os sintomas regrediram após a medicação anti-emética e anti-espasmódica, não tendo ocorrido hospitalização de nenhum dos acometidos. Os dados epidemiológicos permitiram a suspeita de uma intoxicação por *S. aureus* ou *B. cereus*. Após dar entrada no laboratório, 25g de alimento foram homogeneizados em água peptonada tamponada, preparando-se a partir daí, diluições decimais até 10^{-5} . Inoculou-se, por espalhamento, 0,1 ml de cada diluição em placas de agar Baird-Parker (Biobrás) e agar manitol-vermelho de fenolpolimixina (Biobrás), incubando-se a 37°C, durante 24h, para a contagem de *S. aureus* ou *B. cereus*, respectivamente, de acordo com FDA (1) e Speck (7). As placas de agar manitol vermelho de fenol polimixina não evidenciaram colônias típicas de *B. cereus*. Já o agar Baird-Parker, evidenciou o crescimento de colônias negras, puntiformes, circundadas por um halo branco, opaco e outro exter-

1. Serviço de Microbiologia, Divisão de Bromatologia e Toxicologia, Fundação Ezequiel Dias, Caixa Postal 26, CEP. 30550, Belo Horizonte, MG, Brasil.

no transparente sendo que as contagens indicaram uma população de $2,0 \times 10^7$ UFC/g.

Cinco colônias suspeitas de *S. aureus* foram isoladas e caracterizadas pelo teste de coagulase e DNase-termoestável, de acordo com FDA (1) e Lanchica *et alii* (4) e avaliadas quanto a capacidade de utilização de glicose e manitol em anaerobiase. Para verificação de enteroxina procedeu-se de acordo com o método de Hallander (2) modificado por Jarvis (3) sendo a identificação das mesmas realizada através do teste de imunodifusão, pelo método da sensibilidade ótima em placas "OSP" (5,6). Todas colônias mostraram-se produtoras de enteroxina tipo B.

Concluiu-se que a presente intoxicação foi causada por queijo "tipo Minas" padrão, contaminado com *S. aureus* produtor de enterotoxina tipo B e que a contaminação provavelmente originou-se da manipulação durante a fase de processamento ou então, do leite não pasteurizado infectado através de mamite.

SUMMARY

Staphylococcal food poisoning by cheese "tipo Minas"

One sample of "Minas padrão" cheese produced in small scale in a farm of Itatiaícu, Minas Gerais, was responsible for a food poisoning outbreak

envolving seven persons in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. The isolated microrganism was a type B enterotoxigenic *S. aureus* strain with a plate count CFU of $2,0 \times 10^7$ CFU/g.

Key Words: *Staphylococcus aureus*, food poisoning.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. - Bacteriological Analytical Manual. Association of Official Analytical Chemists, 1978.
2. Hallander, H. O. - Production of large quantities of enterotoxins B and other *staphylococcal* toxin solid media. *Acta Pathol. Microbiol. Scandinavica*, **63**: 299-305, 1965.
3. Jarvis, A. W. & Lawience, R. C. - Production of enterotoxins for the routine testing of Staphylococci. *J. Appl. Microbiol.*, **16**: 689-699, 1970.
4. Lachica, R. V. V.; Genigeorgis, C. & Hoeprick, P. D. - Methacromatic agar difusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. *J. appl. Bacteriol.*, **21**: 585-587, 1971.
5. Oudin, J. - Techinique and analyse of the quantitative precipitation to immunochemical analyses. *Methods in Med. Res.*, **5**: 534-578, 1952.
6. Robbins, R.; Gould, S. & Bergdoll, M. S. - Detecting the enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains. *Appl. Microbiol.*, **28**: 946-950, 1974.
7. Speck, M. L. ed. - Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 2 ed. Washington. American Public Health Association, 914., 1984.

Recebido para publicação em 07/12/90

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA
VOLUME 22, 1991

CONTEÚDO-CONTENTS

	PÁG
Volume 22, Número 1	
Garcia Jr., O.	
Isolamento e purificação de <i>Thiobacillus ferrooxidans</i> e <i>Thiobacillus thiooxidans</i> de algumas minas de urânio e carvão do Brasil	
Isolation and purification of <i>Thiobacillus ferrooxidans</i> and <i>Thiobacillus thiooxidans</i> from some cool and uranium mines of Brazil	1
Cruz Pradella, J.G. da; Zuccolo, M.; Lopes, S.A.R.; Oliveira, M.S.	
Produção de micélio vegetativo de <i>Pisolithus tinctorius</i> : efeito de fontes de nitrogênio e cultivo em fermentador agitado	
<i>Pisolithus tinctorius</i> vegetative mycelia production: effects of nitrogen sources and cultivation in stirred tank fermenter.....	7
Yokoya, F.; Oliva-Neto, P. de	
Características da flocação de leveduras por <i>Lactobacillus fermentum</i>	
Flocculation of yeast cells by <i>Lactobacillus fermentum</i>	12
Facchin, I.; Barros, N.M. de	
Produção de enzimas extracelulares por <i>Nomuraea rileyi</i> (Farlow) Samson	
Production of extracellular enzymes by <i>Nomeraea rileyi</i> (Farlow) Samson	17
Levy, C.E.; Montelli, A.C.; Furtado, J.S.; Pereira, A.A.; Mamizuke, E.M.; Silva, M.L.R.; Francisco, W.	
Resistência a drogas em cepas bacterianas de pacientes hospitalares. Laboratórios de Referência do Sistema COBA	
.....	21
Dias, J.C. de A.R.; Ernandes, D.; Hofer, E.	
Resistência a antimicrobianos em <i>Vibrio cholerae</i> não 01 e <i>V. parahemolyticus</i>	
Antibiotic resistance in non-01 <i>Vibrio cholerae</i> and <i>V. parahaemolyticus</i>	28
Martins, F.M.; Silva, M.G. da; Gontijo Filho, P.P.	
Relação entre a resistência a antimicrobianos e antissépticos em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Relationship between antimicrobial and antiseptic resistance in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strains.....	34
Silva, M. do R.R.S.; Fernandes, O. de F.L.; Silva, H.M. e	
Agentes etiológicos de micetomas ocorridos em Goiânia - Goiás	
Etiologic agents of mycetoma found in the state of Goiás - Brazil	39
Ferreira, M.C.; Domingues, R.M.C.P.; Silva Neto, I.D.; Uzeda, M. de	
Microscopia eletrônica de varredura de <i>Bacteroides fragilis</i> exposto a agentes antimicrobianos	
Scanning electron microscopy of <i>Bacteroides fragilis</i> exposed to antimicrobial agents	44
Fantinato, V.; Zelante, F.	
<i>Streptococcus salivarius</i> : detecção de cepas produtoras de substâncias semelhantes à bacteriocinas contra bactérias bucais	
Bacteriocin like-substances production by <i>Streptococcus salivarius</i> against oral bacteria	49

Liberal, M.H.T.; Boughton, E.	
Observações preliminares sobre a sensibilidade "in vitro" de amostras de <i>Mycoplasma</i> e <i>Acholeplasma</i> de origem bovina	
Preliminary observations on "in vitro" sensitivity of <i>Mycoplasma</i> and <i>Acholeplasma</i> strains of bovin origin.....	55
Novo, M. do C. de S.S.; Lopes, E. S.; Ortolan, M.C.A.	
Levantamento da nodulação, persistência de herbicidas e isolamento de <i>Bradyrhizobium</i> spp de áreas com rotação cana-de-açúcar/amendoim	
Spontaneous nodulation, isolation of rhizobia and persistance of herbicides in area of sugar cane/peanut rotations	60
Fonseca, H.	
Sistema de amostragem para análise de aflatoxinas em grãos	
Sampling plan for analysis of aflatoxins in grains	66
Hagler, A.N.; Mendonça-Hagler, L.C.	
Teste do azul de diazonium B para leveduras cultivadas por três dias em meio contendo uréia	
A diazonium blue B test for yeasts grown three days on yeast carbon base - urea agar.....	71
Moura, S.M.; Destro, M.T.; Franco, B.D.G.M.; Brancaccio, R.M.	
Proposição de um novo iluminador para pesquisa de <i>Listeria</i>	
Low cost illumination system for <i>Listeria</i> spp research.....	75
Informações Técnico-Científicas (SBM)	78
Volume 22, Número 2	
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> strain 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 Imunoiden-tificação 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. da; Ghillardi, A.C.R.	
<i>Neisseria meningitidis</i> group B serotype 2a, 2c, 1: cross-reactivity of mouse antibody IgG, IgM and IgA re-sponse in immunoblot technique	
<i>Neisseria meningitidis</i> B sorotipos 2a, 2c, 1: Reatividade cruzada de anticorpos IgG, IgM e IgA de cam-un-dongos 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 bichloreto 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>Escherichia coli</i> na clara e no ovo líquido Membrane filtration technique for rapid enumeration of <i>Escherichia coli</i> in egg white and whole liquid egg...	122
Calderon, D.F.; Furlanetto, S.M.P. Isolamento de <i>Salmonella</i> em diferentes meios seletivos de enriquecimento, tempos e temperaturas de incubação Dynamics of <i>Salmonella</i> isolation with tetrionate-novobiocin selenite cistine enrichment broth and modified Rappaport's medium.....	127
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 Growth and toxin production of <i>Clostridium botulinum</i> in media and conditions recommended for isolation of <i>Clostridium perfringens</i>	131
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" Variation of the physical, chemical and microbiological characteristics of brines during their utilization for salting Minas cheese.....	136
Florentin, 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 Antifungal activity of calcium propionate against <i>Aspergillus</i> strain (<i>flavus</i> group) isolated from poultry feeds and ingredients in Santa Catarina State.....	141
Melo, I.S. Antagonismo de espécies de <i>Trichoderma</i> contra <i>Sclerotinia minor</i> and <i>S. sclerotiorum</i> "in vitro" Antagonism of <i>Trichoderma</i> species against <i>Sclerotinia minor</i> and <i>S. sclerotiorum</i> "in vitro"	147
Ioneda, T.; Gameiro, R.U. Trehalose dimycolate as the major toxic lipid from <i>Rhodococcus bronchialis</i> grown on glycerol Dimicolato de Trealose: principal constituinte lipídico tóxico de <i>Rhodococcus bronchialis</i>	151
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 <i>Trichoderma reesei</i> and <i>Rhizopus oligosporus</i> growth in sugar cane bagasse for protein production	164
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 Effect of the cells removal on the yield of alcoholic fermentation by yeast	170
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 Sucessão fúngica em folhas de <i>Ocotea pulchella</i> (Nees) Mez. colocadas sobre o solo sob cerrado, tratado com vinhaça.....	179
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. "In vitro" 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
Volume 22, Número 3	
Montelli, A.C.; Levy, C.E. Sistema COBA 1988 – Aspectos relativos aos dados dos laboratórios de referência.....	197
Montelli, A.C. Considerações sobre os 10 anos de atividades do Sistema COBA	206
Ferreira, L.A.P.; Ferreira, P.C.P.; Kroon, E.G.; Trindade, M.L.; Golgher, R.R. A concentração de interferon humano de membranas amnióticas: I - Métodos Físicos The concentration of the human amniotic membrane interferon: I - Physical methods	210
Ferreira, L.A.P.; Ferreira, P.C.P.; Kroon, E.G.; Gonzaga, C.; Santos, J.R. dos; Golgher, R.R. A concentração de interferon humano de membranas amnióticas: II - Métodos Químicos Concentrations of the human amniotic membrane interferon: II - Chemical Methods.....	216
Pimenta, C. G.; Ferreira, P. C. P.; Ferreira, L. A. P.; Golgher, R. R. Purification of human amniotic membrane interferon by affinity chromatography Purificação de interferon humano de membranas amnióticas por cromatografia de afinidade	221

Oliveira, L.H.S.; Yoshida, C.F.T.; Monteiro, S.S.; Câmara, F.P. Seroepidemiological survey for hepatitis A and B markers in health care students from a public university of Rio de Janeiro, Brazil.....	226
Avila-Campos, M.J.; Carvalho, M.A.R. de; Damasceno, C.A.V.; Chartone-Souza, E.; Cisalpino, E.O. Sensitivity to mercuric chloride of <i>Bacteroides fragilis</i> group isolates in different growth media: medium-dependent variation Sensibilidad ao biocloreto de mercúrio de isolados de grupo <i>Bacteroides fragilis</i> em diferentes meios de cultura: variação meio-dependente.....	232
Sutich, E.G.; Belmonte, A.; Nogueras, M.; Llop, M.M. Esquema simplificado de identificación de las especies de <i>Staphylococcus</i> coagulasa-negativa aislados de infecciones humanas Identification simplified scheme for coagulase-negative <i>Staphylococcus</i> strains isolated from human infections	237
Cardoso, C.L.; Bedendo, J.; Bronharo, M.C.; Moribi, L.A.; Garcia, L.B. Ocorrência de estípites de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a oxacilina em servidores hospitalares Occurrence of oxacillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> strains in hospital personnel.....	242
Pagnocca, F.C.; Hagler, L.C.M.; Hagler, A.N. Heterotrophic bacteria associated with the shrimp <i>Peneaus schimitti</i> , sediment and water of Sepetiba Bay, Rio de Janeiro, Brazil	247
Lombardi, M.L.C.O.; Oliveira, P.A. Eficiência de estípites de <i>Bradyrhizobium</i> sp., na fixação do nitrogênio em amendoim (<i>Arachis hipogaea</i> , L.) Efficiency of <i>Bradyrhizobium</i> sp., strains on nitrogen fixation in peanut (<i>Arachis hypogaea</i> , L.)	253
Machoshvili, I.A.; Penna, T.C.V.; Colombo, A.J. Resistência térmica de <i>Staphylococcus aureus</i> em leite de soja com ou sem acréscimo de ingredientes Heat resistance parameters of <i>Staphylococcus aureus</i> in soybean milk and soybean milk with additives.....	257
Costa, C.P.; Ferreira, M.C. Preservação de microrganismos: Revisão Preservation of microorganisms: a Review	263
Avila-Campos, M.J.; Carvalho, M.A.R. de; Raymundo, N.L.S.; Farias, L. de M.; Damasceno, C.A.V.; Cisalpino, E.O. "In vitro" susceptibility to Imipenem of <i>Actinobacillus (Haemophilus) actinomycetemcomitans</i> strains isolated in Brazil Susceptibilidade "in vitro" ao Imipenem de cepas de <i>Actinobacillus (Haemophilus) actinomycetemcomitans</i> , isolados no Brasil	269
Pires, M. de F.C.; Purchio, A. Micological evolution of filtrated juice of <i>Agave sisalana</i> perrine's leafe Utilização de suco filtrado da folha de <i>Agave sisalana</i> para inibição do crescimento de fungos toxigênicos...	272
Volume 22, Número 4	
Domingues, R.M.C.P.; Cavalcanti, S.M.B.; Fonseca, M.E.F.; Ferreira, M.C.S. Hemagglutination activity of <i>Bacteroides fragilis</i> as a virulence marker Atividade hemaglutinante de <i>Bacteroides fragilis</i> como marcador de virulência	277

Hársi, C.M.; Candeias, J.A.N.	
A reação de imunofluorescência indireta no diagnóstico por rotavirus The indirect immunofluorescence assay in the diagnosis of human rotavirus gastroenteritis	282
Modolo, J.R.; Gottschalk, A.F.; Moreno, G.; Lopes, C.A. de M.; Margatho, L.F.; Del Fava, C.	
Campylobacter em cães com ou sem diarréia: incidência e suscetibilidade a 21 antimicrobianos Incidence of <i>Campylobacter</i> in stools of diarrheic and non-diarrheic dogs	288
Guilardi, A.C.R.; Ortolan, M.; De Gasperi, E.N.	
Conservação de bactérias do gênero <i>Haemophilus</i> Preservation of genera <i>Haemophilus</i> bacteria	293
Pinheiro, M. S.; Barrucand, L.; Ricciardi, I.D.; Tibana, A.	
Avaliação do método da passivação do cobre para a obtenção de microaerofilia e do ágar cefoxitina no cultivo de <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>Campylobacter coli</i> Evaluation of cefoxitin medium and the microaerophilic environment produced by a combination of iron, copper and sodium bicarbonate for the culture of <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>Campylobacter coli</i>	298
Furlanetto, S.M.P.; Nascimento, D. do; Cerqueira-Campos, M.L.; Iaria, S.T.	
Efficacy of direct plating and selective enrichment media for detecting <i>Campylobacter jejuni</i> in fresh eviscerated whole market chickens - São Paulo - Brazil <i>Campylobacter jejuni</i> em carcaças de frangos, avaliação da eficiência de meios de plaqueamento e enriquecimento seletivo no seu isolamento	303
Smania Jr., A.; Gil, M.L.; Smania, E.F.A.; Zoccoli, C.M.; Michels, D.; Lopes, R.	
Resistência a agentes antimicrobianos de amostras de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> isoladas em Florianópolis Resistance to antimicrobial agents of <i>Neisseria gonorrhoeae</i> isolated at Florianópolis, Santa Catarina	308
Korol, S.; Natale, P.; Moretton, J.; Santini, P.; D'Aquino, M.	
Isolation and characterization of a new para-chlorophenol degrading strain of <i>Pseudomonas</i> from samples of natural waters Isolamento e caracterização de uma nova raça de <i>Pseudomonas</i> capaz de degradar p-clorofenol	313
Oliveira, V. de; Mesquita, A.J.; Serafini, A.B.; Ribeiro, J.L.; Silva, M.R.R.	
Ocorrência de aflatoxinas B ₁ , e G ₁ , em amendoim comercializado em Goiânia - GO, Brasil The occurrence of aflatoxins B ₁ , e G ₁ , in peanuts dealt in Goiânia - GO, Brazil	319
Machoshivili, I.A.; Penna, T.C.V.; Colombo, A.J.	
Resistência térmica de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> em solução tampão fosfato (pH 7,0) e em leite reconstituído Thermal inactivation studies on <i>Staphylococcus aureus</i> strains in potassium phosphate solution at pH 7,0 and in reconstituted milk	323
Cerutti, R.L.; Barbosa, T.C.P.	
Flora bacteriana heterotrófica em ostras (<i>Crassostrea rhizophorae</i>) e águas da Baía Norte, ilha de Santa Catarina, Brasil Heterotrophic bacteria in oysters and waters of North Bay, Santa Catarina, Brazil	330
Faintuch, B.L.; Sato, S.; Aquarone, E.	
Emprego de algumas fontes nitrogenadas na obtenção de biomassa de <i>Oscillatoria limnetica</i> Use of different nitrogen sources in the production of biomass of <i>Oscillatoria limnetica</i>	335

Oliveira, R.G.B.; Souza, M.L. Partial characterization of a brown pigment produced by <i>Azospirillum lipoferum</i> Caracterização parcial de um pigmento produzido por <i>Azospirillum lipoferum</i>	340
Pacheco, S.; Cambraia, J.; Kasuya, M.C.M. Efeito de diferentes níveis de fósforo sobre a atividade de fosfatases ácidas e a composição mineral de alguns fungos e tomicorrízicos Effect of different levels of P on acid phosphatase activity and mineral composition of some ectomycorrhizal fungi.....	345
Pereira, M.L.; Lara, M.A. de ; Dias, R.S.; Carmo, L.S. do Intoxicação por <i>Staphylococcus aureus</i> provocada por queijo "Tipo Minas" Staphylococcal food poisoning by cheese "Tipo Minas"	349

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 assegurar boa reprodução. Devem ser numeradas no verso, a lápis e identificadas com o nome dos autores. As legendas de gráficos e tabelas devem ser datilografadas em folhas separadas. Gráficos, figuras, e tabelas devem ser apresentados de tal forma que possam ser reduzidos, se necessário. Não são aceitas ilustrações coloridas. Indicar no texto o local aproximado onde devem ser inseridos tabelas, figuras e gráficos.

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

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

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

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

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

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