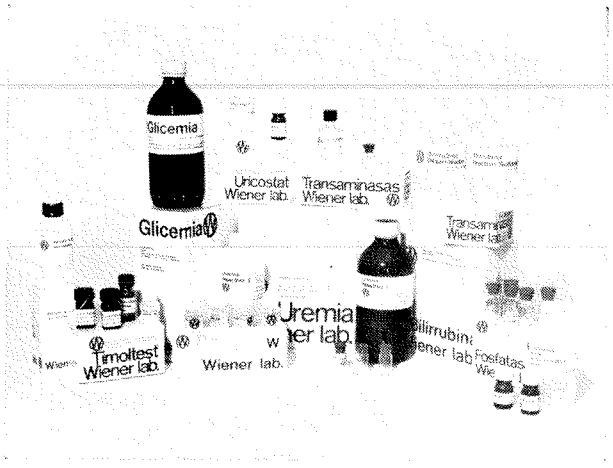
Vol. 3, n.º 2, p. 61-120
1972

REVISTA DE MICROBIOLOGIA

Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo - Brasil

exatamente a solução procurada...



KITS PARA BIOQUIMICA WIENER

- **excepcional estabilidade dos reativos**
  aproveitamento integral
- **simplicidade operacional**
  grande economia de tempo
- **especificidade**
  segurança nos resultados
- **macro-microtécnicas**
  vantagem adicional

GARANTIA TOTAL

CELM

– solicite folhetos e listas de preços –

Rev. Microbiol.	Vol. 3	N.º 2	Pág. 61-120	Abril / Junho, 1972

CONTEÚDO

ARTIGOS ORIGINAIS

Pág.

Análise Microbiológica de Ácido Nicotínico e Trigonelina em Cafés Brasileiros — E. N. S. DE OLIVEIRA, K. KIZAWA & B. CAMPOS 61

Tratamento de Sementes de *Brassica oleraceae* var. *capitata* com Antibióticos e sua Ação em *Xanthomonas campestris* — M. A. LEMOS, R. N. NEDER & J. L. AZEVEDO 69

Occurrence of atypical mycobacteria in the lymph nodes of apparently healthy slaughtered cattle in São Paulo, Brazil — A. F. P. DE CASTRO & H. NEMOTO 75

Dosagens Microbiológicas de Vitaminas em Peixes e Crustáceos. I — Ácido Fólico, Colina e Vitamina B_{12} — S. RIBEIRO & I. ROITMAN 79

Bacteriological Study on Atypical Mycobacteria associated with man — M. MAGALHÃES, G. CAMPOS & T. GUERRA 85

Atividade Celolulítica em alguns solos brasileiros — L. F. de T. L. LINHARES & A. DROZDOWICZ 91

NOTA

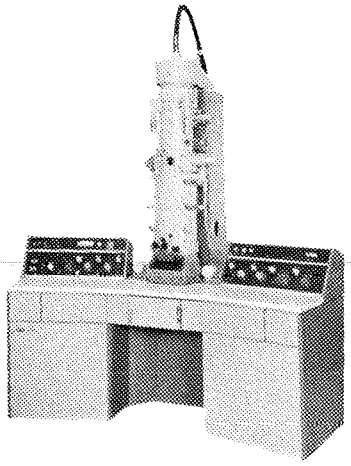
Studies on a strain of *Listeria* (*L. grayi*) isolated from bovine nasal secretion — E. HOFER 101

REVISÃO

Técnicas selecionadas de coloração e de citologia ótica de bactérias — I. SUASSUNA & I. R. SUASSUNA 103

JEOL

GARANTE A ASSISTÊNCIA TÉCNICA E A CAPACIDADE DE TODOS OS SEUS EQUIPAMENTOS

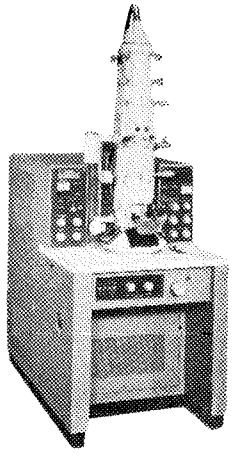


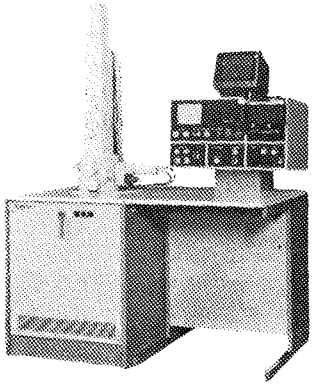
Microscópio Eletrônico JEM-100B

- De resolução garantida de 2Å (máxima do mundo)
- Goniômetro Universal de resolução garantida de 3,4Å
- Tensão de aceleração : 20 — 40 — 60 — 80 — 100kV
- Ampliação direta : x300 ~ x500.000
- Acessório Scanning de resolução garantida de 100Å

Microscópio Eletrônico JEM-T8

- De resolução garantida de 6.9Å
- Tensão de aceleração: 60kV
- Ampliação direta : x500 ~ x100.000
- Sistema de controle do vácuo automático
- Com dispositivo automático de exposição para fotografar





Microscópio de Varredura JSM-S1

- De resolução garantida de 250Å
- Ampliação : x19 ~ x100.000
- Com estrado de Goniômetro
- Com acessório TV scanning
- Controle do vácuo automático e máquina fotográfica automática

JEOL LTD., Tokyo, Japan

JEOL DO BRASIL - Assistência Técnica

Rua da Glória, 654 — N.º 16 — São Paulo
Tel.: 279-1032

REVISTA DE MICROBIOLOGIA

AQUISIÇÃO POR NÃO-MEMBROS DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

A Revista de Microbiologia é órgão da Sociedade Brasileira de Microbiologia, sendo publicada trimestralmente. Teve início em julho-setembro de 1970.

PREÇOS

Cada exemplar	Cr$ 10,00
Número atrasado	Cr$ 15,00
Assinatura anual	Cr$ 40,00
Assinatura para o Exterior Marítimo	US$ 10,00
Assinatura para o Exterior Aéreo	US$ 15,00

Ordens de pagamento e requisição de números atrasados deverão ser feitas para:

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
Rua Bennett n.º 1311
Alto de Pinheiros
São Paulo — Brasil
Cód. 05464

REVISTA DE MICROBIOLOGIA

SUBSCRIPTION BY NON-MEMBERS OF THE SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

The Revista de Microbiologia is a quarterly publication, sponsered by the Sociedade Brasileira de Microbiologia. Its first number was published on July-September, 1970.

PRICES

Single copies	US$ 2,00
Back copies	US$ 3,00
Foreign countries subscription (Second class postage)	US$ 10,00
Foreign countries subscription (Air mail)	US$ 15,00

Orders and enquiries about back volumes should be sent to:

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
Rua Bennett n.º 1311
Alto de Pinheiros
São Paulo — Brasil
Cód. 05464

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

A *Revista de Microbiologia* é uma publicação oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia. Publica trabalhos originais e de revisão em todos os campos da Microbiologia e da Protozoologia. Revisões e atualizações serão publicadas a convite do corpo editorial.

Os manuscritos devem ser enviados em duplicata (original e cópia) a L. R. Trabulsi, rua Bennett, 1311, São Paulo, SP, Cód. 05464, ou a Ítalo Suassuna, Instituto de Microbiologia da Universidade Faderal do Rio de Janeiro, Av. Pasteur 250, fundos, Rio de Janeiro, GB, Brasil.

NORMAS GERAIS — Todo manuscrito apresentado à *Revista* deve representar pesquisa original inédita e que não será publicada em outro órgão. Os manuscritos podem ser redigidos em português, inglês ou espanhol. Uma vez aceitos pela *Revista* não poderão ser reproduzidos, mesmo em parte, sem consentimento oficial dos editôres.

O estilo editorial da *Revista* segue essencialmente o *Style Manual for Biological Journals* (2.ª ed., AIBS, 1964). Os símbolos genéticos deverão seguir essencialmente as recomendações de DEMEREC et al. (*Genetics*, **54**:61, 1966). Abreviaturas bioquímicas devem seguir essencialmente as regras da IUPAC-IUB (*J. Biol. Chem.* **241**:527, 1966). Atividade enzimática deve ser expressa em têrmos de unidades internacionais (*Enzyme Nomenclature*, Elsevier Publishing Co., 1965). Para expressar comprimentos, pêsos e volumes, os prefixos nano (n) e pico (p) devem ser usados em lugar de milimicro (mμ) e micromicro ($\mu\mu$). Comprimentos devem ser expressos em nanômetros (nm; 10^{-9} m) ou em micrômetros (μm; 10^{-6} m), ou ainda, em Angstroms (A; 10^{-10} m). Partes por milhão (ppm), devem ser expressas como microgramos por mililitros (μg/ml), ou microlitros por litro (μlitros/litro). A *Revista* se reserva o direito de adaptar os manuscritos ao estilo adotado.

NOMENCLATURA DOS MICRORGANISMOS — A combinação binária, nome do gênero seguido do nome da espécie, é adotada e a nomenclatura apresentada no *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (7.ª ed., 1957) obedecida. Se um Autor divergir dessa nomenclatura, seu próprio julgamento será respeitado, mas a classificação correspondente do Manual de Bergey deve ser mencionada a seguir, entre parênteses, à primeira vez em que o nome figurar no texto e no resumo. Quando um nôvo nome fôr proposto para um microrganismo, será solicitada a opinião de uma autoridade internacional em taxonomia.

FORMA DO MANUSCRITO — Os manuscritos devem ser datilografados em papel branco comum, tipo ofício, em espaço duplo ou triplo, com margens laterais, superior e inferior de, no mínimo, 3 centímetros. Devem, ainda, ser divididos nas seguintes secções: Resumo, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos e Referências bibliográficas.

RESUMO — Todo trabalho deve se iniciar com um resumo que não deve exceder a 250 palavras. Além dêstes, os redigidos em inglês devem ser acompanhados de um resumo em português e os redigidos em português e espanhol de um resumo em inglês. Êstes resumos devem incluir o título do trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS — No texto, as referências são citadas por número. A secção de Referências Bibliográficas deverá ser apresentada em ordem alfabética, pelo primeiro Autor, e numerada. Os nomes das publicações científicas são abreviados de conformidade com a lista de periódicos resumida pelos *World Medical Periodicals*. Citações de resumos, "dados não publicados", "comunicações pessoais" e "no prelo", não serão aceitas como referências bibliográficas.

TABELAS — Cada tabela deve ser datilografada numa página separada. Os dados devem ser arranjados de maneira a que colunas de material idêntico sejam lidas perpendicular e não transversalmente. Os cabeçalhos devem ser suficientemente claros de maneira a que os dados sejam compreensíveis sem necessidade de consulta ao texto. Notas explanativas de rodapé são permitidas, mas não descrições pormenorizadas dos experimentos. Materiais e métodos utilizados na obtenção dos dados relatados devem ser mencionados exclusivamente na secção correspondente.

ILUSTRAÇÕES — Um conjunto completo de figuras, preferìvelmente como fotografias, deve acompanhar cada uma das duas vias do manuscrito. Os gráficos devem ser desenhos concluídos e que não requeiram qualquer montagem ou re-arranjo. Parte alguma de um gráfico poderá ser datilografada, devendo ser usado um e o mesmo normógrafo (exceto a legenda, que deve constar em página separada). A maioria dos gráficos será reduzida à largura de cêrca de 13 centímetros e *todos* os elementos no desenho devem ser previstos para essa escala de redução. A legenda da figura deve proporcionar informação suficiente para que a figura seja compreensível sem consulta ao texto. Detalhes experimentais não devem ser repetidos nas legendas das figuras.

NOTAS PRÉVIAS — Não devem exceder de 500 palavras e o respectivo resumo, de 25 palavras. Os Autores devem consultar um número da *Revista* para se familiarizarem com a forma e o estilo.

SEPARATAS — Os Autores terão direito a 10 saparatas; devem entrar em entendimento com os Editôres da *Revista* quando desejarem maior número, correndo então as despesas por conta própria.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

Sócios Patrocinadores

BIOLAB — PRODUTOS BIOLÓGICOS PARA LABORATÓRIOS LTDA.

B. HERZOG — COMÉRCIO E INDÚSTRIA S.A.

CELM — COMPANHIA EQUIPADORA DE LABORATÓRIOS MODERNOS

ELI LILLY DO BRASIL LTDA.

INDÚSTRIAS FARMACÊUTICAS FONTOURA WYETH S. A.

INDÚSTRIA QUÍMICA E FARMACÊUTICA SCHERING S. A.

LABORATÓRIO ROCHE — PRODUTOS QUÍMICOS E FARMACÊUTICOS

PFIZER QUÍMICA LTDA.

Rev. Microbiol.
3(2):61-68, abril-junho, 1972

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE ÁCIDO NICOTÍNICO E TRIGONELINA EM CAFÉS BRASILEIROS

Elma N. Suassuna de OLIVEIRA (1), Kozué KIZAWA (1) & Betinha CAMPOS (2)

RESUMO

Fez-se uma análise microbiológica de ácido nicotínico e trigonelina em 15 variedades de cafés brasileiros, fornecidos pelo Instituto Brasileiro do Café, através de sua Estação Experimental de Ribeirão Preto, São Paulo. O doseamento foi efetuado não só na semente ou endosperma do fruto, como no material comumente conhecido como casca e polpa, e que engloba o epicarpo, mesocarpo e endocarpo do fruto. Os resultados obtidos foram, em média, de 6,7 mg de ácido nicotínico por 100 g de semente e de 3,9 mg de ácido nicotínico por 100 g de casca e polpa. Registrou-se para a trigonelina teores bastante elevados. O valor médio para semente, situa-se em 773,4 mg% e para a casca e polpa correspondente à 339,4 mg%. Os dados foram analisados estatisticamente e comparados com aqueles obtidos por outros estudiosos do assunto, concluindo-se que o café brasileiro, de um modo geral, se apresenta bastante rico em relação ao seu conteúdo em ácido nicotínico e trigonelina.

INTRODUÇÃO

O elevado teor de ácido nicotínico, presente no café, tem despertado o interesse de vários pesquisadores, dada a importância dietética que apresenta. Assim sendo, grande parte do suprimento diário da vitamina, nos países em que a população consome café em quantidade é feito através desta fonte, conforme verificaram TEPLY & col.[21] no café das rações das Forças Armadas dos Estados Unidos; CRAVIOTO & col.[7] no café mexicano; BRESSANI & NAVARRETE [3] no café da América Central e DAUM [8] no café venezuelano. Entretanto no Brasil, onde a indústria cafeeira constitue um dos principais esteios econômicos, destacam-se apenas os trabalhos de CARVALHO [6] e de ARAUJO & col.[1]. O primeiro estudou a interferência de luz e sombra sobre os cafeeiros correlacionando-a com o teor de ácido nicotínico presente nos frutos, e o segundo analisou o ácido nicotínico em amostras de café bebida, pronto para consumo.

As propriedades fisiológicas da trigonelina são bastante discutíveis. MOYER & DUVIGNEAUD [16] contestaram a capacidade da trigonelina em evitar a infiltração gordurosa no fígado e a formação de rins hemorrágicos em ratos, mas observaram também a sua incapacidade de atuar como fator antipelagroso. Esta última assertiva foi confirmada por KREHL & col.[14]. Entretanto, FOA & GLICKERMAN [9] verificaram que a administração oral da trigonelina à humanos, não era seguida por significante aumento de ácido nicotínico na excreção urinária. Recentemente, JOSHI & HANDLER [12] relataram que a utilização da trigonelina por *Torula cremoris* e por brotos de ervilha está relacionada com a biossíntese de NAD e NADP. No caso da levedura ocorria uma desmetilação oxidativa, enquanto que, o mecanismo de desmetilação dos brotos de ervilha não foi estabelecido. Aliás, a própria fórmula estrutural da trigonelina, que é a metil-betaina do ácido nicotínico, sugere fortemente que a formação de ácido nicotínico à partir

(1) Instituto de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná e Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas
(2) Escola de Florestas da Universidade Federal do Paraná

da trigonelina seja resultante de uma desmetilação [15].

A presença da trigonelina no café foi referida a primeira vez por POLSTORFF [18] e por GORTER [10] em 1910. MOORES & GRENINGER [15] admitem que a trigonelina, encontrada no café, possa ser considerada como fonte de piridina e, realmente, HUGHES & SMITH [11], aquecendo trigonelina entre 130 e 220°C, obtiveram como produtos de decomposição piridina e ácido nicotínico. Idênticos resultados foram obtidos pelo aquecimento de cristais de trigonelina isolados de café verde, com um rendimento de 2,1 a 5,8% de ácido nicotínico [11]. BARBIROLI [2] comprovou experimentalmente o exposto usando o próprio café como matéria prima, verificando que, efetuando a torração do café entre 260 a 270°C, detectava-se 20 a 40% de piridina como substância volátil e 10% de ácido nicotínico.

No presente trabalho efetuamos a análise microbiológica de ácido nicotínico e trigonelina em 15 variedades de cafés brasileiros. Considerando-se a importância metabólica do ácido nicotínico como vitamina constituinte de duas coenzimas vitais, como são a Coenzima I (difosfopiridinonucleotídeo) e a Coenzima II (trifosfopiridinonucleotídeo), justifica-se, plenamente, o interesse em averiguar o seu teor em alimentos. No que diz respeito à trigonelina, motivamos a sua determinação no café verde, acreditando na sua importância como contribuinte ao sabor e aroma do café, no seu possível significado biológico e pela sua transformação em ácido nicotínico após o processo de torração.

As análises foram feitas não só na semente propriamente dita, bem como na polpa do café, considerando que, além da sua utilização como adubo em plantações de café, tem sido aventada a hipótese da utilização da polpa como ração para o gado [23] e para aves [4].

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de café foram fornecidas pelo Instituto Brasileiro do Café, através sua Estação Experimental de Ribeirão Preto, São Paulo, e representam as principais variedades de cafeeiros cultivados pela grande maioria dos nossos fazendeiros. As amostras são em número de 15, relacionadas a seguir: San Bernardo, Laurina, Sumatra, Novo Mundo (Linhagem Cp-379-19), Nacional, Caturra Vermelho, Mundo Novo (linhagem Cp-376-A), Murta, San Ramón, Purpuraceus, Bourbon Vermelho, Amarelo de Botucatu, Cera, Bourbon Amarelo de Jaú e Caturra Amarelo.

Tanto o ácido nicotínico como a trigonelina foram dosados microbiologicamente utilizando-se como organismo revelador a levedura *Torula cremoris* (*Candida pseudotropicalis*) n.º 2897, segundo preconiza o método introduzido por WILLIAMS [22].

O fruto do café foi inicialmente secado em estufa a 37°C, durante 12 horas e triturado em liquidificador. A mistura assim obtida foi separada manualmente em dois tipos de fragmentos: um denominado "semente", correspondente às amêndoas, albumens ou endospermas do fruto, envolvidos pela película argêntea ou espermoderma; e outro foi denominado "casca e polpa" compreendendo o epicarpo, mesocarpo e endocarpo ou pergaminho. Impossibilidade técnica nos impediu de separar o pergaminho, entretanto cremos que isto não tenha interferido nas dosagens, visto ser o pergaminho constituido apenas por uma camada cartilaginosa [5]. O teor de ácido nicotínico total foi obtido a partir destes materiais submetidos a hidrólise alcalina, conforme recomenda o método de WILLIAMS [22]. A análise da trigonelina foi feita usando-se solução aquosa dos materiais, e a partir desta solução, obteve-se os valores de ácido nicotínico e trigonelina conjuntamente. Por subtração dos valores obtidos para o ácido nicotínico total, revelam-se os teores correspondentes à trigonelina presente numa proporção de 91,5% do valor real. Consequentemente, estes valores foram submetidos a um fator de correção, dando o resultado do teor real da trigonelina presente no material analisado.

Todas as publicações citadas e discutidas no presente trabalho foram realizadas com semente verde de café. Nós preferimos a designação de "semente seca", visto que, biologicamente, o material usado não era verde, no sentido estrito da palavra, e sim o grão de café maduro, seco e não torrado.

Os resultados expostos representam, pelo menos, 3 dosagens concordantes, correspondendo a cada uma o valor médio de 5 determinações, em duplicata. Os resultados são apresentados em miligramas dos fatores analisados por 100 g de matéria-prima.

RESULTADOS

1. *Ácido nicotínico*: A Tabela I expõe os resultados encontrados para o ácido ni-

cotínico em "semente" e "casca e polpa" das 15 variedades de café analisadas.

Conforme está exposto na Tabela I, verifica-se que na semente os teores de ácido nicotínico oscilaram entre um mínimo de 2,9 mg% na variedade Caturra Amarelo, a um máximo de 11,5 mg% na variedade San Bernardo. A média foi de 6,74 mg%. Tal como para a semente, os teores de ácido nicotínico encontrados na casca e polpa, revelaram-se mínimos na variedade Caturra Amarelo (1,2 mg%) e máximo na variedade San Bernardo (7,8 mg%). A média está situada em 3,92 mg%.

Com os dados expressos em miligrama de ácido nicotínico por 100 g de café, foi feita a análise da variância, com os resultados expostos na Tabela II.

Conforme se verifica pelo Quadro da Análise da Variância, houve um efeito significativo ao nível de 1% tanto para a localização quanto no relativo às variedades. As médias de localização foram:

Semente ..... 6,74 ± 0,27 mg%

Casca e polpa .... 3,92 ± 0,27 mg%

A diferença mínima significativa calculada pelo método de Tuckey ao nível de 1% de probabilidade foi = 1.14.

Tendo em vista o que se constata pela Análise da Variância, há uma diferença quanto aos teores de ácido nicotínico contido na semente, e na casca e polpa.

As médias relativas às variedades, afetadas de um erro padrão da média $\bar{x}$ = 0.73 mg%, estão expostas na Tabela I.

A diferença mínima significativa calculada pelo método de Tuckey ao nível de 1% de probabilidade foi = 4,98.

A Tabela III expõe comparações entre os nossos resultados e aqueles obtidos por outros estudiosos do assunto.

2. *Trigonelina*: Tanto a semente de café, propriamente dita, como o material denominado casca e polpa, apresentam-se bastante ricos em seu conteúdo de trigonelina, conforme está exposto na Tabela IV.

Conforme se verifica na referida Tabela, os teores de trigonelina, presentes na semente, variam de 327,7 a 1.175,0 mg por 100 g de matéria-prima, correspondentes respectivamente às variedades Novo Mundo (Cp-379-19) e Murta. O valor médio situa-se em 773,4 mg%. Os teores de trigonelina presentes na casca e polpa oscilam entre 177,6 mg% na variedade Sumatra e 553,1 mg% na variedade Mundo Novo (Cp-376-A), estando o valor médio situado em 339,4 mg%.

Com os dados originais expressos em unidades mg% foi feita uma Análise da Variância seguindo o esquema tratamentos e blocos casualizados, com os resultados expostos na Tabela II.

Conforme se verifica pelo quadro da Análise da Variância, houve um efeito significativo ao nível de 1% tanto para localização, quanto entre as variedades. As médias de localização foram:

Semente ..... 773,45 ± 29,19 mg%

Casca e polpa ... 339,49 ± 29,19 mg%

A diferença mínima significativa calculada pelo método de Tuckey ao nível de 1% de probabilidade foi = 122,89.

Como se demonstra pela Análise da Variância, as médias de localização também apresentam diferença significativa pelo método de Tuckey.

As médias relativas às variedades, afetadas de um erro padrão da média s $\bar{x}$ = = 78,92 mg% estão expostas na Tabela IV.

A diferença mínima significativa calculada pelo método de Tuckey ao nível de 1% de probabilidade foi = 122,89.

Como se demonstra pela Análise da Variância, as médias de localização também apresentam diferença significativa pelo método de Tuckey.

As médias relativas às variedades, afetadas de um erro padrão da média s $\bar{x}$ = = 78,92 mg% estão expostas na Tabela IV.

A diferença mínima significativa calculada pelo método de Tuckey ao nível de 1% de probabilidade foi = 563,44.

Torna-se necessário ainda salientar que no dosamento que efetuamos na casca e na polpa do fruto do café, material que, na industrialização normalmente é desprezado, registramos valores equivalentes a metade, senão iguais, àqueles encontrados na semente propriamente dita, tanto no que se refere ao conteúdo em ácido nicotínico como em trigonelina, como se pode observar pelas Tabelas I e IV.

DISCUSSÃO

Estatisticamente, conclui-se que, em se tratando de ácido nicotínico, a variedade San Bernardo difere das variedades San Ramón, Cera, Mundo Novo (Cp-379-19), Nacional, Amarelo de Botucatu, Bourbon Vermelho e Caturra Amarelo e Vermelho, não diferindo das demais. A variedades Sumatra difere das variedades Amarelo de Botucatu, Bourbon Vermelho e Caturra Amarelo e Vermelho. As variedades Laurina, Mundo Novo (Cp-376-A) e Murta, diferem apenas da variedade Caturra Amarelo. Em relação à trigonelina, conclui-se que, apenas Murta e Mundo Novo (Cp-376-A) diferem de Mundo Novo (Cp-379-19).

Considerando-se o conteúdo do café em ácido nicotínico, os nossos resultados revelaram-se mais elevados que os obtidos por CRAVIOTO & col.[7], BARBIROLLI[2] e HUGHES & SMITH[11] que estudaram amostras de café brasileiro rotulado como "Santos". Outrossim, também encontramos diferenças para mais, nos dados por nós obtidos quando comparados com aqueles citados por BRESSANI & NAVARETTE[3] para o café da América Central e por TEPLY & PRIER[20] para o café servido em restaurantes do médio oeste dos Estados Unidos. Por outro lado, os teores que encontramos mostraram-se mais baixos do que aqueles apresentados por TEPLY & col.[21] para o café usado nas rações das Forças Armadas dos Estados Unidos. No que diz respeito ao conteúdo de ácido nicotínico na polpa do café, nossos dados vêm comprovar resultados anteriores obtidos por BRESSANI & col.[4] no café venezuelano, os quais encontraram valores correspondentes a 2,2 mg de ácido nicotínico por 100 g de polpa úmida e 16,1 mg de ácido nicotínico por 100 g de polpa seca.

A diferença para mais encontrada nos nossos trabalhos, em comparação com dados obtidos por outros pesquisadores, pode ser explicada por diversas hipóteses, das quais destacamos duas. A primeira relaciona-se com o microrganismo revelador, a *Torula cremoris* mostra-se capaz de utilizar trigonelina como substância precursora na síntese de ácido nicotínico. O autor do método de dosagem empregado[22] declara que esta interferência é eliminada durante a preparação dos extratos pela hidrólise alcalina. Verificamos em um estudo comparativo entre os métodos de dosagem de ácido nicotínico, empregando como microrganismos reveladores, a *Torula cremoris* e o *Lactobacillus arabinosus* que, quando a matéria-prima a ser usada era café, os resultados obtidos com a levedura davam sempre valores mais elevados do que os obtidos com o bacilo[13]. A segunda hipótese seria a admissão de que o café brasileiro apresenta um teor mais elevado de ácido nicotínico. BRESSANI & NAVARETTE[3] afirmam que o teor de ácido nicotínico está intimamente relacionado com a variedade de café. Encontramos entre as variedades estudadas, inúmeras que apresentam teores de ácido nicotínico análogos àqueles obtidos por outros investigadores. Neste caso, enquadram-se as variedades Nacional, Caturra Vermelho, Bourbon Vermelho, Amarelo de Botucatu e Caturra Amarelo. Outras variedades, tais como San Bernardo, Laurina, Mundo Novo (Cp-376-A), San Ramón, Purpuracens, Bourbon Amarelo de Jaú e Murta, apresentam um teor bem mais elevado. Desde que as amostras em estudo são oriundas de uma Estação Experimental, onde os cafeeiros são cultivados em condições controladas e homogêneas, podemos acreditar que estas oscilações sejam devidas primariamente à variedade. As diferenças encontradas entre linhagens de uma mesma variedade, ou seja, as linhagens Cp-376-A e Cp-379-19 da variedade Mundo Novo, vêm reforçar a segunda alternativa.

Nossos resultados, em relação à trigonelina, estão de acordo com os citados pela literatura especializada. Assim sendo, NOTTBOHM & MAYER[17] referem-se a um teor de 0.43% de trigonelina em amostras de café de Santos, enquanto que SLOTTA & NEISSER[19] registram teores oscilando entre um mínimo de 0,8% a um máximo de 1,2%.

SUMMARY

Microbiological assays of nicotinic acid and trigonelline in brazilian coffees.

Microbiological assays of nicotinic acid and trigonelline were made in fifteen different kinds of brazilian coffees supplied by the "Instituto Brasileiro do Café", through its Experimental Section of Ribeirão Preto, São Paulo.

The assays were made in the seed or endosperme of the fruit, rind and pulp, which compose the epicarp and endocarp of the fruit.

The results averaged: 6,7 mg% of nicotinic acid in the seed and 3,9 mg% nicotinic acid in the rind and pulp.

For trigonelline, the average values in the seeds were 773,4 mg% and 339,4 mg%, in the rind and pulp.

Statistic evaluation and comparison of these results with those obtained by others investigations demonstrated that the brazilian coffees generally had a higher content of nicotinic acid and trigonelline, than that established in most data available.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Luiz José Bove Kesikowski a colaboração quanto à análise estatística dos dados e à Srta. Roseli Aparecida Rocha pela assistência técnica.

TABELA I

Teor de ácido nicotínico em 15 variedades de café do Brasil

Variedades	Ácido nicotínico (mg/100 g)			
	Semente	Casca e Polpa	Total	Médias
San Bernardo	11,50	7,80	19,30	9,65
Laurina	10,60	5,40	16,00	8,00
Sumatra	10,70	6,10	16,80	8,40
Mundo Novo (Cp-379-19)	4,70	3,20	7,90	3,95
Nacional	5,30	2,40	7,70	3,85
Caturra Vermelho	4,30	2,00	6,30	3,15
San Ramón	4,90	4,00	8,90	4,45
Purpuracens	5,00	4,70	9,70	4,85
Bourbon Vermelho	4,40	2,00	6,40	3,20
Amarelo de Botucatu	4,70	1,90	6,60	3,30
Cêra	5,20	2,90	8,10	4,05
Bourbon Amarelo de Jaú	8,30	3,60	11,90	5,95
Caturra Amarelo	2,90	1,20	4,10	2,05
Mundo Novo (Cp-376-A)	9,80	5,30	15,10	7,55
Murta	8,90	6,20	15,10	7,55

TABELA II

Análise da variância dos dados obtidos para ácido nicotínico e trigonelina em 15 variedades de café do Brasil

1. Ácido nicotínico

Causas de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F
Localização	1	59,64	59,64	55,74++
Variedades	14	152,72	10,91	10,20++
Resíduo	14	14,98	1,07	
Total	29	227,34		

$F_{(1,14)}$ 1% = 8,86 Coeficiente de variação = 19,32% $F_{(14,14)}$ 1% = 3,70

2. Trigonelina

Causas de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F
Localização	1	1.412.453,00	1.412.453,00	111,21++
Variedades	14	862.763,70	61.625,98	4,85++
Resíduo	14	177.810,64	12.700,76	
Total	29	2.453.027,34		

$F_{(1,14)}$ 1% = 8,86 Coeficiente de variação = 10,13% $F_{(14,14)}$ 1% = 3,70

TABELA III

Teores de ácido nicotínico presentes em café verde, segundo vários pesquisadores
* Os resultados destes três trabalhos referem-se ao café brasileiro rotulado como "Santos".

Referência	Ácido nicotínico mg/100 g	Método empregado
Teply & col.[21]	17,0	Microbiológico (*Lact. arabinosus*)
*Hughes & Smith [11]	2,7	Químico
*Cravioto & col.[7]	1,2	Microbiológico (*Lact. arabinosus*)
Daum [9]	1,2 — 6,7	Microbiológico (*Lact. arabinosus*)
Bressani & Navarrete [3]	1,0	Microbiológico (*Lact. arabinosus*)
*Barbiroli [2]	3,0	Cromatográfico
Oliveira & col. (dados presentes)	6,7	Microbiológico (*Torula cremoris*)

TABELA IV

Teor de trigonelina em 15 variedades de café do Brasil

Variedades	Trigonelina (mg/100 g)			
	Semente	Casca e Polpa	Total	Médias
San Bernardo	847,20	353,80	1.201,00	600,50
Laurina	610,70	280,10	890,80	445,40
Sumatra	394,40	177,60	572,00	286,00
Mundo Novo (Cp-379-19)	327,70	179,90	507,60	253,80
Nacional	598,20	179,00	777,20	388,60
Caturra Vermelho	792,00	415,60	1.207,60	603,80
San Ramón	640,30	404,30	1.044,60	522,30
Purpuracens	871,10	519,70	1.390,80	695,40
Bourbon Vermelho	1.082,00	438,00	1.520,00	760,00
Amarelo de Botucatu	833,10	362,80	1.195,90	597,95
Cêra	674,50	229,60	904,10	452,05
Bourbon Amarelo de Jaú	846,30	251,40	1.097,70	548,85
Caturra Amarelo	811,60	263,00	1.074,60	537,30
Mundo Novo (Cp-376-A)	1.097,30	553,10	1.650,40	825,20
Murta	1.175,40	484,40	1.659,80	829,90

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARAÚJO, A. R. P.; LINS, M. & PORTELLA, A. — Teor de ácido nicotínico em várias amostras de café do Brasil. An. Inst. Quím. Univ. Recife. 1:57-63, 1963.

2. BARBIROLI, G. — Richerche con la termobilância sulla transformazione della trigonellina in ácido nicotinico nella tostatura industriale del café. *Ressegna Chim.*, 5:216-219, 1964.

3. BRESSANI, R. & NAVARRETE, D. A. — Niacin content of coffee in Central America. *Food Res.*, 24:344-351, 1959.

4. BRESSANI, R.; GÓMEZ-BRENES, R. & CONDE, R. — Cambios de la Composition química del grano y de la pulpa del café durante el processo de tostación, y actividad biológica de la niacina del café. *Arch. venez. Nutr.*, 12:93-105, 1962.

5. CAMARGO, R. & TELLES Jr., A. Q. — O café no Brasil, vol. 1. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, 47 p., 1953.

6. CARVALHO, A. — Variability of the Niacin content in Coffee. *Nature,* **194**: 1096, 1962.

7. CRAVIOTO, R. O.; GUZMAN, G. J. & SUAREZ, M. L. — Incremento del contenido de niacina (vitamina anti-pelagrosa) durante la torrefacción del café y su significado en el aporte de esta vitamina a la dieta. *Ciência,* **15**:24-26, 1955.

8. DAUM, M. G. — La niacina en el café y su importância nutricional en Venezuela. *Arch. venez. Nutr.,* **6**:61-70, 1955.

9. FOA, P. P. & GLICKERMAN, A. S. — On the Excretion of Nicotinic Acid following a test dose of Trigonelline. *Arch. Biochem.,* **11**:477-479, 1946.

10. GORTER, K. — "Coffee III". Annales: **372**: 237-246, 1910.

11. HUGHES, E. B. & SMITH, P. F. — The nicotinic acid content of coffee. *J. Soc. Chem. Ind.,* **65**:284-286, 1946.

12. JOSHI, J. G. & HANDLER, P. — Metabolism of Trigonelline. *J. biol. Chem.,* **237**: 3185-3188, 1962.

13. KIZAWA, K; OLIVEIRA, E. N. S.; CAMPOS, B. & ROCHA, R. A. — Dosagem microbiológica de ácido nicotínico. Estudo comparativo entre dois métodos. *Ci. e Cult.,* **21**: 516, 1969.

14. KREHL, W. A.; SARMA, P. S.; TEPLY, L. J. & ELVEHJEM, C. A. — Factors affecting the dietary niacin and tryptophan requerement of the growing rat. *J. Nutr.,* **31**:85--106, 1964.

15. MOORES, R. G. & GRENINGER, D. M. — Determination of Trigonelline in coffee. *Anal. Chem.,* **23**:327-331, 1951.

16. MOYER, A. W. & Du VIGNEAUD, V. — The structural specificity of choline and betaine in transmetilation. *J. biol. Chem.,* **23**:327-331, 1951.

17. NOTTBOHM, F. E. & MAYER, F. in MOORES, R. G. & GRENINGER, D. M. — Anal. Chem., **23**:327-331, 1951.

18. POLSTORFF, D. — The presence of betaine and choline in drugs containing caffeine and theobromine. Chem. Zentr. II: 2014, 1909.

19. SLOTTA, K. H. & NEISSER, D. — Chemistry of Coffee, II. A new method for determination of trigonelline. Berichte, **71B**: 1987-1990, 1938.

20. TEPLY, L. J. & PRIER, R. F. — Nutritional evaluation of coffee including Niacin biossay. *Agr. Food Chem.,* **5**:375-377, 1957.

21. TEPLY, L. J.; KREHL, W. A. & ELVEHJEM, C. A. — Studies on the Nicotinic Acid contents of Coffee. *Arch. Biochem.,* **6**: 139-149, 1944.

22. WILLIAMS, W. L. — Yeast microbiological method for determination of nicotinic acid. *J. biol. Chem.,* **166**:397-406, 1946.

23. WORK, S. H.; van SEVEREN, M. L. & ESCALON, L. — Informe preliminar del valor de la pulpa del café seca como substituto del maíz en el ración de vacas lecheras. El café de El Salvador, **16**:773-780, 1946.

Recebido para publicação em 1/2/1972.

Rev. Microbiol.
3(2):69-74, abril-junho, 1972

TRATAMENTO DE SEMENTES DE *BRASSICA OLERACEAE* var. *CAPITATA* COM ANTIBIÓTICOS E SUA AÇÃO EM *XANTHOMONAS CAMPESTRIS*

M. A. LEMOS (1), R. N. NEDER (2) & J. L. AZEVEDO (3)

RESUMO

Linhagem de *Xanthomonas campestris* sensível a aureomicina e estreptomicina e dois mutantes resistentes a cada um destes antibióticos foram inoculados em sementes tratadas com estes antibióticos. Foi estudada também a inibição destas linhagens por sementes tratadas. O mutante resistente a estreptomicina não foi inibido nem eliminado em sementes tratadas com este antibiótico. O mutante resistente a aureomicina foi inibido e eliminado por concentração de aureomicina iguais ou superiores a 16 μg/ml. Os resultados indicam que a aureomicina é um antibiótico efetivo contra a *X. campestris*. As linhagens mutantes mostraram-se virulentas e mantiveram os mesmos níveis de resistência inclusive após passagem pelo hospedeiro. O perigo do aparecimento a longo prazo de mutantes resistentes a auromicina é discutido.

INTRODUÇÃO

A podridão negra causada pela bactéria fitopatogênica *Xanthomonas campestris* é a principal doença que ocorre em crucíferas. Em nossas condições, principalmente após a introdução de repolhos híbridos japoneses que são extremamente susceptíveis à doença, ela tem causado prejuízos de monta. Como medidas de controle têm sido recomendadas a rotação de cultura, a introdução de variedades resistentes e o tratamento de sementes com antibióticos. Com relação a este último ponto, há sempre o perigo de aparecimento de mutantes resistentes aos antibióticos usados, à semelhança do que ocorre em bactérias patogênicas para o homem e animais [7].

O objetivo do presente trabalho foi o de a partir de mutantes resistentes a dois antibióticos, a aureomicina e a estreptomicina, inocular sementes e plântulas visando principalmente estudar o comportamento dos mesmos em relação ao tratamento das sementes, e, também seu grau de patogenicidade comparado com o da bactéria sensível original de onde os mutantes se originaram. A estabilidade da resistência nas linhagens mutantes quando em contacto com plântulas foi também estudada.

MATERIAL E MÉTODOS

Linhagem e sementes usadas. A linhagem de bactéria usada foi isolada de plantação de repolho híbrido de origem japonesa Shikidori, da Seção de Horticultura da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", em Piracicaba, Estado de São Paulo. Além da linhagem original que era inibida por concentrações a 2 μg/ml tanto de aureomicina como de estreptomicina, foram também usados os mutantes resistentes a 8 μg/ml de aureomicina e 2048 μg/ml de estreptomicina adicionados ao meio líquido. Tais mutantes serão designados por XC-aur^r e XC-str^r, respectivamente. A linhagem original, sensível aos dois antibióticos, será designada por XC. Os meios de cultura usados e os métodos empregados na obtenção dos dois

(1) Bolsista da CAPES, junto à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brasil
(2) Instituto Zimotécnico, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brasil
(3) Instituto de Genética, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brasil

mutantes já foram descritos em trabalhos anteriores por AZEVEDO [1], AZEVEDO & MENEZES [3], e AZEVEDO & col.[4]. Os antibióticos usados foram o sulfato de estreptomicina (Fontoura Wyeth, S.A.) e o cloridrato de clortetraciclina cristalina (Cyanamid Química do Brasil S.A.), os quais serão designados, em todo o transcorrer do trabalho, por estreptomicina e aureomicina, respectivamente. As soluções de antibióticos foram preparadas, momentos antes de serem usadas, por dissolução dos mesmos no solvente apropriado.

As sementes usadas foram as do híbrido Natsumaki Risô, suscetível à *X. campestris*.

Tratamento de sementes. As sementes foram sempre tratadas com água a 50°C por 30 minutos e deixadas secar ao ar em papel de filtro, por 24 horas. O tratamento de sementes por antibióticos seguiu o método descrito por KLISIEWICZ & POUND [8]. Para moderar a ação fitotóxica dos antibióticos as sementes foram mergulhadas, após o tratamento por 30 minutos, em solução de cloreto de cálcio 0,25M no caso da estreptomicina e em solução de fosfato de potássio monobásico 0,25M no caso da aureomicina.

Absorção de antibióticos pelas sementes e sua ação sobre a linhagem original e mutantes. A tubos com 20 ml de meio sólido, liquefeito a 47°C, foi adicionado 1 ml do inóculo, o meio foi vertido em placa e deixado solidificar. As sementes foram tratadas, como já descrito, com os dois antibióticos nas concentrações de 4; 8; 16; 32; 64; 128; 256; 512; 1024 e 2048 μg/ml. Com pinça esterilizada as sementes foram colocadas sobre o meio contendo as bactérias. Cada placa recebeu três sementes tratadas em diferentes concentrações e para cada tratamento e bactéria foram feitas três repetições. Sementes não tratadas com antibióticos foram usadas como controle.

Avaliação do comportamento de sementes inoculadas artificialmente com linhagens da bactéria. Após o tratamento com água a 50°C como já descrito, as sementes foram inoculadas com a bactéria sensível e os dois mutantes resistentes, mergulhando-as em culturas líquidas por 3 horas após o que, elas foram secas em papel de filtro ao ar, por 24 horas. As sementes foram em seguida colocadas com pinça esterilizada em placas de Petri contendo 20 ml de meio de cultura sólido. Três sementes foram colocadas por placa, e, feitas três repetições por tratamento. As placas foram incubadas a 28°C e observou-se a presença ou ausência de crescimento da bactéria até 18 dias após a colocação das sementes.

Preparo do solo. Plântulas cresceram em caixas de barro de 18 cm de comprimento e largura por 16 cm de altura. O solo consistiu de uma parte de terra roxa e uma parte de esterco de curral peneirado. Esta mistura foi sempre esterilizada em autoclave com bastante antecedência à sua utilização. Serviu como cobertura outra parte de esterco peneirado. Plântulas foram inoculadas em uma câmara úmida que consistia em cobrir as caixas dentro de casas de vegetação, com filmes de polietileno.

Inoculação das plântulas. A bactéria foi inoculada em frascos com 250 ml de meio líquido e incubada por 96 horas a 28°C. A seguir, diluiu-se em água destilada (1:1) e a suspensão foi inoculada por pulverização nas plântulas submetidas às condições da câmara úmida por 24 horas, após o que, as plântulas permaneceram na câmara úmida por mais 24-36 horas. Como inóculo foram usadas as duas linhagens mutantes XC-aur^r e XC-str^r além da linhagem XC. Foram usadas três caixas (60 plântulas) para cada linhagem. O critério de avaliação da severidade da doença foi o de TOKESHI [12] modificado por NEDER & col.[10] que consistiu em dar notas conforme a severidade da doença: Nota 0: plântulas sadias, sem sintomas externos ou internos. Nota 1: vasos coloridos na região do primeiro internódio sem outros sintomas visíveis. Nota 2: vasos coloridos até a altura da primeira folha com ao menos um folíolo amarelecido. Nota 3: vasos coloridos até a metade do comprimento do caule com duas ou mais folhas amarelecidas. Nota 4: vasos coloridos até próximo do ponteiro e maioria de folhas murchas com exceção do ponteiro. Nota 5: plantas mortas ou com vasos coloridos e folhas murchas até o ponteiro.

Reisolamento e caracterização das bactérias resistentes. Após a avaliação da severidade da doença, 20 plântulas doentes inoculadas com XC-aur^r e 20 plântulas doentes inoculadas com XC-str^r foram usadas para o isolamento do patógeno e as bactérias isoladas foram ensaiadas para resistência a 8 μg/ml de aureomicina e 2048 μg/ml de estreptomicina, respectivamente.

RESULTADOS

Inibição da bactéria sensível e mutantes resistentes pelas sementes tratadas com os antibióticos. Os resultados obtidos expressos pelos diâmetros dos halos de inibição estão

representados na Tabela I. Pelos resultados pode-se constatar que a linhagem XC já começou a mostrar inibição por sementes tratadas com concentrações de 8 μg/ml de estreptomicina e 4 μg/ml de aureomicina. O mutante XC-str^r não foi inibido por sementes em qualquer concentração usada enquanto que o mutante XC-aur^r foi inibido por sementes tratadas com concentrações iguais ou superiores a 16 μg/ml.

TABELA I

Inibição da linhagem sensível e linhagens resistentes a estreptomicina por sementes tratadas com diversas concentrações de antibióticos (média de 3 experimentos)

Concentração de antibiótico (μg/ml)	Halos de inibição (mm) sementes tratadas com:			
	Estreptomicina		Aureomicina	
	XC	XC-str^r	XC	XC-aur^r
0	0,0	0,0	0,0	0,0
4	0,0	0,0	1,5	0,0
8	2,6	0,0	2,8	0,0
16	2,8	0,0	5,4	3,8
32	3,0	0,0	6,5	5,2
64	3,3	0,0	9,0	8,0
128	3,8	0,0	10,2	8,6
256	4,6	0,0	12,0	9,0
512	7,6	0,0	12,8	11,0
1024	8,0	0,0	13,0	13,8
2048	12,2	0,0	15,7	17,3

Avaliação do comportamento de sementes inoculadas artificialmente com as linhagens XC, XC-str^r e XC-aur^r. Os resultados obtidos indicaram que enquanto a linhagem sensível (XC) foi eliminada, pois não apresentou crescimento nas placas onde foram colocadas sementes tratadas com as diversas concentrações de antibióticos usadas, o mutante XC-str^r apresentou crescimento a partir de sementes tratadas até pela concentração mais alta de estreptomicina usada. A linhagem resistente a aureomicina (XC-aur^r) cresceu em sementes tratadas até com concentração de 8 μg/ml mas não cresceu em concentrações superiores.

Avaliação da severidade da doença causada pelas linhagens XC, XC-str^r e XC-aur^r. Os resultados apresentados na Tabela II indicam que as três linhagens continuam patogênicas. A análise de variância apresentou diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade para os tipos de inóculos usados, mostrando-se a linhagem XC-aur^r mais patogênica que as outras duas linhagens usadas.

TABELA II

Severidade da doença em plântulas inoculadas com a linhagem sensível e linhagens resistentes a aureomicina e estreptomicina (médias de 3 repetições)

Inóculo	Porcentagem da severidade da doença
XC	73,0
XC-str^r	79,8
XC-aur^r	83,3

Reisolamento e caracterização dos mutantes resistentes a estreptomicina e aureomicina. As 20 linhagens de XC-str^r e as 20 linhagens de XC-aur^r continuaram resistentes a 2048 μg/ml e 8 μg/ml de estreptomicina e aureomicina, respectivamente, indicando que a resistência obtida "*in vitro*" manteve-se mesmo após a passagem pelo hospedeiro.

DISCUSSÃO

Sementes tratadas com antibióticos mostraram capacidade de inibir o crescimento da linhagem original sensível aos dois antibióticos. No entanto, o mutante resistente a estreptomicina não foi inibido nem nas mais altas concentrações de estreptomicina usadas no tratamento das sementes. A alta resistência do mutante XC-str^r mostra que a estreptomicina não pode ser indicada para o tratamento de sementes de repolho para o controle da *X. campestris*. Como demonstrado por DEMEREC [6] para várias espécies bacterianas e por AZEVEDO [1] e AZEVEDO & col.[4] especificamente para *X. campestris*, o modelo de resistência a estreptomicina é o "de um só passo" o que indica que o caráter é qualitativo. Assim, mutação em um único gene pode conferir, imediatamente após a mutação, resistência a altas doses de estreptomicina. Sendo a frequência de mutantes resistentes a estreptomicina em *X. campestris* de 1 em 1 × 10^{11} bactérias [1] é de se supor que espontaneamente mutantes resistentes possam aparecer tornando o tratamento com estreptomicina ineficaz. Aliás, resultados semelhantes foram obtidos por KLISIEWICZ & POUND [8] quando verificaram que o tratamento de sementes de repolho com estreptomicina não eliminou mutantes resistentes.

Com relação a aureomicina, o mutante XC-aur^r foi inibido por sementes tratadas em concentrações superiores a 16 μg/ml. Isto indica que as dosagens, atualmente recomendadas na prática para tratamento de se-

mentes de repolho (1.000 μg/ml, SUTTON & BELL [11]), são mais do que suficientes para eliminar mesmo os mutantes resistentes. No caso da *X. campestris* e de outras bactérias o modelo de resistência é o chamado de "múltiplos passos" o que significa que o caráter é quantitativo, muitos genes estando envolvidos para conferir resistência a altas doses deste antibiótico. No entanto, convém salientar que a resistência natural da *X. campestris* parece estar aumentando provavelmente por seleção de mutantes mais resistentes devido ao uso constante de aureomicina na tratamento de sementes. Assim, pelos dados de AZEVEDO [1] obtidos em 1960 e publicados em 1961, a resistência natural da bactéria foi de 0,02 μg/ml, e a maior resistência obtida após a utilização da técnica da placa gradiente de BRYSON & SZIBALSKI[5], em 7 transferências foi de 1 μg/ml[2]. No presente trabalho, a resistência natural da bactéria foi de 1 μg/ml e um mutante resistente a 8 μg/ml foi obtido em apenas uma transferência em meio com aureomicina. Embora os níveis de resistência ainda estejam muito longe dos níveis usados em tratamento de sementes, pode-se esperar que no futuro, problemas possam advir pela presença de mutantes altamente resistentes. Talvez possa-se pensar desde já em uma associação de aureomicina mais outro antibiótico para que a possibilidade do aparecimento de mutantes resistentes seja diminuida ainda mais. Embora não tenham sido feitos estudos posteriores com o mutante resistente à aureomicina, usada no presente trabalho, pode-se inclusive supor que fatores epissômicos, que confiram alta resistência a drogas, estejam envolvidos à semelhança do que foi descrito para enterobacteriaceas por diversos autores [14].

Sementes inoculadas artificialmente com a linhagem sensível e mutantes resistentes confirmaram o fato de que não houve eliminação do mutante resistente à estreptomicina, mesmo após o tratamento de sementes com este antibiótico, e que o mutante resistente à aureomicina só foi eliminado a partir de 16 μg/ml de aureomicina no tratamento de sementes.

Inoculação de plântulas com a linhagem sensível e com os mutantes resistentes revelou que tanto a linhagem original como os mutantes foram virulentos. Inclusive a linhagem XC-aur^r mostrou ser a que mais severos sintomas causou nas plântulas. KLISIEWICZ & POUND [8] já haviam mostrado que mutantes resistentes a estreptomicina obtidos em *X. campestris* mantinham-se virulentos após até 7 transferências nas plântulas. No entanto, outros autores citam casos em que resistência a uma determinada droga causa perda de virulência [9, 13].

Em nosso caso este efeito pleiotrópico não foi verificado, pelo contrário, talvez uma maior patogenicidade associou-se à resistência, especialmente no caso da aureomicina. Também o reisolamento dos mutantes das plântulas atacadas revelou que o nível de resistência manteve-se constante mesmo após a passagem pelo hospedeiro.

SUMMARY

Seed treatment of Brassica *oleraceae* var. *capitata* with antibiotics and their action in *Xanthomonas campestris*.

A non-resistant strain, a streptomycin resistant strain and a aureomycin resistant strain of *Xanthomonas campestris* were studied in relation to the treatment of seeds of *Brassica oleraceae* var. *capitata* with antibiotics. The streptomycin resistant strain was neither inhibited nor eliminated from seeds treated with the drug. The aureomycin resistant strain was however, inhibited and eliminated from seeds treated with concentrations of aureomycin higher than 16 μg/ml. The results show that aureomycin is an effective antibiotic against *X. campestris*. The mutant strains were virulent and mantained the same levels of resistance even after transfer through the host. The danger of the appearance of aureomycin resistant strains is discussed.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Dr. Marcilio Dias, chefe do Setor de Melhoramento de Hortaliças do Instituto de Genética, ESALQ, e ao Dr. Toshiaki Kimoto da Faculdade de Agronomia de Botucatu pelas sementes fornecidas. Agradecimentos são também devidos à CAPES pelos recursos fornecidos a um de nós (M.A.L.).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AZEVEDO, J. L. — Resistência e mutação de *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson com relação a alguns antibióticos. Tese de Doutoramento. ESALQ. Universidade de São Paulo, 48 p., 1961.

2. AZEVEDO, J. L. — Mutantes resistentes a antibióticos em *Xanthomonas campestris*. *An. Esc. Super. Agr. "Luiz de Queiroz"*, **20**: 149-159, 1963.

3. AZEVEDO, J. L. & MENEZES, T. J. B. — Resistência de *Xanthomonas campestris* com relação a tilosina e vancomicina. *An. Esc. Super. Agr. "Luiz de Queiroz"*, **23**:188-194, 1966.

4. AZEVEDO, J. L.; NEDER, R. N. & MENEZES, T. J. B. — Comportamento "in vitro" de uma bactéria fitopatogênica frente a diversos antibióticos. *An. Esc. Super. Agr. "Luiz de Queiroz"*, **22**:61-79, 1965.

5. BRYSON, V. & SZIBALSKI, W. — Microbial Selection. *Science*, **116**:45-51, 1952.

6. DEMEREC, M. — Origin of bacterial resistance to antibiotics. *J. Bact.*, **56**:63-74 1948.

7. GURGEL, J. T. A. & AZEVEDO, J. L. — Resistência de microrganismos aos antibióticos. *In* "Antibióticos" C. S. Lacaz (Editor) Editora Univ. São Paulo e Ed. Savier, São Paulo. p. 322-347, 1965.

8. KLISIEWICZ, J. M. & POUND, G. S. — Studies on control of black rot of crucifera by treating seeds with antibiotics. *Phytopatology*, **51**:495-500, 1961.

9. KULYOVS'KA, M. D. — Development of resistance in *Erwinia carotovora* (Jones) Holland and *Xanthomonas campestris* (Pam.) Dowson to thiosulfate ethers. *Mikrobiol. Zh. A. N. U. R. S. R.*, **25**:58-64, 1963.

10. NEDER, R. N.; DIAS, M. S.; VENCOVSKY, R. & IKUTA, H. — Ensaio de virulência de 33 isolamentos de *Fusarium oxysporum f. lycopersici* Snyder & Hansen. *XVI Reunião Anual da Soc. Bras. Progr. Ciência.* 1964.

11. SUTTON, M. D. & BELL, W. — The use of aureomycin as a treatment of swede seed for the control of blackrot (*Xanthomonas campestris*). *Plant Dis. Rep.*, **38**:547-552, 1954.

12. TOKESHI, H. — Murcha de *Fusarium* em tomateiro. Estudo da variabilidade do patógeno e hospedeiro. Tese de livre-docência, E. S. A. "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 64 p., 1966.

13. TROUTMAN, J. L. — Development of resistance to streptomycin by *Pseudomonas tabaci*. *Phytopathology*, **49**: 553, 1959.

14. WATANABE, T. — Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bact. Rev.*, **27**:87-115, 1963.

Recebido para publicação em 20/1/1972.

Rev. Microbiol.
3(2):75-78, abril-junho, 1972

OCCURRENCE OF ATYPICAL MYCOBACTERIA IN THE LYMPH NODES OF APPARENTLY HEALTHY SLAUGHTERED CATTLE IN SÃO PAULO, BRAZIL

A. F. Pestana de CASTRO (1) & Hisashi NEMOTO (2)

SUMMARY

Two hundred and fifty two mesenteric and mediastinic lymph nodes of apparently healthy bovine from São Paulo, Brazil, were examined for the presence of atypical mycobacteria. Nineteen strains were isolated as follows: group II (3 strains), group III (14 strains) and group IV (3 strains).

Among group II strains one was *M. scrofulaceum* whereas among group III 9 were *M. intracellulare* and the remaining belonging to *M. terrae* complexor were not identified. Serological tests according to Schaefer's technique were carried out with some of the pathogenic strains belonging to Runyon's group III and the following serological types were identified: III b, Dent, VII, Watson, VI and Chance. As far as we know this is the first report on serological typing * of *M. intracellulare* isolated in Brazil. Strains belonging to group IV were considered as saprophytic based upon the results of their cultural and biochemical properties.

INTRODUCTION

Mycobacterium bovis is the most common isolate from cases of tuberculosis in cattle however much attention has been given in other countries to the presence of atypical mycobacteria among bovine [6].

As far as human beings are concerned there are several papers demonstrating that atypical mycobacteria are very important on account of pulmonary and extrapulmonary diseases which may be caused by them [4]. Actually the four Runyons's group may be involved but it seems that groups I and III ought to be viewed with more respect mainly the latter, where it is included the avium-Battey group whose infections are very difficult to be treated [5].

Concerning mycobacterial infection of cattle many papers have been published in other countries [3] showing that not only Runyon's group III infections may happen as well as others due to mycobacteria belonging to the remaining groups. In this country except a very recent communication on the occurrence of *M. kansasi* and *M. intracellulare* (Battey-bacilli) among tuberculous bovine [2] nothing has been published yet. However in this paper the author did not mention serological typing of the isolates.

The purpose of this work is to report the isolation of mycobacteria other than *M. bovis* with special reference to the serological classification of some strains of *M. intracellulare* isolated in São Paulo, Brazil from the lymph nodes of apparently healthy slaughtered cattle.

MATERIAL AND METHODS

Two hundred and fifty two mediastinic and mesenteric lymph nodes of apparently healthy cattle were received from Swift Slaughterhouse (Utinga, São Paulo, Brazil) in the second half year of 1971.

With to the exception of 3 materials with characteristical lesions from which strains of *M. bovis* could be isolated, the remaining

(1) Veterinarian of the "Instituto Biológico", SP, Brazil and Fellow of the "Conselho Nacional de Pesquisas"
(2) National Institute of Animal Health, Kodaira, Tokyo, Japan

were all normal and no macroscopic lesions could be seen.

During collection of the lymph nodes special procedures were followed to avoid external contamination. Nevertheless, before any bacteriological examination all lymph nodes were immersed very rapidly in boiling water in order to decrease the possibility of isolating contaminants from the environment. The materials were triturated in a sterile mortar and enough saline was then added to make approximately 10% suspensions.

From these, 20 ml aliquots were taken off and treated according to the original Petroff's technique [1]

Four tubes with Lowestein-Jensen medium an one with Sula's medium were used for culturing the materials. One tube of Lowestein-Jensen medium and the Sula's liquid medium were uncubated at 37°C and the remaning at 22°C, 33°C and 42°C during at least 3 months. The inoculated media were observed daily and all suspected cultures were examined bacterioscopically by Ziehl-Neelsen staining. Thereafter all strains of mycobacteria isolated were examined by the methods recommended by Runyon & col.[7]. Formamidase [11] and urease activity, salicylate degradation and Boinicke's amidases tests [10] were also included whenever necessary.

When dealing with *M. intracellulare* serological typing was performed according to Schaefer's method [8].

RESULTS

From the examined materials were isolated nineteen strains of atypical mycobacteria. Three strains belonged to Runyon's group IV because of formamidase activity and growth on nutrient agar. However they were considered saprophytic on account of the negative results in the arylsulfatase, nitrate reduction and salicylate degradation tests [7,10].

The other sixteen strains were all negative in the formamidase test and belonged either to group II (3 strains) or group III (14 strains).

The main tests and the respective results which allowed us the classification of these strains are presented in table I.

Among 9 strains which were classified as *M. intracellulare* and represented 3,57% of the isolates, the most relevant findings are related to the serological classification according to Schaefer's method. Strain B51 was classified as serotype III, B125 as serotype Dent, B143 as serotype VII, B153 as serotype VI, B183 as serotype Watson and B200 as serotype Chance. The remaining two strains of *M. intracellulare* have not been classified yet as far as serological typing is concerned.

Among the strains isolated in group II one was classified as *M. scrofulaceum* whereas the other two were classified as *M. gordonae* and *M. flavescens,* respectively.

DISCUSSION

Reports from other countries showed very clearly that tuberculosis in cattel may be associated with atypical mycobacteria mainly *M. intracellulare.* In regard to swine the matter seems to be more serious and several papers demonstrate that these mycobacteria may be isolated very often from tuberculous lesions [6, 9].

On the other hand among bovine a relative absence of caseation necrosis produced by Battey bacilli has been noted by others [6]. This fact may explain why no macroscopic lesions could be seen in the lymph nodes from which 9 strains of *M. intracellulare* were isolated by us.

Although *M. intracellulare* may occur sometimes in clinical specimens as non-pathogens [7] two aspects must be considered. One is related to the possibility of infection by these mycobacteria to induce avian tuberculin sensitivity in cattle when the comparative test is used. The other fact is associated with the capacity of bovine to play an importante role as source of infection of mycobacteriosis in men caused by *M. intracellulare,* one of the most frequent etyological agents found in human cases of tuberculosis, when atypical mycobacteria are involved [4].

M. scrofulaceum has been pointed out as responsible for cervical adenitis in children [7]. However not much may be commented on the significance of only one isolate among the two hundred and fifty two specimens examined.

Nevertheless the occurrence of these potential pathogens for men and animals as *M. intracellulare* and *M. scrofulaceum* fully justify the continuity of this sort of research.

As far as we know this is the first report in Brazil on the study of *M. intracellulare* typed serologically according to Schaefer's method.

TABLE I

Strains of mycobacteria (groups II and III) isolated from the lymph nodes of bovine in São Paulo, Brazil. Results of the most important tests which allowed their classification

Strains	pigmentation	formamidase	arylsulfatase	nitrate reduction	tween 80 hidrolysis	urease	nicotinamidase	pyrazinamidase	Classification	Serological typing
B8	SC	−	+	+	+	+	+	+	*M. flavescens*	NT
B138	SC	−	−	−	+	−	−	−	*M. gordonae*	NT
B153a	SC	−	−	−	−	+	+	+	*M. scrofulaceum*	NT
B51	NC	−	±	−	−	−	+	+	*M. intracellulare*	IIIb
B125	NC	−	−	±	−	−	+	+	*M. intracellulare*	Dent
B143	NC	−	−	±	−	−	+	+	*M. intracellulare*	VII
B148	NC	−	−	−	−	−	+	+	*M. intracellulare*	not identified
B153b	NC	−	−	−	−	−	+	+	*M. intracellulare*	VI
B183	NC	−	−	−	−	−	+	+	*M. intracellulare*	Watson
B200	NC	−	−	−	−	−	+	+	*M. intracellulare*	Chance
B208	NC	−	−	−	−	−	+	+	*M. intracellulare*	not identified
B214	NC	−	−	−	−	−	+	+	*M. intracellulare*	not identified
B5	NC	−	+	+	+	−	±	±	*M. triviale*	
B58	NC	−	+	+	+	−	±	±	*M. triviale*	
B62	NC	−	+	+	+	−	±	±	*M. triviale*	not used routinely
B26	NC	−	±	+	+	+	±	±	not identified	
B129	NC	−	±	+	+	+	±	±	not identified	

Key: SC — scotochromogenic. NC — non chromogenic. + — positive. − — negative. ± — weak or doubtful reaction. NT — not tested.

RESUMO

Ocorrência de micobactérias em nódulos linfáticos de bovinos aparentemente normais abatidos em São Paulo, Brasil.

Duzentos e cincoenta e dois gânglios linfáticos mesentéricos e mediastínicos de bovinos aparentemente normais abatidos em São Paulo, foram examinados para se verificar a ocorrência de micobactérias atípicas. Foram isoladas 19 amostras destes microrganismos a saber: grupo II (3 amostras), grupo III (14 amostras) e grupo IV (3 amostras). Entre as amostras do grupo II uma foi classificada como *M. scrofulaceum* enquanto entre as do grupo III 9 eram *M. intracellulare* e as restantes pertenciam ao grupo de micobactérias relacionadas com o *M. terrae* ou não foram identificadas. Com as amostras do grupo III consideradas como patogênicas foram realizados testes sorológicos de acordo com o método preconizado por Schaefer. Seis amostras de *M. intracellulare* foram classificadas como sorotipos III b, Dent, VII, Watson, VI e Chance. Tanto quanto saibamos é este o primeiro relato sobre a classificação sorológica de amostras de *M. intracellulare* isoladas no Brasil.

As amostras isoladas pertencentes ao grupo IV de Runyon foram consideradas como saprófitas com base em suas propriedades culturais e bioquímicas.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Dr. Werner B. Schaefer for the confirmation of the serological tests and for the serological typing of some strains which were not identified by us.

REFERENCES

1. BIER, O. — Microbiologia e Imunologia. Edições Melhoramentos, 991 p., 1966.

2. CORRÊA, M. C. — *Mycobacterium*. Classificação de amostras isoladas de bovinos e suínos e do homem. Tese para doutoramento. Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, 1972.

3. FELDMAN, W. H. — Avian tubercle bacilli and other mycobacteria. Their signification in the eradication of bovine tuberculosis. *Amer. Rev. resp. Dis.*, **81**:666-673 1961.

4. HOBBY, L. G.; REDMOND, W. B.; RUNYON, E. H.; SCHAEFER, W. B.; WAYNE, L. G. & WHICHELHAUSEN, H. R. — A study on pulmonary disease associated with mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis*: Identification and characterization of the mycobacteria. *Amer. Rev. resp. Dis.*, **95**:954-971, 1967.

5. KUBIN, M.; DVORSKY, K.; EINEROVA, R.; MEZENSKY, L.; FRANC, K. & MATEJKA, M. — Pulmonary and non-pulmonary disease in human due to avium mycobacteria. *Amer. Rev. resp. Dis.*, **94**: 31-39, 1966.

6. RUNYON, E. H. — *Mycobacterium intracellulare. Amer. Rev. resp. Dis.*, **95**: 861-865, 1967.

7. RUNYON, E. H.; KUBICA, G. P.; MORSE, W. C.; SMITH, R. C. & WAYNE, L. G. *in* BLAIR, E. J.; LENNETTE, E. H. & TRUANT, J. D. — Manual of Clinical Microbiology. Edited by the American Soc. for Microbiology, 727 p. 1970.

8. SCHAEFER, W. B. — Type specificity of atypical mycobacteria in agglutination and antibody absorption tests. *Amer. Rev. resp. Dis.*, **96**: 1165-1168, 1967.

9. TAMMEMAGI, L. & SIMMONS, G. G. — BCG vaccination against Battey-type mycobacteriosis in pigs. *Aust. vet. Jour.*, **46**: 284-288, 1970.

10. TSUKAMURA, M. — Identification of Mycobacteria. *Tubercle*, **48**: 311-338, 1967.

11. ZYKOV, M. P. & ROULET, H. — Non tuberculosis mycobacteria in Africa. Its evaluation and practical application. *Bull. Wld Hlth Org.*, **37**: 947-951, 1967.

Recebido para publicação em 26/5/1972.

Rev. Microbiol.
3(2):79-84, abril-junho, 1972

DOSAGENS MICROBIOLÓGICAS DE VITAMINAS EM PEIXES E CRUSTÁCEOS. I — ÁCIDO FÓLICO, COLINA E VITAMINA B_{12}

Silvio RIBEIRO (1) &Isaac ROITMAN

RESUMO

O teor de algumas vitaminas foi determinado em vários peixes e crustáceos, através da utilização de métodos microbiológicos. *Lactobacillus casei* foi utilizado para a dosagem de ácido fólico, *Torulopsis pintolopesii* para colina e *Euglena gracilis* para a dosagem de vitamina B_{12}.

As porções comestíveis (filés) dos seguintes peixes e crustáceos foram estudadas, quanto ao conteúdo das 3 vitaminas, antes e após sofrerem cozimento: Sardinha (*Sardinella aurita*); Corvina (*Micropogon furnieri*); Goete (*Cynoscion petranus*); Pescada foguete (*Macrodon ancylodon*); Pescada cambucu (*Cynoscion virescens*); Camarão rosa (*Penaeus brasiliensis*) e Camarão sete barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*).

Na maioria dos pescados estudados, o processo de cozimento causou uma perda de vitaminas. No entanto, em sardinha e camarão sete barbas, o material submetido ao cozimento apresentou um teor de colina superior ao produto "in natura". Esses resultados foram discutidos na base da degradação enzimática de colina. Os resultados obtidos foram comparados com os anteriormente relatados na literatura.

INTRODUÇÃO

O conhecimento do valor nutritivo de alimentos é fundamental para qualquer planejamento que vise contribuir para a melhoria da alimentação de uma população. Os métodos de dosagens microbiológicas, pela sua alta especificidade e sensibilidade, são indicados para a determinação de vitaminas em alimentos. Os estudos feitos nesse sentido apresentam, na maioria das vezes, interesse regional, pois são analisados os produtos de maior consumo por parte de uma determinada comunidade. Vários autores [8-13, 18], estudaram o conteúdo de vitaminas em animais marinhos.

É limitada a literatura relativa a estudo do valor nutritivo de produtos do mar realizados no Brasil. Alguns autores estudaram a composição química, principalmente determinando proteinas, lipídios e sais minerais. SILVA & col.[14] frisam a existência de uma lacuna quanto ao conhecimento do teor de vitaminas em peixes e crustáceos consumidos pelos brasileiros.

No presente trabalho, o teor de ácido fólico, colina e vitamina B_{12} foram determinados, através de métodos microbiológicos em peixes e crustáceos consumidos pela população da região sul do Brasil. Visamos preencher uma lacuna e acreditamos que nosso trabalho possa trazer contribuições aos programas de suplementação alimentar de populações com deficiências alimentares.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de pescados — Os peixes e crustáceos, empregados no presente trabalho, foram cedidos pelo Entreposto de Pesca de Santos. A classificação do material utilizado foi feita com auxílio dos técnicos da Divisão de Pesca Marítima de Santos. As seguintes espécies foram utilizadas: Sardinha verda-

Trabalho realizado no Instituto de Microbiologia da U.F.R.J., com auxílios do Conselho Nacional de Pesquisas e Conselho de Pesquisas da U.F.R.J.
(1) Professor Assistente do Instituto Bio-médico da U.F.F. Bolsista da CAPES
(2) Professor Adjunto do Instituto de Microbiologia da U.F.R.J.

deira (*Sardinella aurita*, Cuvier & Valenciennes, 1847); Corvina (*Micropogon furnieri*, Desmarest, 1822; Jordan, 1884); Goete (*Cynoscion petranus*, Ribeiro, 1915; Lara, 1948); Pescada foguete (*Macrodon ancylodon*, Bloch, 1801, Jordan & col., 1930);; Pescada cambucu (*Cynoscion virescens*, Cuvier, 1830; Jordan & Evermann, 1898); Camarão rosa (*Penaeus brasiliensis*, Latreille, 1817); Camarão sete barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*, Heller, 1862).

Preparo das amostras — De cada espécie estudada foram separados os filés, no mínimo de 10 desses exemplares, sendo uma parte submetida ao cozimento em água a 100°C por 15 minutos. Tanto a porção crua como a cozida foram moídas em moedor elétrico e conservadas em frascos de boca larga a −20°C até a sua utilização nas experiências.

Dosagem microbiológica de ácido fólico — Microrganismo utilizado: *Lactobacillus casei* (ATCC-7469), recebido do Dr. Herman Baker do New Jersey College of Medicine and Dentistry, Jersey City, U.S.A. A dosagem e o tratamento das amostras foram feitas segundo Baker & Frank [1]. Os resultados foram expressos em mg de ácido fólico/100 g de material seco.

Dosagem microbiológica de colina — Microrganismo utilizado: *Torulopsis pintolopesii* 2616, amostra proveniente do Central Bureau Voor Schimmelcultures (C.B.S.). A dosagem bem como o tratamento das amostras foram feitas segundo CURY & col.[6] para a determinação de colina total. Os resultados foram expressos em mg de colina/100 g de material seco.

Dosagem microbiológica de vitamina B_{12} — Microrganismo utilizado: *Euglena gracilis*, recebida do Dr. Herman Baker. A dosagem foi feita segundo BAKER & FRANK [1] enquanto que o tratamento das amostras foi feito segundo KANASAWA & col.[10]. Os resultados foram expressos em μg de vitamina B_{12}/100 g de material seco.

RESULTADOS

Os resultados obtidos foram expressos segundo a distribuição de cada vitamina estudada nos produtos analisados.

O maior teor de ácido fólico foi encontrado em pescada cambucu. Nos demais produtos, a quantidade de ácido fólico estimada foi menor. Através do processo de cozimento, verificou-se uma perda da vitamina em todos os produtos estudados. A sardinha apresentou a menor concentração de ácido fólico, sendo o produto que sofreu maior perda no cozimento (Tabela I).

TABELA I

Teor de ácido fólico em peixes e crustáceos

Espécies	mg de ácido fólico/100 g material seco	
	Cru	Cozido
Sardinella aurita (sardinha)	0,042* (0,029/0,051)**	0,021 (0,018/0,027)
Micropogon furnieri (corvina)	0,050 (0,046/0,051)	0,041 (0,028/0,048)
Cynoscion petranus (goete)	0,113 (0,104/0,118)	0,076 (0,049/0,099)
Macrodon ancylodon (pescada foguete)	0,175 (0,140/0,206)	0,095 (0,079/0,106)
Cynoscion virescens (pescada cambucu)	0,223 (0,165/0,270)	0,172 (0,124/0,251)
Penaeus brasiliensis (camarão rosa)	0,074 (0,064/0,079)	0,053 (0,034/0,079)
Xiphopenaeus kroyeri (camarão sete barbas)	0,089 (0,084/0,093)	0,075 (0,070/0,080)

* Resultados referentes a média de 4 experiências
** Valores máximos e mínimos encontrados nas dosagens

TABELA II

Teor de colina em peixes e crustáceos

Espécies	mg de colina/100 g material seco	
	Cru	Cozido
Sardinella aurita (sardinha)	33 * (11/95)**	191 (180/198)
Micropogon furnieri (corvina)	159 (134/182)	138 (103/158)
Cynoscion petranus (goete)	148 (110/177)	142 (122/161)
Macrodon ancylodon (pescada foguete)	117 (100/140)	109 (98/117)
Cynoscion virescens (pescada cambucu)	114 (92/149)	57 (45/73)
Penaeus brasiliensis (camarão rosa)	138 (121/158)	135 (111/151)
Xiphopenaeus kroyeri (camarão sete barbas)	156 (137/172)	218 (193/253)

* Resultados referentes a média de 4 experiências
** Valores máximos e mínimos encontrados nas dosagens

TABELA III

Teor de vitamina B_{12} em peixes e crustáceos

Espécies	μg de vitamina B_{12}/100 g material seco	
	Cru	Cozido
Sardinella aurita (sardinha)	17,50* (16,9/18,1) **	8,83 (8,45/9,27)
Micropogon furnieri (corvina)	1,31 (1,28/1,34)	1,21 (1,18/1,25)
Cynoscion petranus (goete)	11,25 (11,1/11,4)	7,50 (7,10/7,90)
Macrodon ancylodon (pescada foguete)	3,25 (3,05/3,45)	2,80 (2,70/2,90)
Cynoscion virescens (pescada cambucu)	6,57 (6,40/6,74)	2,75 (2,70/2,80)
Penaeus brasiliensis (camarão rosa)	1,98 (1,82/2,14)	0,97 (0,90/1,05)
Xiphopenaeus kroyeri (camarão sete barbas)	10,40 (10,0/10,8)	5,60 (5,40/5,80)

* Resultados referentes a média de 3 experiências
** Valores máximos e mínimos encontrados nas dosagens

Dos pescados estudados, a corvina apresentou maior teor de colina. Através do processo de cozimento, observou-se a baixa do teor da vitamina nos seguintes pescados: corvina, goete, pescada foguete, pescada cambucu e camarão rosa. A queda mais acentuada verificou-se na pescada cambucu, com cerca de 50% de perda. Valores maiores no produto cozido foram obtidos para sardinha e camarão sete barbas (Tabela II).

O maior teor de vitamina B_{12} foi encontrado em sardinha. Através do processo de cozimento, observou-se a perda da vitamina em todos os produtos estudados. A queda mais acentuada verificou-se na pescada cambucu, com cerca de 58% de perda (Tabela III).

DISCUSSÃO

Poucos são os trabalhos encontrados na literatura em que o ácido fólico é estimado em produtos do mar. LOUGHLIN & TEERI [11], determinando o teor de ácido fólico através do método microbiológico com a utilização de *Streptococcus lactis* em peixes, crustáceos e moluscos, encontraram, para a maioria dos produtos analisados, um teor da vitamina menor que os obtidos no presente trabalho, sendo o maior valor encontrado no halibu (0,063 mg%). Os teores de ácido fólico, por nós obtidos, são próximos dos valores determinados em carnes bovinas e suinas [17].

O teor de colina, nos peixes e crustáceos estudados, variou de 33 a 159 mg/100 g de material seco, sendo que, com exceção da sardinha e camarão sete barbas, todos os outros produtos apresentaram uma perda da vitamina que variou de 3 a 50% (Tabela II). Nossos resultados foram superiores aos obtidos por TAKADA & NISHIMOTO [15], que determinaram a quantidade de 5 mg% de colina em cavala e 7 mg% em sardinha. No entanto, nossos valores foram menores do que os encontrados em vários peixes [12]. Por sua vez, nosos resultados coincidem com os de GRIFFITH & NYC [8], relativos ao conteúdo de colina em truta e cioba. O maior teor de colina encontrado na sardinha e no camarão sete barbas submetidos ao cozimento, em relação ao teor do produto cru, pode estar relacionado com a formação de óxido de trimetilamina e trimetilamina por ação enzimática a partir de colina. O nível de trimetilamina tem sido utilizado como critério de deterioração de peixes [7]. A formação de trimetilamina foi demonstrada em peixes de água doce e salgada como resultante da degradação de colina [15, 16]. Em outros produtos marinhos, lagostas e siris, foi demonstrado, pela utilização de colina-C^{14}, que esse composto era precurssor de óxido de trimetilamina [2-5]. Os resultados, obtidos na sardinha e camarão sete barbas, podem ser explicados pela degradação enzimática de colina, da mesma forma que ocorre em certos animais marinhos. O prévio cozimento do material analisado inativaria o sistema enzimático responsável pela degradação de colina, resultando como consequência, a detecção de valores maiores dessa vitamina no material cozido.

A vitamina B_{12} estimada variou de 1,31 a 17,5 μg/100 g de material seco, sendo que o processo de cozimento causou perda em todos os produtos estudados. MARCH & col.[12], estudando o teor de vitamina B_{12} em peixes, reportaram valores que variaram entre 7,1 a 58,8 μg/100 g de material seco, sendo que, de maneira geral esses resultados foram maiores que os obtidos no presente trabalho. Os teores de vitamina B_{12}, estimado com *Lactobacillus leichmannii*, em peixes e crustáceos foram porém mais baixos e variaram entre 0,3 a 5,1 μg/100 g de material seco [18]. Em algas marinhas o teor dessa vitamina, estimada também com *L. leichmannii* [10], situou-se dentro da faixa por nós obtida. Nossos resultados também coincidem com os relatados por ROSENTHAL [13], que situam os peixes e crustáceos como alimentos de teores intermediários de vitamina B_{12}, juntamente com carnes e laticínios.

A maioria dos produtos analisados sofrem uma perda no teor de ácido fólico, colina e vitamina B_{12}, através do cozimento. Esse fato deve ser levado em consideração nos programas de alimentação, quando peixes e crustáceos são utilizados e onde esses produtos são submetidos ao aquecimento. A aplicação de métodos microbiológicos de dosagens de vitaminas, como os empregados no presente trabalho, podem contribuir consideravelmente para o conhecimento do valor nutritivo de alimentos.

SUMMARY

Microbiological assays of vitamins in fishes and crustaceans. I - Folic acid, choline and vitamin B_{12}.

The vitamin contents of several different fishes and crustaceans were determined. Microbiological methods were used for the assay of the following vitamins: folic acid, choline and vitamin B_{12}. The eatable portions of the following fishes and crustaceans were studied, before and after cooking: 1. Sardine (*Sardinella aurita*), 2. Croaker (*Micropogon furnieri*), 3. Weakfish (*Cynoscion petranus*), 4. Sea-trout (*Macrodon ancylodon*), 5. Sea-trout (*Cynoscion virescens*), 6. Shrimp (*Penaeus brasiliensis*) and 7. Shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri*).

Lactobacillus casei was used for the folic acid assay; *Torulopsis pintolopesii* for choline and *Euglena gracilis* for the vitamin B_{12} assay. After cooking the majority of the studied specimens showed a decrease in the content of vitamins. Sardine and shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri*), however, showed an increase in choline after being cooked. These results are tentatively interpreted as due to the enzymatic degradation of choline to trimethylamine. The results obteined in the present work were compared with those reported in the literature.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAKER, H. & FRANK, O. — Clinicial Vitaminology, 198 p., John Wiley & Sons, New York, 1968.

2. BILINSKI, E. — Biossynthesis of trimethylamonium compounds in aquatic animals. I — Formation of trimethylamine oxide and betaine from C^{14} labelled compound by lobster (*Homarus americanus*). *J. Fish. Res. Board Can.*, **17**:895-902, 1960.

3. BILINSKI, E. — Biossynthesis of trimethylamonium compounds in aquatic animals. II — Role of betaine in the formation of trimethylamine oxide by lobster (*Homarus americanus*). *J. Fish. Res. Board Can.*, **18**: 285-286, 1961.

5. BILINSKI, E. — Biossynthesis of trimethylamonium compounds in aquatic animals. IV — Precursor of trimethylamine oxide and betaine in marine teleosts. *J. Fish. Res. Board Can.*, **21**: 765-771, 1964.

6. CURY, A.; OLIVEIRA, E. N. S.; TRAVASSOS, L. R. & CRUZ, F. S. — A new microbiological method for choline assay. *An. Microbiol.* (Rio de J.), **13**: 11-24, 1965.

7. DYER, W. J. & MOUNSEY, Y. A. — Amines in fish muscle. II — Development of trimethylamine and other amines. *J. Fish. Res. Board Can.*, **6**: 359-367, 1945.

8. GRIFFITH, W. H. & NYC, J. F. F. *in* W. H. SEBRELL Jr. & R. S. HARRIS, eds., The Vitamins, vol. III, Academic Press, New York, p. 2-155, 1971.

9. JAFFÉ, W. G.; NOLBERGA, B.; EMBDEN, C.; GARCIA, S.; OLIVARES, H. & GROSS, M. — Composicion de pescados venezolanos. *Arch. venez. Nutr.*, **7**: 163-166, 1956.

10. KANASAWA, A.; SAITO, A. & IDLER, D. R. — Vitamins B in Dulse (*Rhodymenia palmata*). *J. Fish. Res. Board Can.*, **23**: 915-916, 1966.

11. LOUGHLIN, M. E. & TEERI, A. E. — Nutritive value of fish. II — biotin, folic acid, pantothenic and free amino acids of various salt-water species. *Food Res.*, **25**: 479-483, 1960.

12. MARCH, B. E.; BIELY, J.; BLIGH, E. G. & LANTZ, A. W. — Composition and nutritive value of meals from Alewife, Sheepshead, Maria and Tulibee. *J. Fish. Res. Board Can.*, **24**: 1291-1298, 1967.

13. ROSENTHAL, R. L. — Vitamin B_{12}. V — Ocurrence in foods, p. 120-162, *In* W. H. SEBRELL Jr. & R. S. HARRIS, eds., The Vitamins, vol. II, Academic Press, New York, 1968.

14. SILVA, B. L.; FONSECA, H. P.; ROCHA, M.; CARVALHO, M. C.; CARVALHO, E.; BREVES, F.; BURGER, O. & PINHEIRO, J. — Valor nutritivo de alguns peixes brasileiros. Coleção Estudo e Pesquisa Alimentar, 38 p., SAPS, 1954.

15. TAKADA, K. & NISHIMOTO, J. — Studies on the choline in fish. I — Content of choline and the similar substance in fishes. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **24**: 632-635, 1958.

16. TAKADA, K. & NISHIMOTO, J. — Studies on the choline in fish. II — Decomposition of choline during the spoilage of fish meats. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **24**: 636-639, 1958.

17. TASTALDI, H. — Vitaminas, p. 195-254, *In* G. VILELA, M. BACILA e H. TASTALDI, eds., Bioquímica, 2.ª edição, Guanabara, Rio de Janeiro, 1966.

18. TEERI, A. E.; LOUGHLIN, M. E. & JOSSELYN, D. — Nutritive value of fish. I — nicotinic acid, riboflavin, vitamin B_{12} and amino acid of various salt-water species. *Food Res.*, **22**: 145-150, 1957.

Recebido para publicação em 26/5/1972.

Rev. Microbiol.
3(2):85-90, abril-junho, 1972

BACTERIOLOGICAL STUDY ON ATYPICAL MYCOBACTERIA ASSOCIATED WITH MAN

Marcelo MAGALHÃES (1), Galba CAMPOS (1) & Tereza GUERRA (1)

SUMMARY

Carrying out a total of 19 screening and completion tests, it was possible to identify all potential pathogenic species and the majority of saprophytic mycobacteria occurring in routine speciments collected at a tuberculosis laboratory in Recife - Brazil.

Out of 289 atypical cultures examined, the following results were obtained: *Mycobacterium kansasii*, 11 strains; *M. scrofulaceum*, 22; *M. aquae*, 91; *M. flavescens*, 24; *M. triviale*, 65; *M. terrae*, 35; *M. gastri*, 4; *M. fortuitum* 18, and other rapid growers, 19. Some important pathogenic species, such as *M. intracellulare* and *M. xenopi*, were not found in the present survey.

INTRODUCTION

Human pulmonary diseases produced by atypical mycobacteria were first described in 1953 [5]. In the following years, clinical, epidemiological and bacteriological studies [1, 2, 3, 8, 9, 15, 17, 18, 20, 21, 22, 24, 27, 30], proceeded at a rapid rate, providing the basis for classification and understanding of the role of those microrganisms in human pathology. Several different species have been recognized and there is no doubt that some are pathogenic and others exist as saprophytes.

The purpose of this paper is to report the results of a bacteriological investigation on atypical mycobacteria, recovered from routine specimens and received in a tuberculosis diagnostic laboratory in Recife - Brazil.

MATERIAL AND METHODS

The atypical mycobacteria studied consisted of 289 strains collected during the routine work at the Sanatório "Octavio de Freitas", Recife, between 1966 and 1970. In this period, approximately 30,000 samples of sputum or bronchial washings were cultured for tubercle bacilli. The specimens were derived from undiagnosed subjects of tuberculosis patients under drug treatment, and many of them had several samples cultured during the course of their chemotherapy. Therefore, it is not possible to determine the number of persons investigated or give more information such as frequency.

Culture method and resistance tests

Specimens were decontaminated by the SP technique [7] and cultured on IUTM [10] and Sula's liquid medium [25] enriched with beef serum, for six weeks. Resistance tests were carried out through CANETTI *et al* [6] proportion method.

Screening for atypical mycobacteria

All nonchromogenic cultures, which were resistant to one or all standard drugs, were submitted to Niacin [28] and 68°C Catalase [13] tests to differentiate them from resistant tubercle bacilli. Pigmented acid-fast strains were immediately assigned to the atypical group. The atypical strain samples were subcultured on to IUTM every six months and stored at 4°C.

Identification and characterization

Atypical cultures were formerly distinguished as rapid or slow growers through two tests: growth within 3 days on IUTM and Formamidase activity in 2 hours [16].

(1) Departamento de Microbiologia - Faculdade de Medicina - Cidade Universitária; Recife, Brasil

Completion identification tests for rapid growers included: Phenoloxidase [26], Arylsulfatase in 3 days [35], tolerance to 0.5 mg per ml Hydroxylamine [31], Allantoinase [4], Nitrate reduction [34] and growth on MacConkey agar within 5 days.

On the other hand, slow growers had their identification completed by the following tests: Tween hydrolysis [36], Nitrate reduction, tolerance to 0.5 mg per ml Hydroxylamine, tolerance to 1 μg per ml. Isoniazid, semiquantitative Catalase [14], Pigment in dark, Photochromogenesis, Urease [4], Nicotinamidase [4], Pyrazinamidase [4], Arylsulfatase in 3 days, and Tellurite reduction in 3 days [12].

RESULTS

In Table I are summarized the bacteriological characteristics of various mycobacterium species isolated in Recife. For comparison, we have also included reference strains of atypical species that were not found during this survey.

The most important pathogen recovered was *Mycobacterium kansasii* whose outstanding features were photochromogenesis, tween hydrolysis, nitrate reduction, urease and nicotinamidase activities. Almost a half of all atypicals found was represented by scotochromogens. Te significant species of this Group, *M. scrofulaceum* and *M. xenopi*, grew very slowly and did not hydrolyse the tween. They were distinguished from one another by isoniazid sensitivity, semiquantitative catalase and amidase pattern. The only significant species of Group III was not found in Recife, however the most valuable tests for the separation of American strains of *M. intracellulare* were tellurite reduction, catalase, tween hydrolysis, nitratase and amidase activity. Among rapid growers, *M. fortuitum* was distinguished from other nonchromogenic cultures through nitrate reduction, tolerance to hydroxylamine, arylsulfatase and allantoinase activities and the ability to grow on MacConkey agar.

DISCUSSION

The present results show that pathogenic atypical mycobacteria are rare in Recife, where they do not represent any sanitary problem. On the other hand, unimportant mycobacteria or accidental isolates, relatively frequently cause some trouble regarding the diagnostic routine work.

In this study, we did not intend to establish correlation between clinical data and bacteriological findings, since the present stage of knowledge on atypical mycobacteria allows recognition of the significant isolates, as it happens with *Enterobacteriaceae*, only from a bacteriological viewpoint. Nevertheless, it was possible to receive clinical information about the pathogenic role of the mycobacteria recovered: it was found out that all strains of *M. kansasii* and one strain of *M. scrofulaceum* were associated with pulmonary disease, whereas the remaining atypical cultures were considered us casual isolates. Besides, some important pathogenic atypical mycobacteria, such as *M. intracellulare* and *M. xenopi*, were not found in Recife.

In the last years, an increasing amount of work has been devoted to develop new schems of classification of atypical mycobacteria [11, 23, 29, 32, 33, 37, 38], however, the problem is not yet completely solved. The high tide of new meaningless species is still growing, many techniques used for identification purposes differ markedly among the authors, and some need to be improved. Recently, in a review on mycobacterial taxonomy, it was suggested [19] that new species without biologic or economic significance, must be designated "parochial species" and not recognized officially. These cultures, however, can eventually appear on routine work and prove troublesome in the characterization of significant species.

Employing a set of 19 differential tests, it was possible to identify almost all atypical cultures and surely all potential pathogenic species recovered in routine work. A correct bacteriological characterization of saprophytic species was not accomplished, mainly regarding nonchromogenic slow growers and pigmented rapid growers. For instance, the differentiation between *M. terrae* and *M. triviale* was based only on the amidase pattern since all cultures of Group III studied did not produce arylsulfatase. It should be kept in mind that bacteriological characteristics, as described in identification tables, are found only in typical or hypothetical median strains. When wild cultures are studied some aberrant results in individual differential tests must be expected, even when using young cultures and checking each new lot of reagents with reference strains. Furthermore, the biochemical tests employed in mycobacterial taxonomy are more quantitative than qualitative. Hence, only the analysis of a great number of identification tests would grant information on the median reaction pattern of recently isolated strains, thus allowing their most probable classification.

TABELA I

Results of screening and completion tests used in the identification of atypical mycobacteria species

Strains \ Tests	Number of strains	Niacin	68°C Catalase	Growth in 3 days	Formamidase 2h	Phenoloxidase	Pigment in dark	Growth on M. Conkey	Allantoinase 4h	Arylsulfatase 3d	Hydroxylamine 0.5	Tellurite reduct.	Photochromogenesis	Tween hydrolysis	Nitrate reduction	Strong Catalase	Isoniazid 1 μg	Urease 21h	Nicotinamidase 21h	Pyrazinamidase 21h
M. fortuitum	18	0	18	18	18	0	0	15	18	18	18	16	—	1	17	—	—	—	—	—
Nonchromogenic Group VI	4	0	4	4	4	0	0	0	0	2	2	1	—	4	0	—	—	—	—	—
Chromogenic Group IV	15	—	—	15	15	0	15	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
M. kansasii	11	0	11	0	0	—	0	—	—	0	0	1	11	11	10	11	10	11	10	0
M. scrofulaceum	22	—	—	0	0	—	22	—	—	0	8	0	0	0	1	20	14	17	3	1
M. xenopi (ATCC)	1	0	1	0	0	—	1	—	—	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
M. intracellulare (ATS)	5	0	4	0	0	—	0	—	—	0	5	5	0	0	0	0	5	0	5	5
M. aquae	91	—	—	0	0	—	91	—	—	—	—	—	0	91	0	—	—	—	—	—
M. flavescens	24	—	—	0	2	—	24	—	—	—	—	—	0	24	24	—	—	—	—	—
M. terrae	35	0	35	0	0	—	0	—	—	0	35	1	0	35	15	35	35	0	35	33
M. triviale	65	0	65	0	0	—	0	—	—	0	65	3	0	65	40	65	65	0	0	0
M. gastri	4	0	0	0	0	—	0	—	—	0	4	0	0	4	0	0	0	4	0	0

The numebr of strains corresponds to the number of samples actually positive in the test; — indicates that the test was not employed. ATCC — American Type Culture Collection. ATS — American Thoracic Society

RESUMO

Estudo bacteriológico sobre micobactérias atípicas associadas ao homem

O emprego de 19 testes de triagem e de complementação diagnóstica permitiu a identificação de todas as espécies de micobactérias atípicas patogênicas e da grande maioria das saprófitas isoladas na rotina de bacteriologia da tuberculose, em Recife.

As 289 culturas atípicas estudadas foram classificadas da seguinte forma: *M. kansasii*, 11 amostras; *M. scrofulaceum*, 22; *M. aquae*, 91; *M. flavescens*, 24; *M. triviale*, 65; *M. terrae*, 35; *M. gastri*, 4; *M. fortuitum*, 18 e outros crescedores rápidos, 19. Importantes espécies patógenas, tais como *M. intracellulare* e *M. xenopi*, não foram encontradas no presente estudo.

REFERENCES

1. ANDRADE, L. & SANTIAGO, E. A. C. — Micobactérias não tuberculosas (atípicas) na Guanabara. I — Métodos de isolamento, identificação e incidência. *Rev. Div. Nac. Tuberc.*, **15**:124-148, 1971.

2. BOJALIL, L. F. — Frequence and epidemiologie significance of unclassified mycobacteria in Mexico. *Amer. Rev. resp. Dis.*, **83**:596-599, 1961.

3. BOJALIL, L. F.; CERBON, J. & TRUJILLO, A. — Adansonian classification of mycobacteria. *J. gen. Microbiol.*, **28**:333-346, 1962.

4. BONICKE, R. — L'identification des mycobactéries a l'aide de méthodes bioquimiques. *Bull. int. Un. Tuberc.*, **32**:13-76, 1962.

5. BUHLER, V. B. & POLLAK, A. — Human infection with atypical acid-fast organisms: Report of two cases with pathological findings. *Amer. J. clin. Path.*, **23**:363-374, 1953.

6. CANETTI, G.; RIST, N. & GROSSET, J. — Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthode des proportions: Méthodologie, critères de resistance, resultats, interprétation. *Rev. Tuberc.* (Paris), **27**:217-272, 1963.

7. DARZINS, E. — The bacteriology of tuberculosis. (University of Minnesota Press, Minneapolis), 1958.

8. HEDVALL, E. — The importance of atypical acid-fast bacilli from the diagnostic and differential diagnostic points of view. *Bull. int. Un. Tuberc.*, **29**:343-353, 1959.

9. JENKINS, D. E. — Recent clinical studies in the United States on atypical acid-fast bacilli. *Bull. int. Un. Tuberc.*, **29**:295-307, 1959.

10. JENSEN, K. & KIAER, I. — Principes d'application pratique concernant l'exame microscopique, la culture, la mesure de la resistance et le classement des mycobactéries. *Bull int. Un. Tuberc.*, **29**:86-101, 1959.

11. KESTLE, D. G.; ABBOTT, V. D. & KUBICA, G. P. — Differential identification of mycobacteria: II — Subgroups of Groups II and III (Runyon) with different clinical significance. *Amer. Rev. resp. Dis.*, **95**:1041-1052, 1967.

12. KILBURN, J. O.; SILCOX, V. A. & KUBICA, G. P. — Differential identification of mycobacteria. V — The tellurite reduction test. *Amer. Rev. resp. Dis.*, **99**:94-100, 1969.

13. KUBICA, G. P. & POOL, G. L. — Studies on the catalase activity of acid-fast bacilli: I — An attempt to subgroup these organisms on the basis of their catalase activities at different temperatures and pH. *Amer. Rev. resp. Dis.*, **81**:387-391, 1960.

14. KUBICA, G. P.; JONES, W. D.; ABBOTT, V. D.; BEAM, R. E.; KILBURN, J. O. & CATER, J. C. Jr. — Differential identification of mycobacteria: I — Tests on catalase activity. *Amer. Rev. resp. Dis.*, **94**:400-405, 1966.

15. MAGALHÃES, M. — Frequência das micobactérias atípicas no Recife. *R. Serv. Nac. Tuberc.*, **10**:217-223, 1966.

16. MAGALHÃES, M.; CAMPOS, G. & ALMEIDA, T. — Formamidase activity in mycobacteria. *Rev. Microbiol.*, **3**(1)45-46, 1971.

17. MAGARÃO, M. F. & LORIAN, V. — Des mycobactéries anormales dans notre pratique pneumologique. *Acta tuberc. scand.*, **51**: 252-259, 1962.

18. MARKS, J. & TROLLOPE, D. R. — A study of the "anonimous" mycobacteria. I — Introduction; colonial characteristics and morphology; growth rates; biochemical tests. *Tubercle* (Lond.), **41**:51-62, 1960.

19. MARKS, J. — New species of mycobacteria. *Amer. Rev. resp. Dis.*, **99**:625, 1969.

20. NAUMANN, W. — Bedeutung und differenzierung der atypischen mycobakterien. *Arch. Hyg.* (Berl.), **151**:332-358, 1967.

21. RUNYON, E. H. — Differentiation des mycobactéries anonymes (atypiques) et les bacilles tuberculeux des mamiféres. *Bull. int. Un. Tuberc.*, **29**:72-82, 1959.

22. RUNYON, E. H. — Anonimous mycobacteria in pulmonary disease. *Med. Clin. N. Amer.*, **43**:273-279, 1959.

23. RUNYON, E. H.; KUBICA, G. P.; MORSE, W. C.; SMITH, R. C. & WAYNE, L. G. — *Mycobacterium*. In Manual of Clinical Microbiology. Chap. 14:112-136 (American Society for Microbiology, Bethesda), 1970.

24. SELKON, J. B. & MITCHISON, D. A. — Atypical mycobacteria and drug-resistant tubercle bacilli isolated during a survey of untreated patients with pulmonary tuberculosis. *Tubercle* (Lond.), **40**:141-154, 1959.

25. SULA, L. — Fibrin-clot culture technique for isolation of tubercle bacilli from pleural exudates. *Amer. Rev. Tuberc.*, **80**:438-440, 1959.

26. TACQUET, A. — Techniques récents d'identification des mycobactéries. *Ann. Soc. belge Méd. trop.*, **4**:19-30, 1962.

27. TACQUET, A.; TISON, E. & DEVULDER, B. — Quelques aspects actuels des infection broncho-pulmonaires provoquées par les mycobactéries dites "atypiques". *Rev. Tuberc.* (Paris), **28**:89-116, 1964.

28. TARSHIS, M. S. — Some useful procedures for group differentiation of *Mycobacterium tuberculosis*, unclassified mycobacteria, and saprophytic acid-fast bacilli. *J. Lab. clin. Med.*, **57**:480-489, 1961.

29. TARSHIS, M. S. — The mycobacteria. In Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis. Chap. 66: 1233-1268 (The C. V. Mosby Comp., St. Louis), 1970.

30. TIMPE, A. & RUNYON, E. H. — The relationship of atypical acid-fast bacteria to human disease. *J. Lab. clin. Med.*, **44**:202--209, 1954.

31. TSUKAMURA, M. — Differentiation of mycobacteria by susceptibility to hydroxylamine and 8-azaguanine. *J. Bact.*, **90**:556-557, 1965.

32. TSUKAMURA, M.; MIZUNO, S. & TSUKAMURA, S. — Classification of rapidly growing mycobacteria. *Jap. J. Microbiol.*, **12**: 151-166, 1968.

33. TSUKAMURA, M.; MIZUNO, S. & TSUKAMURA, S. — Numerical classification of slowly growing mycobacteria. *Amer. Rev. resp. Dis.*, **99**:299-303, 1969.

34. VIRTANEN, S. — A study of nitrate reduction by mycobacteria. *Acta tuberc. scandinav.* (suppl. 48), 1960.

35. WAYNE, L. G. — Recognition of *Mycobacterium fortuitum* by means of three-day phenolphthalein sulfatase test. *Amer. J. clin. Path.*, **36**:185-187, 1961.

36. WAYNE, L. G.; DOUBEK, J. R. & RUSSEL, R. L. — Classification and identification of mycobacteria: I — Tests employing Tween 80 as substrate. *Amer. Rev. resp. Dis.*, **90**: 588-597, 1964.

37. WAYNE, L. G. — Classification and identification of mycobacteria: III — Species within Group III. *Amer. Rev. resp. Dis.*, **93**: 919-928, 1966.

38. WAYNE, L. G.; DOUBEK, J. R. & DIAZ, G. A. — Classification and identification of mycobacteria: IV — Some important scotochromogens. *Amer. Rev. resp. Dis.*, **96**:88--95, 1967.

Recebido para publicação em 8/2/1972.

Rev. Microbiol.
3(2):91-100, abril-junho, 1972

ATIVIDADE CELULOLÍTICA EM ALGUNS SOLOS BRASILEIROS

Luiz Fernando de Toledo Luna LINHARES (1) & Adam DROZDOWICZ (2)

RESUMO

Foi feito um exame da atividade celulolítica de solos brasileiros não cultivados, coletados no Estado de São Paulo, considerados representativos do ponto-de-vista pedológico e econômico, tendo sido usada como técnica de avaliação principal, a técnica gravimétrica da determinação das perdas de celulose no solo.

Alguns indicadores da atividade biológica do solo foram também examinados, tais como número geral de microrganismos e densidade populacional de celulolíticos (MPN).

Diferenças significativas na atividade celulolítica dos solos examinados foram observadas, permitindo dividí-los em grupos mostrando muito forte, forte e moderada atividades, tendo os solos com cobertura de cerrados apresentado menor grau de atividade que os demais. Correlações entre a atividade celulolítica e os indicadores de atividade biológica examinados, só foram encontrados em alguns solos. Os resultados obtidos permitem sugerir, dentro de um critério amplo, ser a atividade celulolítica dos solos brasileiros estudados, semelhante à verificada em solos de clima temperado.

INTRODUÇÃO

O papel relevante dos microrganismos celulolíticos na ecologia do solo, influindo em vários setores da atividade biológica, levou muitos autores a propôr a utilização da atividade celulolítica como um indicador da atividade biológica do solo [2, 4, 8, 9, 18, 22 e 23].

Alguns fatores capazes de melhorar o crescimento das plantas aceleram também, em determinadas condições, a atividade celulolítica no solo. Explorando tal achado, cabe aos agrônomos verificar a possibilidade de se usar na prática agrícola a atividade celulolítica, como um indicador da fertilidade do solo ou no levantamento de solos como um fator auxiliar na sua distribuição [20].

Não existem, até agora, dados sobre a decomposição da celulose nos solos do Brasil. Este é o principal objetivo deste trabalho: fornecer algumas informações sobre a intensidade da decomposição da celulose em solos brasileiros escolhidos.

MATERIAL E MÉTODOS

Solos examinados. Foram examinados 6 solos, numerados de 1 a 6 por ordem cronológica de coleta. Os solos foram escolhidos com a orientação de pedologistas da Divisão de Pedologia e Fertilidade do Solo (DPFS) do Ministério da Agricultura, na Guanabara. Os tipos de solos escolhidos, os locais onde foram coletados e suas coberturas, pH e conteúdo de matéria orgânica apresentados estão indicados na Tabela I.

O local indicado para serem coletadas as amostras foi o Estado de São Paulo, onde já foi feito um levantamento completo dos solos existentes, pelas Comissões de Solos do Centro Nacional de Ensino e Pesquisa Agronômica [12]. Acresce o fato ainda do Estado de São Paulo ser local de transição das regiões fisiográficas brasileiras [12], podendo lá ser encontrada uma grande variedade de solos típicos do nosso País.

Parte da tese de Mestrado (L.F.L.) apresentada ao Instituto de Microbiologia da U.F.R.J., GB, Brasil

(1) Auxiliar de Ensino do Instituto de Microbiologia da U.F.R.J.
(2) Chefe de Pesquisas do Instituto de Microbiologia da U.F.R.J.

As amostras, em todos os solos, foram retiradas do horizonte A, a cerca de 12 cm de profundidade, após remoção da cobertura vegetal e da camada mais superficial do solo.

Os solos foram todos coletados em áreas virgens, sem qualquer tratamento agrícola.

Manutenção dos solos. Logo após serem coletados, os solos foram colocados em sacos plásticos, amarrados e mantidos fechados até o final da viagem. Os solos foram então colocados em vasos de cerâmica, alinhados em prateleiras com cobertura, no jardim. Por terem sido coletados em estação muito chuvosa, estando muito úmidos, os solos foram deixado expostos nos vasos por 2 dias, quando foram pesados. A partir daquela data foram mantidos a peso constante pela adição de água a intervalos regulares.

Em todas as determinações físicas, químicas e microbiológicas, bem como nos experimentos realizados sob condições controladas de laboratório, foram os solos previamente tamisados em malhas de 1 mm.

Atividade celulolítica dos solos. Discos de papel de filtro com 7 cm de diâmetro, (What. 1), de peso conhecido, protegidos por tela de nylon de malha de 1 × 1 mm, foram incubados em estreito contacto entre 2 camadas de solo contido em placas de Petri de 10 cm. Os solos foram umedecidos até 60% de sua capacidade de retenção de água. Foram feitas 3 determinações de cada solo para cada uma das 3 leituras programadas, sendo as placas incubadas a 37°C em câmara úmida, por períodos de 30, 50 e 100 dias. Findo cada período de incubação foram os discos retirados dos solos nas placas, e submetidos, ainda com a tela protetora, ao seguinte tratamento: lavagem por imersão em água destilada (3 dias), visando retirar as partículas de solo aderentes ao papel; imersão em solução de NaOH 18% (6 dias), a fim de remover o crescimento dos microrganismos no papel; nova lavagem em água destilada por imersão (3 dias) e finalmente, secagem dos discos em forno a 55°C até peso constante. O papel foi então retirado das telas de nylon e pesado em balança, sendo calculada por diferença do peso original, a percentagem de celulose decomposta pela microflora celulolítica nos solos examinados.

Foi examinada também a técnica química proposta por MARKUS [11]. Pedaços de celofane (Cellosul-Matarazzo) de peso conhecido e fervidos por 1 hora para retirar plasticidas, foram enterrados adsorvidos a lamínulas. Em cada placa foram colocadas 4 lamínulas correspondentes às determinações de cada leitura. As placas foram incubadas a 37°C em câmara úmida por períodos de 30 e 55 dias, estando os solos com 60% de sua capacidade de retenção de água. Após incubação foram as lamínulas retiradas das placas a fim de ser o filme de celulose, ou o que dele restara após limpeza das partículas de solo aderentes, submetido a hidrólise pelo H_2SO_4 concentrado, com posterior dosagem dos açúcares redutores do hidrolizado, pelo método da antrona.

Densidade da população celulolítica. Foi determinada como o número mais provável de microrganismos celulolíticos. Foram usados os solos naturais e os solos enriquecidos com papel de filtro, correspondentes às placas da 1.ª leitura da atividade celulolítica (30 dias). Foram usados tubos contendo meio mineral de DUBOS [21] e uma tira de papel de filtro de 12 × 1 cm, mergulhada 1/3 nos 9 ml do líquido, adsorvida à parede do tubo. Após incubação dos tubos a 37°C por 30 dias, foi feita a leitura, sendo a avaliação feita de acordo com tabelas estatísticas [1, 13].

Número geral de microrganismos. A avaliação do "número geral" de bactérias, fungos e actinomicetos dos solos, foi feita segundo o método clássico de diluição em placa. Os meios usados para a contagem dos microrganismos foram o de Caseinato Agar para bactérias, o de Martin para fungos e o de Agar Amido para actinomicetos [13].

As leituras foram feitas após períodos de incubação de 60 h para bactérias, 5 dias para fungos e 6 dias para actinomicetos, a 37°C.

Peso seco dos solos. Obtido no forno a 105°C, fazendo-se pesagens após 24 h, até peso constante.

Determinação do pH. Feita após prévia agitação por 30 minutos de suspensão 1:1 de solo em água destilada. Usando potenciômetro Beckman Zeromatic.

Matéria orgânica. Obtido o conteúdo de matéria orgânica dos solos, através da queima no forno a 500°C, por 1 hora [14].

RESULTADOS

Os solos examinados, mostram possuir condições para servir de base a um estudo comparativo dos vários indicadores, pois pertencem a tipos pedológicos diferentes, apresentam diferenças quanto à cobertura vegetal: nos extremos, a cobertura normal é a do tipo cerrado. Possuem ainda diferenças nos seus conteúdos de matéria orgânica. Os solos examinados são todos ácidos ou moderadamente ácidos (Tabela I).

TABELA I

Características dos solos

Solo	Abreviatura	Classificação pedológica	Cobertura vegetal	pH (H_2O)	Matéria orgânica % g/solo seco	Local da coleta
1	LV	Latosol Vermelho Amarelo-Orto	Floresta	4.7	11,3	Município de Atibaia (Mendes *et al.*, 1960, p. 340)
2	LE	Latosol Vermelho Escuro-Orto	Cerrado	5.2	6,6	Município de Sorocaba (Mendes *et. al.*, 1960, p. 300)
3	Pml	Podzolizado (de Lins e Marília — var. Marília)	Pastagem	5.0	2,9	Arredores de Sarapuí (Lemos *et al.*, 1960)
4	LR	Latosol Roxo (terra roxa legítima)	Vegetação arbustiva	5.5	12,1	Município de Ribeirão Preto (Mendes *et al.*, 1960. p. 275)
5	LR	Latosol Roxo (terra roxa legítima)	Campo cerrado	4.8	7,7	Município de Batatais (Mendes *et al.*, 1960. p. 289)
6	Pln	Podzolizado (de Lins e Marília — var. Lins)	Floresta	6.1	6,5	Estrada Matão-Jaboticabal. Arredores do I.R.I.(*) (Lemos *et al.*, 1960)

* I.R.I. = I. Research Institute (ligado à USAID — antigo IBEC Research Institute).

Maiores detalhes sôbre os solos naturais estudados e quanto aos pontos onde foram retiradas as amostras a serem examinadas, podem ser encontrados na publicação sôbre o levantamento dos solos do Estado de São Paulo [12] ou na Carta dos Solos do Estado de São Paulo [10].

As características microbiológicas gerais são apresentadas na Tabela II.

A Tabela III mostra o MPN (número mais provável) de celulolíticos dos solos naturais e dos solos incubados com material celulósico (cultura de enriquecimento). Pode-se constatar ser a densidade populacional celulolítica muito grande nos solos 4 e 5, grande no solo 6 e mediana nos solos 1, 2 e 3. O solo enriquecido foi examinado numa tentativa de observar a dinâmica de crescimento da população celulolítica, os resultados permitindo separá-los em solos muito estimulados (3, 6), bem estimulados (1, 2) e nos que mostram pouco (4) ou nenhum estímulo a esse procedimento (5).

A Figura 1, dá uma orientação sobre a técnica dos discos de papel de filtro, usados para determinar a atividade celulolítica dos solos.

As perdas de peso do papel, consideradas como critério de decomposição são apresentadas na Tabela IV e no Gráfico 1, onde os solos estão divididos tendo por base o maior ou menor grau de atividade celulolítica. Assim, temos solos que apresentaram muito for-

TABELA II

Características microbiológicas gerais dos solos

Solo	Número geral de microrganismos(*)/g solo seco		
	Bactérias	Fungos	Actinomicetos
1	2.200.000	13.700	59.300
2	1.110.000	20.800	44.800
3	1.660.000	3.000	23.200
4	5.120.000	8.300	55.000
5	1.900.000	53.100	31.800
6	2.730.000	13.600	10.500

* Os valores representam médias de 3 determinações.

TABELA III

Número de microrganismos celulolíticos nos solos

MPN(*) (celulolíticos/g solo)	Solos					
	1	2	3	4	5	6
Solo natural	4.900	4.900	3.700	21.900	29.800	11.600
Solo enriquecido	39.800	15.300	1.000.000	31.000	27.800	230.000

(*) MPN = Most Probable Number (número mais provável).

TABELA IV

Atividade celulolítica dos solos

Solo	Decomposição da celulose (%)		
	30 dias	50 dias	100 dias
1	41,5	74,5	89,0
2	14,0	30,0	56,0
3	52,0	73,0	77,0
4	48,0	58,0	79,5
5	40,0	40,0	53,0
6	74,0	87,0	95,0

A percentagem de decomposição da celulose no solo foi calculada por diferença de pêso de discos de papel de filtro de pêso conhecido, enterrados nos solos e pesados após incubação.

Os valores representam médias de 3 determinações.

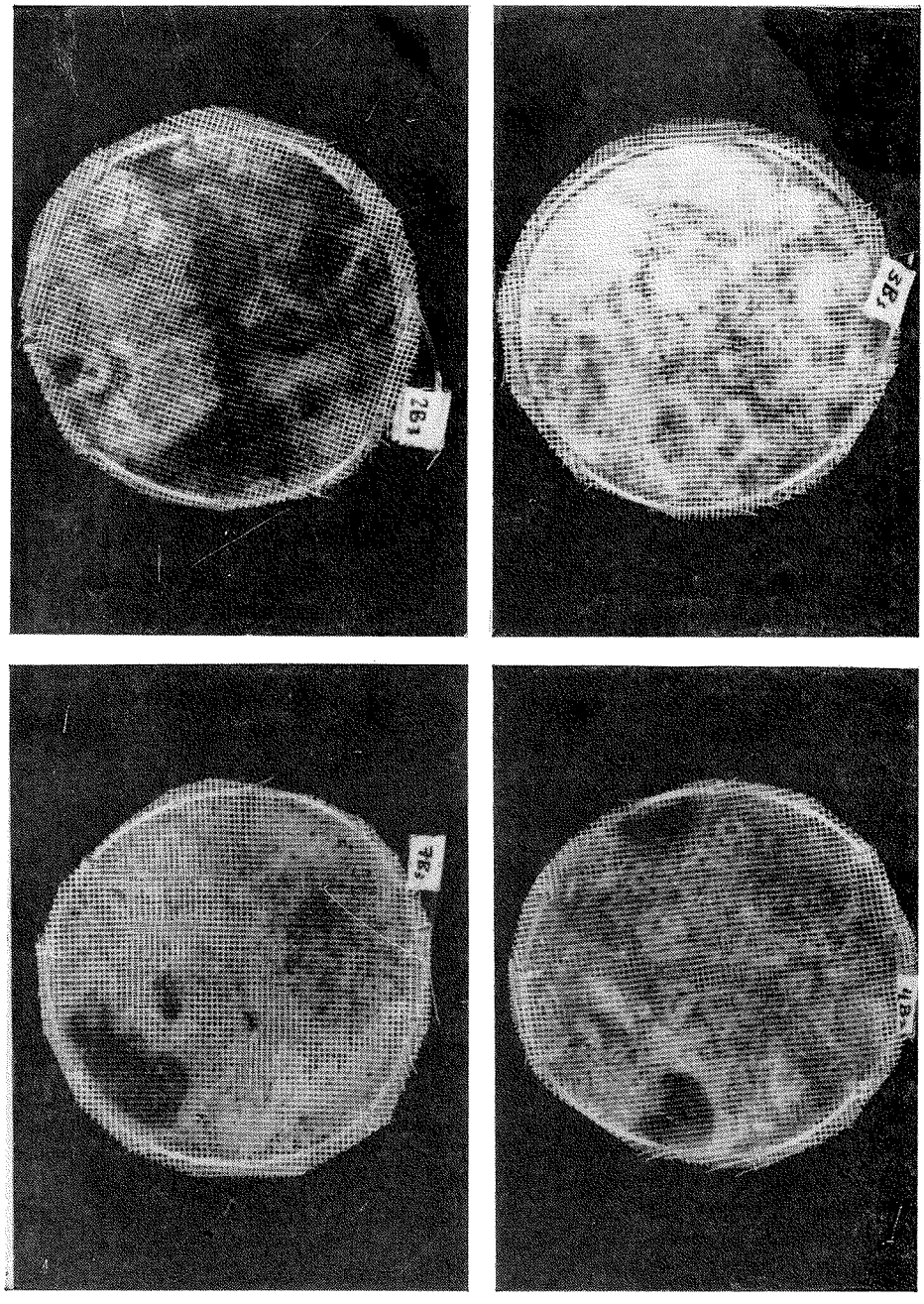


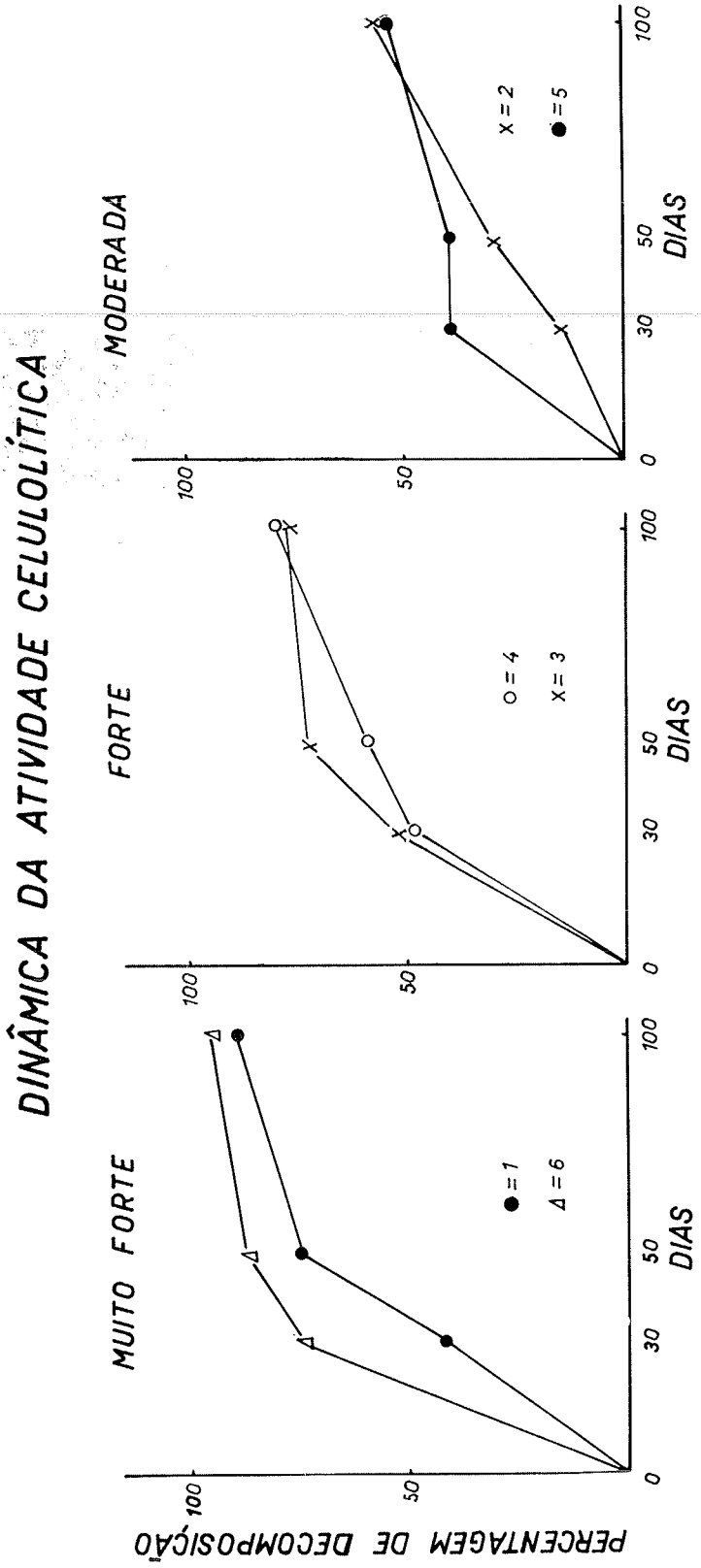
Fig. 1 — Técnica gravimétrica usando discos de papel de filtro protegidos por rede de nylon. As fotografias mostram discos, após incubação no solo, apresentando diferentes graus de decomposição e colonização.

te (1, 6), forte (3, 4) e moderada (2, 5) atividades. Os valores representam médias de 3 determinações.

Tentativa foi feita no sentido de comparar a dinâmica da atividade celulolítica, pela obtenção de uma estimativa da decomposição diária média, cujos resultados se acham na Tabela V.

A técnica química, de dosagem pela antrona do hidrolizado do celofane recuperado do solo após incubação, não deu resultados satisfatórios. Tal se deve à dificuldade de recuperação dos restos de celofane não degradado, possivelmente devido à plasticidade de alguns solos muito argilosos, como o 2, 4 e 5 ou devido aos restos do celofane serem muito pequenos, facilmente perdidos durante

GRÁFICO 1



Obs. — Os números de 1 a 6 representam os solos estudados (Tabela I).

TABELA V

Taxa de decomposição diária (*) da celulose nos solos, em períodos de incubação de 30, 50 e 100 dias

Solo	Decomposição diária (%)			
	Incubação de 30 dias	Incubação de 30 até 50 dias	Incubação de 50 até 100 dias	Incubação de 100 dias
1	1,4	1,6	0,3	0,9
2	0,4	0,8	0,5	0,5
3	1,7	1,0	0,1	0,7
4	1,6	0,5	0,4	0,8
5	1,3	0	0,2	0,5
6	2,4	0,6	0,1	0,9

(*) Os cálculos para obter as taxas médias diárias de decomposição foram feitos, dividindo-se a taxa de decomposição observada ao fim de cada um dos períodos de incubação, pelo número de dias do período considerado.

as manipulações de retirada das lamínulas com celofane dos solos.

Nessas condições, os resultados apresentando diferenças significativas nas determinações por solo, ficaram invalidados para o emprego dessa técnica.

DISCUSSÃO

Sendo o solo um sistema heterogêneo e complexo, impossível se torna caracterizá-lo através de um único indicador. Inúmeros são os indicadores de atividade biológica do solo e sua escolha vai depender dos objetivos a alcançar. Em nosso trabalho, escolhemos como indicador a atividade celulolítica, não só pela importância dessa atividade na vida do solo e as vantagens que a técnica usada oferece, mas também, pelo seu uso frequente em trabalhos similares.

A comparação das atividades celulolíticas dos solos examinados, permite estabelecer diferenças substanciais entre casos extremos, ou seja, solos com cobertura normal, (1, 3, 4, 6) que apresentam muito forte (1, 6) e forte (3, 4) e solos com cobertura de cerrados (2, 5), mostrando moderada atividade.

A taxa de decomposição diária foi mais elevada durante os primeiros 30 dias de incubação, nos solos Podzólicos (3, 6) e nos do tipo Latosol Roxo (4, 5). No período de 30 a 50 dias só houve aumento da taxa nos solos do tipo Latosol Vermelho (1, 2).

Tais fatos estão de acordo com a literatura, onde em vários trabalhos [4, 8, 9] foram encontradas diferenças na atividade celulolítica de solos sob diferentes coberturas vegetais. Diferenças significativas foram também verificadas [6, 19, 23] na atividade celulolítica em tipos diferentes de solos.

Correlação entre a atividade celulolítica e outros indicadores de atividade biológica examinados só foi verificada em alguns casos, variando sua frequência nos diversos solos. A falta de correlações não é fato estranho, em estudos feitos no solo como atestam vários trabalhos [15, 16].

Vários autores tem ressaltado a importância da temperatura e da umidade na intensidade da decomposição da celulose no solo [17, 19]. Pode-se, ou não, comparar a atividade dos solos examinados neste trabalho e que pertencem ao clima tropical, com a atividade de solos pertencentes ao clima temperado.

A maioria dos trabalhos consultados, tem sido feitos em condições de campo, onde a velocidade de decomposição da celulose é afetada por inúmeros fatores ambientais, nem sempre determinados. O valor dos resultados obtidos em experimentos no campo, especialmente os que são feitos durante muitos anos, é dirigido para finalidades específicas ou para esclarecer problemas locais, não podendo ser comparáveis esses resultados, com os de trabalhos do mesmo tipo realizados em regiões distintas.

Nisso, reside a importância de serem feitos os trabalhos em condições controladas de laboratório e a razão de terem sido aqui usados solos com condições de umidade, temperatura e tempo de incubação conhecidos. Desse modo é possível obter a tendência da atividade em condições comparáveis com alguns trabalhos similares, realizados em locais diferentes.

Trabalhando em condições de laboratório, JENSEN [5], em solo ácido (pH 4.5) fracamente arenoso, obteve após 30 dias de incubação a 25°C, decomposição da celulose a que corresponde a uma taxa diária estimada de 2,83%. KARNICKA-FELSZ [6] em solos podzólicos com diferentes graus de acidez, verificaram decomposição de papel de filtro após 14 dias a 30°C, a que equivalem taxas diárias de 2,56% (pH 4.4); 1,71% (pH 4.6) e 1,40% (pH 4.8)). KIFFER & MANGENOT [7], com solos de florestas incubados a 20-22°C por 5 1/2 meses, obtiveram em solo podzólico humo-ferruginoso (pH 4.5-5.2), apenas colonização, sem perdas mensuráveis do papel de filtro. Obtiveram os mesmos resultados, com solos fracamente podzólicos (pH 4.5-4.8), em experimentos de 30 dias e de 3 1/2 meses de incubação. FLORENZANO & col.[3], testando a ação de adubos minerais e orgânicos, obtiveram após 15 dias de incubação a 28°C, de papel de filtro no solo, ausência de decomposição visível, no solo testemunho.

Comparar os resultados acima com os obtidos no nosso trabalho, é uma tarefa impossível, devido às condições diferentes em que foram realizados os experimentos. Contudo dentro de um critério bastante amplo, pode-se sugerir serem as taxas diárias estimadas, encontradas nos solos brasileiros do Estado de São Paulo, mais ou menos semelhantes às verificadas em solos europeus.

SUMMARY

Cellulolytic activity of some Brazilian soils.

The cellulytic activity of some Brazilian virgin soils was investigated using a "gauze-bag test" technique. The general number of soil microrganisms and the population size of the cellulolytic microflora, were determined, as well.

Significant differences in the cellulolytic activities, were found between different soils; they were divided into three groups showing moderate (Cerrado soils), strong and very strong activities.

Correlations between the cellulolytic activity and other biological indicators were found only in few cases.

The results indicate that the daily rates of cellulose decomposition in the examined Brazilian soils, do not differ substancially from the average rates found in soils of temperate climate zones, when investigated in laboratory conditions.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Conselho Nacional de Pesquisas (C.N.Pq.), à Fundação Ford e ao Conselho de Pesquisas da U.F.R.J., pela ajuda financeira prestada ao laboratório de Microbiologia do Solo, para a realização dos seus trabalhos. Nossos agradecimentos ao Dr. Marcelo Nunes Camargo, pela orientação dada na escolha dos solos estudados.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ALEXANDER, M. — Most probable number method for microbial populations. Methods of Soil Analysis. Black, C. A. (edit.) Part II, pp. 1467-1472, 1965.

2. BENE, R.; GIRARD, Th. & BALDO, S. — Aspects de la cellulolyse dans quelques types de "sols biologiquement pauvres". *Ann. Inst. Pasteur* (Lille), **115**:538-541, 1968.

3. FLORENZANO, G.; MATERASSI, R. & FAVILLI, F. — Activité cellulolytique dans les sols cultivés et influence des engrais. *Ann. Inst. Pasteur* (Lille), **115**:569-573, 1968.

4. HUNDT, R. & UNGER, H. — Untersuchungen über die Zellulolytische Aktivität unter Grünlandgesellschaften. *Tagungsber. DDR. Akad. Landwirtsch,* **98**:263-275, 1968.

5. JENSEN, H. L. — Microbiology of farmyard manure decomposition in soil. II — Decompostion of cellulose. *J. Agr. Sci.,* **21**:81-100, 1931.

6. KARNICKA-FELSZ, H. — Rozklad celulozy w glebach. *PAM. P.I.G.W.,* **16**:1, 1935.

7. KIFFER, E. & MANGENOT, F. — Activités cellulolytiques de quelquer sols forestiers. *Ann. Inst. Pasteur* (Lille), **115**:582-595, 1968.

8. KUZNIAR, K. — Energia rozkladu blonnika w glebach Parku Narodowego w Pieninach. *Acta microbiol. pol.,* **1**:52-57, 1952.

9. LANDEFELDT-BERGER, U. — Zum Zellulose Abbau in Boden unter verschiedenem Bewuchs. *Oikos,* **11**: II pp. 311-324, 1960.

10. LEMOS, R. C. *et al.* — Carta dos Solos do Estado de São Paulo. (Contribuição à Carta de Solos do Brasil). Comissão de Solos do C.N.E.P.A., 1960.

11. MARKUS, L. — Determination of carbohydrates in vegetabel matter with anthrone reagent. II — Measurement of cellulase activity in soil and manure. *Agrokem. Talajtan.*, 4:207-216, 1955.

12. MENDES, W.; LEMOS, L. C. de; CAMARGO, M. N. *et al.* — Levantamento de reconhecimento dos solos do Estado de São Paulo. Serv. Nac. Pesq. Agron. bol. 12, Rio de Janeiro, SNPA. 1960.

13. PRAMER, D. & SCHMIDT, E. L. — Experimental soil microbiology. Burgess Publishing Company, Minneapolis, Minnesota, 1964.

14. ROBERGE, M. R. & KNOWLES, R. — Available nitrogen in a black spruce humus fertilized with urea. Student Thesis Research. Pulp and Paper Research Institute of Canadá. Montreal. Canadá. 1965.

15. SKUJINS, J. J. — Enzymes in Soil. Soil Biochemistry. McLaren, A. D. & Petersen, G. H. (edit.) Marcel Dekker. Inc., New York, pp. 371-407, 1967.

16. STEVENSON, I. L. — Dehydrogenase activity in soils. *Canad. J. Microbiol.*, 5:229-235, 1959.

17. SZEGI, J. — Die Rolle einiger ökologischer Faktoren bei dem mikrobiologischen Abbau der Zellulose. *Tagungsber. DDR Akad. Landwirtsch.*, **98**:81-90, 1968.

18. TESAROVÁ, M. & ÚLEHLOVÁ, B. — Abbau der Zellulose unter einigen Wiesengesellschaften. *Tagungsber. DDR Akad. Landwirtsch.*, **98**:277-287, 1968.

19. UNGER, H. — Die Mineralisierung verschiedener organischer Substanzen im Boden von Gründlandstandorten. *Zb. Bakt., P., II Abt.*, **120**:411-425, 1966.

20. UNGER, H. — Über den Aussgewert der mit dem Gazebeuteltest erzielten Zelluloseabbauergebnisse. *Tagungsber. DDR Akad. Landwirtsch*, **98**:19-33, 1968.

21. WAKSMAN, S. A. — Soil Microbiology. John Wiley & Sons, Inc. New York. London. p. 115, 1961.

22. WENT, J. C. & JONG, F. de — Decomposition of cellulose in soils. *Antonie v. Leeuwenhoek*, **32**:39-56, 1966.

23. WOLFF-STRAUB, R. — Mikrobiologische Untersuchung einer braunerde-pseudo gleycatena. *Z. Pflanzenern. Düng. Bodenkdt.*, 124:108-125, 1969.

Recebido para publicação em 29/2/72.

Rev. Microbiol.
3(2):101-102, abril-junho, 1972

STUDIES ON A STRAIN OF *LISTERIA* (*L. GRAYI*) ISOLATED FROM BOVINE NASAL SECRETION

Ernesto HOFER [1]

SUMMARY

Report on the isolation of a *Listeria* strain from bovine nasal secretion, biochemically and serologically identified as *L. grayi*.

This paper describes the isolation of a *Listeria* strain from the nasal secretion in bovines, in a sample of 25 animals, a finding which points to such product as a possible source of that germ.

Samples of nasal secretion and faeces were collected with a cotton swab, part of it being seeded into tryptose broth, incubated at 4°C for three weeks and then plated out on sheep blood agar and tryptose agar, while the remaining portion was seeded in tryptose broth containing 3.5% potassium thiocyanate, a selective medium reported by LEHNERT, C. — Z. ges. Hyg., *11*(8): 633-636, 1965, and incubated at room temperature for 72 hours before being plated out on sheep blood and tryptose agar and then being incubated at 39°C. The plates were regularly cheked for the presence of typical *Listeria* colonies (according to the method described by GRAY, M. L. — Zbl. Bakt. Abt. I Orig., *169*: 373-377, 1957). To detect motility, which is usually evident in 48 hours, the selected colonies were subcultured in semi-solid agar plates incubated at room temperature.

Further characterization of the isolates was carried out through classical biochemical tests performed at 37°C temperature, with daily observation for 30 days. The results were as follows: indol and H_2S not produced; gelatin, methyl red and Voges-Proskauer (with Barrit's reactive) tests positive; absence of growth in KCN; colonies on tryptose agar plus 5% sheep or rabbit blood were non hemolytic after 24 to 48 hours; Simmons citrate was not included in the tests. The results of carbohydrate metabolism are shown in Table I, along with those obtained with *Listeria monocytogenes* (L48) and *L. grayi* prototypes.

Serological identification through agglutination tests was made according to Donker-Voet's recomendations (Amer. J. Vet. Res., *20*: 176-179, 1959), against serotypes Lla, Llb, L3a, L3b, L4a, L4b and *grayi*. Titers read as follows: 1:1280 for *L. grayi*, 1:160 for Lla, and 1:80 for L4b. Agglutinin absorption has confirmed the isolated strain as *L. grayi* (Table II).

Concerning *in vivo* tests, the strain investigated was not pathogenic for mice (intraperitoneal inoculation); Anton's test (Zbl. Bakt. Abt. I Orig., *131*: 89-103, 1934) was also negative.

The results here reported are similar to those of LARSEN & SEELIGER (Proc. 3rd Internat. Symposium on Listeriosis, July 13-16, 35-39, 1966), which supports the classification of our isolate as *L. grayi*.

RESUMO

Estudo sobre uma amostra de Listeria (L. grayi) *isolada de secreção nasal de bovino.*

Através da análise dos comportamentos bioquímico e sorológico de uma amostra de *Listeria* isolada de secreção nasal de um bovino hígido, abatido no Matadouro Estadual

(1) Laboratório de Bacteriologia, Departamento de Microbiologia, Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, Brasil

TABLE I

Reaction of *L. monocytogenes* (L4b), *L. gray* and Isolated strain in carbohydrates

Carbohydrates	*Listeria monocytogenes* (L4b)	*Listeria grayi*	Isolated strain
Adonitol	–	–	–
Arabinose	–	–	–
Dulcitol	–	–	–
Galactose	–	+	+
Glucose	+	+	+
Glucose (gas)	–	–	–
Lactose	+ 11d	+	+
Maltose	+	+	+
Mannitol	–	+	+
Mannose	+	+	+
Rhamnose	+	–	–
Salicin	+	+	+
Sorbitol	+ 4d	+	+
Sucrose	+ 6d	–	–
Xylose	–	–	–

Key: + = acid after one day; – = negative after 30 days.

TABLE II

Results of absorption test between *Listeria grayi* and the isolated strain

Somatic antigen suspensions (100oC, 1 hr)	Somatic antisera			
	Listeria grayi		Isolated strain	
	Unabsorbed	Absorbed by the isolated strain	Unabsorbed	Absorbed by *L. grayi*
L. grayi	1/1280	0	1/1280	0
Isolated strain	1/1280	0	1/1280	0

de Santa Cruz, Guanabara, foi possível identificá-la como pertencente à espécie *Listeria grayi*, recentemente descrita por LARSEN & SEELIGER (Proc. 3rd Internat. Symposium on Listeriosis, July 13-16, 35-39, 1966).

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to express our gratitude to Dr. Genesio Pacheco for providing us with the *Listeria* strains originally supplied by Prof. Dr. H. P. R. Seeliger, as well as to Mr. José Caetano Alves, for his technical assistance.

Recebido para publicação em 26/3/1971.

Rev. Microbiol.
3(2):103-120, abril-junho, 1972

TÉCNICAS SELECIONADAS DE COLORAÇÃO E DE CITOLOGIA ÓTICA DE BACTÉRIAS

Italo SUASSUNA (1) & Ivone R. SUASSUNA (2)

RESUMO

Faz-se uma apresentação de técnicas experimentadas pelos autores e destinadas à coloração geral ou à evidenciação de estruturas da célula bacteriana por processos de microscopia ótica. Consideram-se não somente resultados obtidos em culturas puras, como também aqueles de interesse eventual ao diagnóstico médico.

INTRODUÇÃO

As técnicas de demonstração das estruturas da célula bacteriana, através da microscopia ótica tiveram o seu desenvolvimento máximo na década a partir de 1950, e foram extremamente úteis para definir a sua organização como aceita no presente [15, 18]. A seguir, o emprego dos processos de microscopia eletrônica, veio aclarar e resolver em maior profundidade alguns dos problemas delineados com as técnicas iniciais, tornando-se o instrumento de alguns especialistas e relegando a plano secundário os métodos de coloração que fundamentaram os primeiros estudos.

Anote-se,adicionalmente, que os meios de classificação de bactérias repousam fortemente em investigações sobre sua fisiologia e atividades bioquímicas, o que contribui para descrições sumárias e muitas vezes imperfeitas dos métodos de coloração. Em numerosos tratados e compêndios de Bacteriologia, observa-se, de fato, descrições por demais sucintas de uma multiplicidade de métodos de coloração, referidos como adequados, mas nem sempre equivalentes entre si.

Não obstante, o que vimos de apontar, a evidenciação ótica de algumas organelas das bactérias é imprescindível a estudos de taxonomia, ou mesmo, à classificação em rotina diagnóstica dos gêneros ou espécies. Em tais casos, como na demonstração dos cílios bacterianos, o bacteriologista comum encontra inexcedível dificuldade e admite que a boa técnica esteja nas mãos de alguns poucos "especialistas" ou indivíduos naturalmente perfeccionistas.

Segundo LEIFSON [14] devido às dificuldades técnicas experimentadas por muitos bacteriologistas, a natureza da ciliatura foi omitida na descrição original de muitas espécies bacterianas.

O mesmo parece ocorrer com as técnicas de demonstração da cápsula bacteriana, outra estrutura da maior importância para a classificação adequada desses microrganismos, mas que é raramente utilizada em rotina, ou, quando o seja, de forma sabidamente insatisfatória [8].

Uma tentativa de padronizar técnicas de coloração, com resultados os mais satisfatórios, foi realizada pela Sociedade Americana de Microbiologia [5] o que não cobre, porém, alguns métodos atuais de coloração de bactérias e de demonstração de determinadas estruturas.

Justifica-se, pois, pelas breves considerações acima, a presente descrição de técnicas, todas elas executadas pelos autores, e selecionadas em comparação com vários outros processos de coloração para a mesma finali-

(1) Do Instituto de Microbiologia, U.F.R.J. e da Faculdade de Ciências Médicas, U.E.G., Rio de Janeiro, GB
(2) Do Instituto de Microbiologia, U.F.R.J., Rio de Janeiro, GB

dade, e que não serão referidos. O objetivo didático foi sempre tomado em consideração e, em todos os casos, as técnicas descritas foram utilizadas no ensino prático da morfologia e citologia ótica de bactérias, tendo-se obtido resultados satisfatórios nas mãos de estudantes de cursos de graduação ou pós-graduação. Tanto quanto possível foram seguidas as recomendações do "Manual of Microbiological Methods" da Sociedade Americana de Microbiologia, anteriormente designada "Society of American Bacteriologists" aqui apenas referida pela sigla S.A.B.[5].

Além de emprego de métodos adequados, é necessário, assegurar-se da boa proveniência dos corantes, destacando-se aqueles estandardizados em função do emprego a que se destinam, como os antigos corantes alemães de marca Gruber e Hollborn, os da "British Drug House" e os corantes modernos certificados pela "Biological Stain Commission"[2, 4].

O preparo de fórmulas, a partir de soluções saturadas é frequentemente referida. A Tabela I, mostra a concentração aproximada dos corantes mais comuns em solução aquosa e alcoólica, havendo variações de solubilidade entre diversas marcas. Em rotina é útil empregar corantes, de concentração conhecida, próxima do ponto de saturação, com resultados igualmente satisfatórios, quando se pretende soluções saturadas. Essas mesmas soluções, quando estáveis, podem ser mantidas em estoque, partindo-se das mesmas para o preparo de diversas fórmulas corantes.

TABELA I

Concentração aproximada de alguns corantes em solução saturada, à temperatura ambiente *

Corante	Solubilidade %	
	Água	Álcool a 95%
Ácido pícrico	1,1	8,9
Auramina 0	0,74	4,4
Azul de metileno, Cloreto	3,0-4,5	1,4-1,8
Azul de toluidina 0	3,4-5,9	0,3-0,5
Azul Vitória		
4 R	3,2	20,5
Novo R	0,5	4,0
Crisoidina Y	0,6-0,8	1,3-2,2
Cristal violeta (Violeta de genciana)		
Cloreto	0,2-1,0	8,3-10,0
Iodeto	0,03	1,7
Fucsina básica		
Pararosanilina, cloreto	0,2-0,3	3,7-5,9
Rosanilina, cloreto	0,3-0,5	6,25-8,1
Nova fucsina, cloreto	1,13	3,2
Pardo Bismarck Y	1,2-3,1	0,4-1,0
Safranina 0	2,1-4,3	2,1-2,7
Tionina	0,25	0,25
Verde malaquita, oxalato	7,6	7,5
Violeta de metila (Violeta de genciana)	2,9	15,2

(*) Adaptado de Conn[4] e Conn & col.[5]

A — PREPARO DE ESFREGAÇOS

Há numerosas formas de preparação de esfregaços, muitas delas dependentes da finalidade a que se destinam. Um ítem essencial, em todos os casos é, porém, a limpeza escrupulosa das lâminas, com remoção de matérias graxas, que dificultam a livre disposição das células e alteram os seus grupamentos característicos. Lâminas novas e limpeza em soluções oxidantes ácidas é sempre recomendável, desde que os resíduos ácidos sejam, completamente removidos, pois a acidez residual pode alterar algumas colorações. A conservação das lâminas, após limpeza, em solventes graxos (álcool, éter, etc.) pode, eventualmente, ser contraproducente, pois esses solventes, quando não sejam de grau de pureza adequada, podem, eles mesmos, conter contaminantes lipídicos, que aderem às lâminas.

Quando não sejam descritas maneiras especiais, o esfregaço deve, de preferência, ser preparado a partir do crescimento na superfície de meios sólidos, fazendo uma suspensão em água, até atingir leve opalescência. Depositar uma gota em lâmina e deixar secar. Quando o cultivo em meio líquido é mais favorável ao crescimento e à apreciação do grupamento das células como ocorre com *Streptococcus*, os melhores resultados são alcançados com a obtenção do sedimento e suspensão em água, da maneira acima descrita. Ressalvadas raras bactérias halófilas [14] o grau de lise eventual em água não prejudica a observação.

A fixação da suspensão é realizada, passando a lâmina, por três vezes, através a chama do bico de Bunsen, com o esfregaço para cima. Devido a relativa rigidez da parede das bactérias esse processo é habitualmente suficiente. Em alguns casos porém, particularmente nos processos citológicos, recomenda-se a fixação por agentes químicos, para a coagulação de certos componentes como se faz com células superiores.

B — COLORAÇÃO SIMPLES

Corresponde à coloração que habitualmente não põe em evidência características diferenciais da célula bacteriana, permitindo apenas a apreciação da forma e do grupamento das células, além do seu tamanho. Em muitos casos, a mesma apreciação pode ser feita por coloração de contraste através da nigrosina, como descrito adiante.

I — Soluções corantes:

1 — *Fucsina fenicada de Ziehl*, recomendado, S.A.B.[5]:

Solução A:
Fucsina básica (90% de corante) 0,3 g
Álcool etílico (95%) ..... 10 ml

Solução B:
Fenol ..... 5 g
Água destilada ..... 95 ml
(Misturar A e B)

2 — *Azul de metileno alcalino de Loeffler*, recomendado, S.A.B.[5]:

Solução A:
Azul de metileno (90% de corante 0,3 g
Álcool etílico (95%) ..... 30 ml

Solução B:
Solução aquosa de KOH a 0,01% 100 ml
(Misturar A e B)

3 — *Cristal violeta fenicado de Nicolle*, usada como alternativa pela S.A.B.[5]:

Solução A:
Cristal violeta (90% de corante 0,4 g
Álcool etílico (95%) ..... 10 ml

Solução B:
Fenol ..... 1 g
Água destilada ..... 100 ml
(Misturar A e B)

Execução:

a) Cobrir o esfregaço com qualquer das soluções acima, entre 5-60 segundos.

b) Lavar em água, enxugar, e observar com imersão.

Resultado:

Variável segundo o germe e a intensidade de coloração. Assim, a fucsina de Ziehl, tende a corar muito intensamente, resultados melhores sendo às vezes obtidos com sua diluição a 1/5 ou 1/10. O azul de metileno pode, principalmente quando velho, mostrar coloração seletiva de grânulos metacromáticos, mas de um modo geral a coloração da célula bacteriana mostra-se uniforme. Quando convenientemente diluídos, no entanto, alguns bacilos mostram um aspecto vacuolado (*Bacillus megatherium*, *Bacillus cereus*) o que parece corresponder à disposição de inclusões de natureza lipídica [26].

II — Coloração de contraste

Nesse caso, não são utilizadas soluções corantes, mas suspensões coloidais de diversos pigmentos ou matérias coradas como a nigrosina, a tinta Nankim ou o vermelho Congo. O material corado deposita-se em torno dos corpos celulares, evidenciando-lhes a forma e arranjo, além do tamanho das células, as quais, habitualmente, mostram-se maiores, do que com os processos de coloração. Isto se deve a que não há penetração da parede celular bacteriana a qual, ao contrário, é permeada mas não corada, pelos corantes verdadeiros.

O processo usado com maior frequência e com resultados mais reprodutíveis corresponde ao emprego da nigrosina.

Nigrosina de Dorner [5]

Nigrosina solúvel em água (certificada)	10 g
Água destilada	100 ml

Aquecer em banho-maria fervente durante 30 minutos. Deixar esfriar e acrescentar 0,5 ml de formalina, como preservativo. Filtrar duas vezes em papel e guardar em tubos ou frascos pequenos bem fechados, na geladeira.

Execução:

Preparar um esfregaço como descrito anteriormente, deixar secar e fixar.

Colocar pequena gota da suspensão de nigrosina sobre a lâmina, por fora da borda do esfregaço. Aplicar um palito ou tubo capilar (de uma pipeta Pasteur) lateralmente sobre a gota de nigrosina, e fazê-la deslizar cobrindo o esfregaço, a maneira da distensão de uma gota de sangue. Secar e examinar.

Resultados:

A percepção da forma e do arranjo é superior à obtida com colorações simples em grupos bacterianos nos quais o último aspecto é de importância diagnóstica como nos cocos Gram-positivos, particularmente tétrades, e em bacilos Gram-positivos como corinebactérias.

C — COLORAÇÕES DIFERENCIAIS

I — Coloração de Gram

Há muitas modificações, para esse método. A modificação abaixo é a mais simples para o estudo de culturas puras. Para a coloração de bactérias em exsudatos, de culturas fortemente ácidas ou de germes dotados de certa labilidade em relação ao Gram, outros métodos como os de Burke ou de Kopeloff & Beerman são mais particularmente recomendados [5].

A — *Cristal Violeta com oxalato de amônio*

Solução A:

Cristal Violeta (90%)	2 g
Álcool etílico (95%)	20 ml

Solução B:

Oxalato de amônio	0,8 g
Água destilada	80 ml

(Misturar A e B)

Optativamente pode ser usado o cristal violeta de Nicolle, cuja fórmula já foi apresentada, mas que é menos estável nas condições de rotina.

B — *Lugol*

Iodo	1 g
Iodeto de potássio	2 g
Água destilada	300 ml

C — *Corante de fundo*

Safranina 0 (2,5% em álcool a 95%)	10 ml
Água destilada	100 ml

Uma solução fraca de fucsina (Fucsina de Ziehl diluida a 1/10) pode ser também usada.

Execução:

1 — Cobrir o esfregaço com a solução de cristal violeta, 1 minuto.
2 — Lavar em água rapidamente (2 segundos).
3 — Cobrir com Lugol, 1 minuto.
4 — Lavar em água corrente e enxugar com papel.
5 — Descorar com álcool etílico, até que o solvente não escorra obviamente corado da lâmina.
6 — Lavar com água corrente.
7 — Contrastar com safranina, 30 segundos.
8 — Lavar com água corrente.
9 — Secar e examinar.

Resultado:

Gram-positivos em roxo e Gram-negativos em vermelho-laranja. Em exsudatos, é preferível substituir o álcool etílico, por uma solução à 30% de acetona em álcool. Para germes Gram lábeis, utilizar culturas recentes, isto é, em fase ativa de crescimento, em meios desprovidos de carboidratos fermentáveis, ou meios tamponados.

II — Coloração de bacilos álcool-ácido-resistentes

1 — *Método de Ziehl-Neelsen*, recomendado, S.A.B.[5]:

a) Corar o esfregaço 3-5 minutos com fucsina de Ziehl aquecendo até leve emissão de vapores.
b) Lavar em água.
c) Descorar com álcool etílico a 95% contendo 3% (V/V) de ácido clorídrico concentrado.
d) Lavar em água.
e) Contrastar com solução de azul de metileno.
f) Lavar em água, secar e examinar.

A seguinte fórmula é conveniente para o azul de metileno a ser usado no método de Ziehl.

Solução alcoólica a 1% de azul de metileno	30 ml
Água	100 ml

Muitos investigadores preferem diluir ainda mais (1/5 a 1/20) a solução acima.

Resultado:

Bacilos álcool-ácido-resistentes em vermelho. Os demais em azul. É difícil o descoramento em escarros muito mucosos. Nesses casos a solução mais forte do azul de metileno, é preferível para a coloração de fundo, pois aparentemente desloca a fucsina não removida pelo solvente[10]. Nessas circunstâncias evitar esfregaços espessos.

2 — *Método de Osol*[17]

a) Cobrir o esfregaço com fucsina de Ziehl e aquecer, até quase ebulição, durante 3 1/2 minutos.
b) Descorar com solução aquosa de ácido sulfúrico a 10% até o esfregaço ficar transparente.
c) Lavar com uma mistura de 5 partes de solução aquosa de sulfito de sódio a 10%, e uma parte de álcool a 96%.
d) Lavar rapidamente com água e deixar secar sem contraste.

Resultado:

Bacilos vermelhos em campo incolor. No processo original não se indica a lavagem final em água, mas essa oferece vantagens, evitando formação de cristais de sulfito de sódio. É indicado fazer esfregaços de escarro e exsudatos e, nesse caso, visto ao microscópio, o fundo da preparação aparece habitualmente amarelado e de fácil focalização. Com outros materiais, pode-se obter ligeiro contraste corando o fundo, extemporaneamente, com Lugol ou solução de ácido pícrico. Para escarros e exsudatos os resultados obtidos são considerados superiores aos obtidos com a coloração de Ziehl-Neelsen[6] mas, como nesse último, há também dificuldade de descoramento com escarros mucosos.

3 — *Coloração fluorescente com auramina*

O método de Lempert, como descrito por St Hill[27] oferece resultados muito satisfatórios. Obviamente deve ser utilizado microscópio equipado para microscopia de fluorescência, podendo a observação ser realizada em campo claro ou campo escuro, com filtro amarelo, na ocular.

Solução de auramina fenolada — aquecer a 40°C 100 ml de uma solução de fenol a 3% em água destilada. Juntar pouco a pouco 0,3 g de auramina agitando vigorosamente. Manter a agitação durante 10 minutos. A solução turva é filtrada, podendo o filtrado límpido ser usado até três semanas.

Solução álcool-ácida descorante

Ácido clorídrico concentrado	0,5 ml
Cloreto de sódio	0,5 ml
Álcool metílico	75 ml
Água destilada	25 ml

Corante de contraste — Solução de permanganato de potássio a 0,1% em água destilada. Manter em frasco escuro bem fechado e abandonar quando forma precipitação em excesso.

Execução:

a) Corar com auramina fenolada, a quente, durante 4 minutos.
b) Lavar com água corrente.
c) Descorar por 4 minutos.
d) Lavar bem com água.
e) Contratar por 3 segundos com permanganato.
f) Lavar, secar e observar.

Resultado:

O bacilo pode ser morfologicamente definido com o emprego da objetiva a seco de maior aumento. Se utilizado campo escuro, ou objetiva de imersão, empregar óleo de imersão não fluorescente ou glicerina. As vantagens eventuais da microscopia de fluorescência sobre a clássica coloração de Ziehl-Neelsen para o diagnóstico da tuberculose são discutidos por Darzins[6].

III — Coloração bipolar para pasteurelas

A coloração mais intensa das extremidades de cocobacilos Gram-negativos menos delgados, particularmente da *Pasteurella pestis* é considerada típica, e pode ser observada com muitas das colorações simples, particularmente com o azul de metileno, e mesmo com o método de Gram. No entanto, dá-se preferência para esse propósito ao corante policromático de Wayson. A fórmula abaixo é descrita por SCHAUB & col.[24].

Corante de Wayson

Fucsina básica	0,20 g
Azul de metileno	0,75 g
Álcool absoluto	20 ml

Dissolver os corantes no álcool e juntar a 200 ml de solução de fenol em água destilada. Filtrar.

Execução:

a) Fixar o esfregaço, cobrindo com álcool etílico comercial. Inflamar o álcool esperando até apagar-se a chama.

b) Cobrir com o corante de Wayson durante alguns segundos.

c) Lavar com água e deixar secar.

Resultado:

Células com tonalidade azulada, densamente coradas nas extremidades, às vezes dando a impressão de vacúolo central. Resultados inferiores são obtidos com a fixação comum, passando o esfregaço na chama de Bunsen. Todavia, com a fixação pelo álcool inflamado muitos outros gêneros bacterianos, particularmente bastonetes curtos como *Klebsiella, Serratia,* e outras enterobactérias, mostram facilmente coloração bipolar.

Uma alternativa para o corante de Wayson que fornece resultados satisfatórios, fácil de preparar extemporaneamente em qualquer laboratório de rotina, é descrita por GOLDENBERG & col.[11].

Fenol líquido	0,2 ml
Fucsina de Ziehl	0,5 ml
Azul de metileno de Loeffler ...	4,0 ml

D — TÉCNICAS DE IMPREGNAÇÃO PARA ESPIROQUETAS

I — Método de Fontana-Tribondeau, recomendado, S.A.B.[5].

Fixador — Solução de ácido acético a 10% [28] ou, alternativamente, o líquido de RUGE [2]:

Ácido acético glacial	1 ml
Formalina	2 ml
Água destilada	100 ml

Mordente — Solução a 5% de ácido tânico em água fenolada a 1%.

Nitrato de prata amoniacal — Dissolver 5 g de nitrato de prata em 10 ml de água destilada. Separar cerca de 5 ml desta solução e, ao restante, acrescentar, gota a gota, solução concentrada de amônia, agitando sempre, até que um precipitado castanho que se forma, volte a se dissolver. Juntar então, gota a gota, parte da solução original de nitrato de prata, que se havia separado, até que se forme uma leve turvação, que persiste com a agitação.

Execução:

a) Fazer esfregaço fino e fixar por 3 a 5 minutos com ácido acético, ou por 1 a 3 minutos com o líquido de Ruge.

b) Lavar com água destilada.

c) Cobrir com a solução mordente e aquecer até a emissão de vapores por 30 segundos.

d) Lavar cuidadosamente com água durante 30 segundos.

e) Cobrir com a solução de nitrato de prata e aquecer até a emissão de vapores, deixando permanecer 20 a 30 segundos.

f) Lavar com água corrente, secar e examinar.

Resultado:

Espiroquetas (treponemas, borrelias, leptospiras) em marron escuro, em um campo de tonalidade amarela ou marron claro. Do ponto de vista do diagnóstico o método, embora tradicional, é severamente criticado por alguns autores [30].

II — Método de Ryu [21]

1 — Solução de bicarbonato de sódio a 5%.

2 — Solução de fucsina básica — utilizar solução saturada (aproximadamente 3%) em álcool a 95%. Na hora do uso diluir a 1:9 com água destilada.

Execução:

a) Fixar, introduzindo a lâmina com o esfregaço em solução aquosa a 1% de formalina durante 1 minuto. Escorrer (não é necessário lavar).

b) Cobrir o esfregaço com a solução de bicarbonato, contando o número de gotas necessárias. Imediatamente acrescentar 10 gotas da solução de fucsina para cada gota de bicarbonato. Procurar misturar, deixando agir por 5 minutos.

c) Lavar, secar, e examinar.

Resultado:

Espiroquetas em vermelho intenso, sobre fundo rosado. A simplicidade do método torna-o indicado no controle de culturas de leptospiras e treponemas cultiváveis. No diagnóstico de lesão sifilítica primária, os resultados foram nas nossas mãos inferiores ao método de Fontana. Todavia, STURDZA & SAFIRESCO [28] em detalhada investigação sobre coloração de espiroquetas, consideram-no entre os mais satisfatórios. O método mostrou-se aparentemente adequado para a enumeração de espiroquetas da boca [1].

E — EVIDENCIAÇÃO DE CÍLIOS

Como comentado na introdução, é considerada entre as técnicas de mais difícil execução, exigindo habilidade e rigor técnico acima do comum. O controle de circunstâncias habitualmente desprezadas em outros casos, pode ser aqui, muitas vezes, essencial. Por isso nos deteremos em algumas recomendações.

Preparo de lâminas — Se possível usar apenas lâminas novas e, de preferência Pyrex ou outro vidro resistente ao calor. Limpar as lâminas em solução sulfocrômica, lavar com água e, em seguida com álcool a 95%. Enxugar com pano bem absorvente (enxugar não é necessário, mas é recomendável, a não ser que se use novas quantidades de álcool para poucas lâminas).

Flambar cada lâmina, com movimentos para diante e para trás em uma chama, até que esta comece a adquirir coloração laranja.

A não ser que se empreguem lâminas resistentes ao calor, deixar esfriar lentamente. Um método satisfatório para tanto é colocar as lâminas recém-aquecidas em uma placa de metal (com o lado diretamente aquecido para cima) sobre um recipiente com água em ebulição, deixando-se, em seguida, esfriar sobre esse local.

O processo acima é recomendado pela S.A.B.[5] mas não havendo lâminas termoresistentes, haverá dificuldades no relativo à flambagem acima descrita. Resultados um pouco menos satisfatórios temos obtido empregando lâminas novas, que são inicialmente limpas com água e sabão. A seguir são colocadas em um bequer, com solução sulfocrômica recentemente preparada e aquecidas durante 15 a 20 minutos até quase fervura. Para evitar acidentes o bequer pode ser colocado em banho de areia em recipiente metálico. As lâminas podem ser conservadas no bequer tapado após resfriamento até o momento do uso. Retiram-se as lâminas para vários banhos de água da torneira em jarras de coloração, terminando com água destilada. Utilizar pinças, nunca tocando as lâminas com as mãos. Deixa-se secar ao ar, inclinadas sobre papel filtro. Flambar passando cada face voltada para baixo 6 vezes na chama.

Preparo do esfregaço — Há vários métodos que, nesse particular, atendem às reconhecidas dificuldades em obter boa dispersão das células, sem distorção dos flagelos.

Um processo que oferece resultados regulares consiste em:

a) Tomar com alça ou bastão fino, de vidro, pequena quantidade do crescimento úmido, logo acima da água de condensação, em uma cultura recente (18 horas) em agar inclinado.

b) Submergir a ponta da alça ou bastão em um pequeno volume de água destilada estéril (1 a 2 ml) e incubar à temperatura ótima para o microrganismo por 10 a 15 minutos.

c) Após desprendidas do bastão, observar entre as bactérias em suspensão, a ocorrência de formas móveis, por meio de gota pendente.

d) Com pipeta capilar retirar uma pequena gota da superfície da suspensão e colocar na extremidade de uma lâmina devidamente preparada, inclinando-a de modo a que a gota escorra lentamente, no sentido longitudinal. Deixar secar com a lâmina em posição inclinada. Podem ser superpostas duas ou três gotas, na mesma lâmina, dependendo da densidade da suspensão utilizada.

Acreditamos útil a adição de uma ou duas gotas (0,1 ml) de formalina de boa qualidade entre as etapas c) e d) acima a fim de preservar melhor a disposição dos cílios na célula.

Outro método, descrito a seguir, devido a DOWSON [7], tem dado resultados reprodutíveis mesmo nas mãos de pessoas inexperientes.

1 — Um pedaço de papel celofane autoclavado em água destilada é colocado na superfície de uma placa de agar. Pode-se secar por algum tempo na estufa.

2 — Inocula-se uma cultura em meio líquido, espalhando-se sobre o celofane com um bastão de vidro ou com a ponta de uma pipeta.

3 — Incuba-se à temperatura adequada, de um dia para o outro, ou por mais tempo, de acordo com o germe.

4 — Obtido o crescimento retira-se a membrana de celofane, coloca-se em placa de Petri e cobre-se com água destilada (10-20 ml) deixando o crescimento desprender por 30 minutos.

5 — Adiciona-se 1 ml de formalina para matar e fixar as bactérias. A suspensão é transferida cuidadosamente para um tubo que pode ser conservado na geladeira por muito tempo.

6 — Para o uso dilui-se uma gota dessa suspensão espessa, em água destilada, para obter leve opalescência.

7 — Coloca-se uma gota na extremidade de uma lâmina adequadamente preparada, e inclina-se de modo a que a gota escorra no sentido longitudinal à lâmina, deixando-se secar ao ar, em posição inclinada.

I — Método de Bailey, modificado por Fisher & Conn

Segundo a S.A.B.[5] embora mais elaborado parece o mais reprodutível, em particular para bactérias dotadas de cílios finos e quebradiços, ou de camada mucosa que interfira com a evidenciação. Acreditamos ser o mais reprodutível, em que pesem as excelentes preparações devidas a LEIFSON[14] com o emprego do seu método.

Solução A:

Ácido tânico (sol. aquosa a 10%)	9 ml
$FeCl_3.H_2O$ (Sol. aquosa a 6%) ..	3 ml

Solução B:

Solução A	3,5 ml
Fucsina básica (0,5% em álcool)	0,5 ml
HCl concentrado	0,5 ml
Formalina	2,0 ml

Execução:

a) Filtrar a solução A diretamente sobre a lâmina e deixar por 3 1/2 minutos.

b) Deixar escorrer e, sem lavar, acrescentar a solução B, também através filtração. Deixar por 7 minutos.

c) Lavar com água destilada.

d) Antes que seque a lâmina, cobrir com Fucsina de Ziehl por 1 minuto, aquecendo até a mais leve possível emissão de vapores.

e) Lavar com água, secar ao ar e examinar.

Resultados:

Células e flagelos em vermelho sobre fundo finamente granuloso.

II — Método de Rhodes[18]

Consiste em uma das muitas modificações do método de impregnação argêntica de Fontana-Tribondeau, adaptado à evidenciação de cílios. Por sua facilidade de execução e reprodutibilidade, sobretudo em relação a pseudomonas e grupos bacterianos relacionados (Figura 1), é um dos que melhor servem a propósitos de ensino.

Mordente: preparar na hora de uso juntando:

Ácido tânico, solução a 10%	10 ml
Alumen de potássio, solução aquosa saturada	5 ml
Óleo de anilina, solução aquosa saturada	1 ml

Dissolver, por agitação, o precipitado que se forma. Completar com:

Cloreto férrico, solução a 5%	1 ml

Nitrato de prata amoniacal a 5%, como descrito anteriormente no método de Fontana.

Execução:

a) Preparar esfregaço como descrito.

b) Filtrar o mordente sobre o esfregaço deixando por 3 a 5 minutos.

c) Lavar abundantemente com água.

d) Cobrir com solução de nitrato de prata e aquecer suavemente até emissão de vapores, durante 3 a 5 minutos.

Resultado:

Células castanho-escuro e cílios mais claros em fundo granuloso.

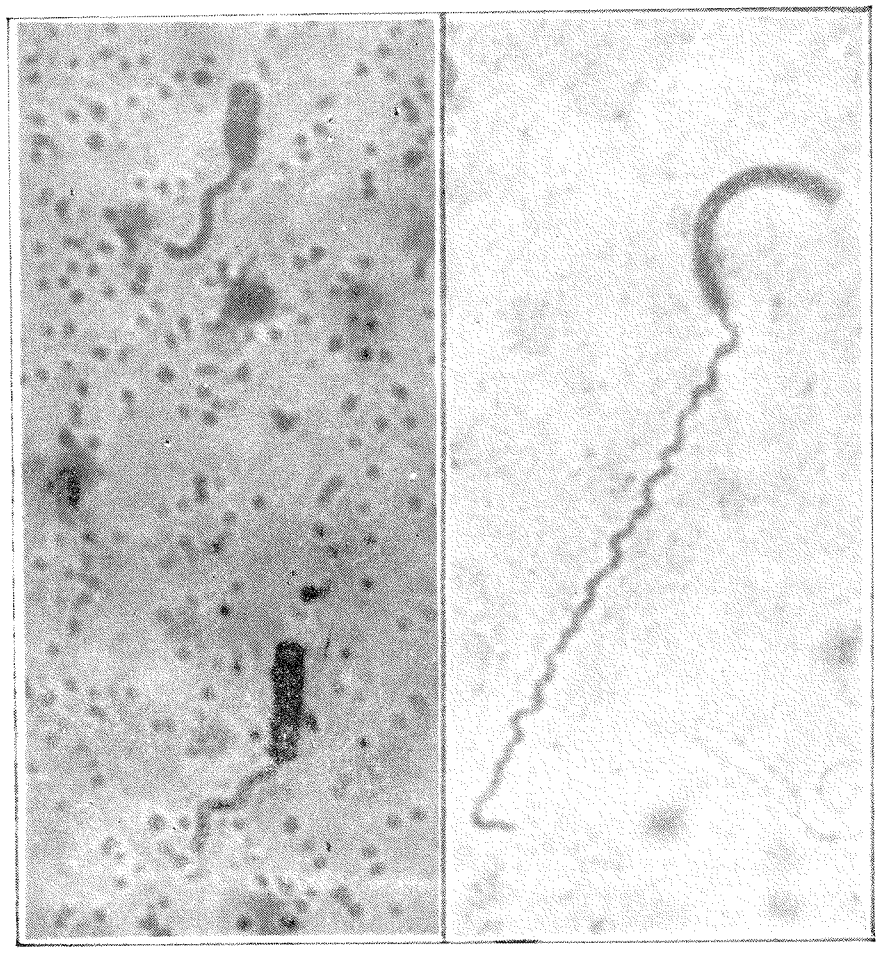


Fig. 1 — Evidenciação de cílios em *Aeromonas sp.* pelo método de Rhodes [18]

F — DEMONSTRAÇÃO DA CÁPSULA BACTERIANA

Meios para o desenvolvimento de cápsulas — Muitas culturas bacterianas são normalmente encapsuladas em qualquer meio que propicie um bom crescimento. Em casos não menos numerosos, porém, os melhores resultados são obtidos utilizando cultivos em meios que favorecem o desenvolvimento dessas estruturas.

O meio seguinte é adequada ao desenvolvimento de muitas espécies bacterianas. Baseia-se em que certas cápsulas são facilmente produzidas em meios com excesso de certos carboidratos utilizáveis (sacarose, maltose) em relação às fontes de nitrogênio [8]. Para germes mais exigentes é conveniente a adição de soro ou líquido ascítico.

Meio de Worfel-Ferguson [9]

Cloreto de sódio	2,0 g
Sulfato de potássio	1,0 g
Sulfato de magnésio	0,25g
Sacarose	20,0 g
Extrato de levedura	2,0 g
Agar	15,0 g
Água destilada	1000,0 ml

Certos autores julgam conveniente o emprego deste meio, sob forma líquida, com a omissão do agar. Para amostras encapsuladas de germes coliformes, excelente resultado obtém-se com o emprego do meio de Holt-Harris & Teague (E.M.B. Agar).

Finalmente, para algumas amostras que produzem excesso de material mucoso frouxo, pode ser prejudicial o emprego de meios que estimulam a síntese do material capsular, preferindo-se os cultivos que permitem uma camada mucosa mais firme, embora mais discreta.

I — Método de coloração para cápsula

Obter o crescimento do germe em um meio adequado ao desenvolvimento de cápsulas. Suspender em uma gota de soro sanguíneo e espalhar em camada muito delgada sobre a lâmina. Fixar por leve aquecimento ou, melhor ainda, por tratamento com formalina comercial pura, até observar-se opacificação do esfregaço (coagulação do soro). Lavar em água e corar rapidamente.

Método de Hiss, recomendado, S.A.B.[5].

Corante: Solução aquosa de cristal violeta a 0,1%.

Execução:

a) Cobrir com o corante, com aquecimento suave até emissão de vapores.

b) Lavar com solução aquosa de sulfato to de cobre ($CuSO_4.5H_2O$) a 20%, rapidamente.

c) Secar com papel, sem lavar, e examinar.

Resultado:

Células em roxo e cápsulas em azul violáceo pálido com maior intensidade de coloração na periferia.

II — Demonstração em negativo da cápsula bacteriana

Os métodos de coloração de cápsula são considerados menos confiáveis na demonstração dessa estrutura, devido à sua pouca afinidade por corantes e, porque, os processos de fixação, introduzem distorções grosseiras dada a sua pequena consistência. Em pormenorizada investigação sobre esses métodos, DUGUID[8] concluiu pela maior utilidade e segurança da demonstração da cápsula, em negativo, usando tinta Nankim como contraste, em preparações úmidas entre lâmina e lamínula. Um método com igual vantagem, mas de maior reprodutibilidade é descrito a seguir:

Método de amido[29].

a) Colocar sobre a lamínula uma gota de suspensão a 4% de amido solúvel "Reagen" e juntar uma alçada do crescimento bacteriano obtido em meio sólido.

b) Sobre a lâmina colocar uma gota de água, contendo 0,1% de gelose (para aumentar a viscosidade) e juntar, com auxílio de pipeta capilar, uma gota de solução iodo-iodetada diluida para a concentração final de 0,25-0,5% de iodo. Misturar.

c) Inverter a lamínula sobre a gota de Lugol na lâmina e focalizar os campos mi-

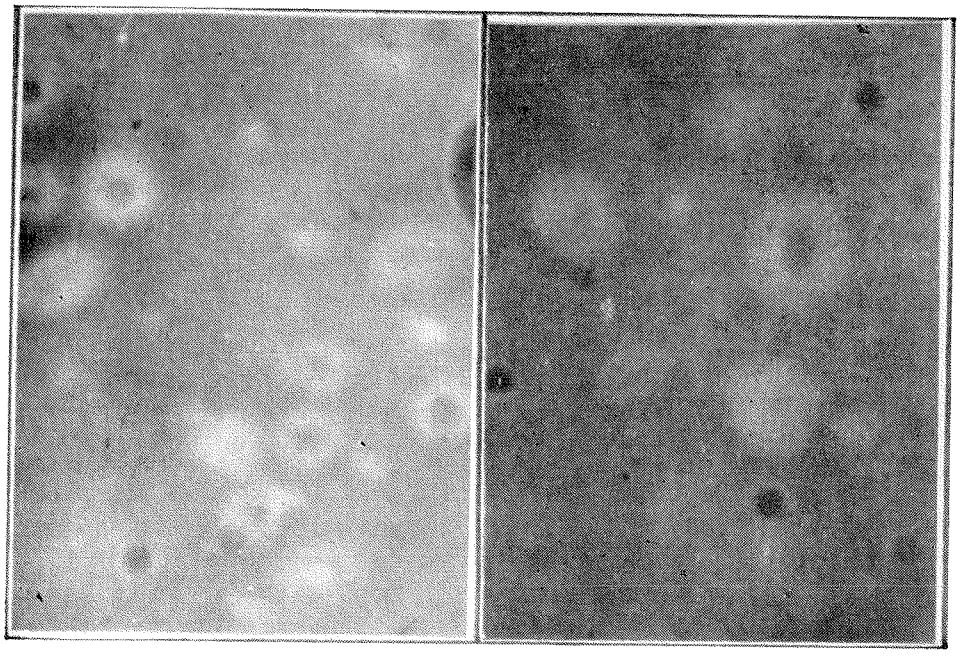


Fig. 2 — Demonstração em negativo da cápsula de *Klebsiella* e *Enterobacter* pelo método do amido (Suassuna & Pabst[29])

croscópicos em que se observe com maior nitidez a gelificação do amido.

Resultado:

Cápsulas delineadas pelo amido gelificado corado em azul. Não se deve exercer forte pressão sobre a lamínula pois há fragmentação do gel de amido corado, que, no entanto, retém os corpos bacterianos em seus fragmentos (Figura 2). Não há movimento browniano como no processo do Nankim. Os melhores resultados têm sido obtidos com o amido "Reagen". Certas marcas de amido solúvel podem ter sofrido hidrólise excessiva, dando tonalidades avermelhadas e não produzindo gel consistente pelo tratamento com o Lugol.

G — COLORAÇÃO DA PAREDE CELULAR

Ao serem observados os processos habituais de coloração, as bactérias apresentam tamanho menor que o real, como comentado ao discutir-se a coloração negativa, por não evidenciarem suas paredes celulares que não tomam os corantes básicos comuns. Para por em evidência a parede celular, é necessário utilizar corantes adequados e usar de processos que de algum modo antagonizem a hipercromasia da membrana celular e do citoplasma subjacentes. Isto em geral é obtido pelo emprego de mordentes, destacando-se o ácido tânico, em solução entre 5 a 10%, entre outros e, sobretudo, o ácido fosfomolibdico, utilizado por HALE [12]. Entre os corantes, emprega-se o cristal violeta, o verde de metila e, melhor ainda o azul Vitória [23].

I — Método de Robinow [19]

a) Líquido de Bouin:

Solução aquosa saturada de ácido pícrico	75 ml
Formalina	25 ml
Ácido acético	5 ml

Execução:

a) Fixar *in situ* cultivos em agar, com 20 horas, pela adição do líquido de Bouin. Cortar pequenos blocos de agar com o crescimento para fazer os esfregaços.

b) Preparar esfregaços por impressão em lamínula, e lavar em álcool e água para remover a coloração amarelada do ácido pícrico.

c) Tratar por 20-30 minutos com solução de ácido tânico a 10%.

d) Lavar em água.

e) Corar com solução diluída de cristal violeta (cerca de 0,02%) 10 segundos.

f) Lavar e montar sobre lâmina, com uma gota de água, e examinar com imersão.

Resultado:

O tratamento pelo ácido tânico reduz grandemente a afinidade do citoplasma pelos corantes básicos, pelo que, só a periferia da célula, na parte correspondente à parede aparece corada.

A coloração é adequada para bactérias dos gêneros *Bacillus, Propionibacterium* e *Corynebacterium*, e menos útil no relativo às enterobactérias.

Resultados superiores são obtidos com o emprego do azul Vitória em solução a 0,05% aplicado durante 20 a 40 minutos como proposto posteriormente pelo próprio ROBINOW e por MURRAY [16].

Nessas condições o contorno corado está, em realidade, formado pela parede e pela membrana celular, normalmente justapostas. A dupla natureza do contorno torna-se nitidamente visível, provocando-se uma retração do citoplasma por plasmólise, dessecação, ou tratamento prévio com o éter (ver MURRAY[16] e ROBINOW [20].

Obtemos paredes celulares isoladas, que se coram igualmente, rompendo mecanicamente a integridade da célula, com esvaziamento da massa citoplasmática, numa adaptação do processo devido a Weibull e descrito por ROBINOW [20]: colocar uma alçada do cultivo no gargalo de um frasco com rolha de vidro esmerilhado, bem ajustada. Fechar o frasco e fazer diversos movimentos de pressão e rotação da rolha para provocar o esmagamento das células. Recolher a massa celular por lavagem com água destilada. Preparar o esfregaço com a suspensão obtida, fixar, e corar como descrito.

II — Método de Hale

HALE [12] advoga que melhores resultados são obtidos evitando-se a fixação pelos agentes comumente usados. Prepara o esfregaço colocando uma mínima quantidade do crescimento bacteriano no centro de uma lamínula, espalhando por deslisamento sobre outra lamínula.

Execução:

a) Tratar pelo ácido fosfomolíbdico a 1%, 5 min (preparar na hora a partir de

solução estoque a 5%, filtrando-o em papel).
b) Lavar em água.
c) Corar pela solução aquosa a 1% de verde de metila.

Resultado:

O verde de metila é o corante mais recomendado por HALE, mas uma série de outros corantes podem ser também usados, sendo de salientar que pode haver variabilidade entre diversas partidas do próprio verde de metila. Resultados particularmente bons são obtidos com a solução de azul Vitória a 0,05%, já referida [23].

III — Método de Cassel

Para bactérias do gênero *Bacillus*, resultados muito bons são obtidos com este método. O processo serve, também, para demonstração do nucleóide bacteriano [3] e é descrito em conexão com esta última estrutura.

H — COLORAÇÃO DA MEMBRANA CITOPLASMÁTICA

Ao contrário da parede celular, a coloração seletiva da membrana citoplasmática é dificultada sobretudo pela sua hipercromasia, fazendo-a tomar quaisquer corantes, eventualmente destinados à coloração de outras estruturas. Normalmente a afinidade da membrana citoplasmática pelos corantes é compartilhada igualmente pelo citoplasma. Além do microscópio eletrônico, KNAYSI [13] baseando-se na maior sensibilidade do citoplasma à autólise, conseguiu demonstrar claramente a existência da membrana, com o emprego de colorações.

I — Método de Robinow [19]

a) Preparar o esfregaço de modo semelhante ao descrito para a parede celular.
b) Corar em Giemsa diluído (1 gota para 1 ml de água destilada).
c) Lavar e montar em água.

Resultado:

Observar a hipercromasia no contorno do citoplasma bacteriano.

II — Método de Knaysi [13]

Preparar um esfregaço em lamínula e montar sobre uma gota de Lugol forte.

Resultado:

A membrana aparece em pardo escuro e o citoplasma em amarelo.

I — COLORAÇÃO DO NUCLEÓIDE

Em tese, obedece aos mesmos princípios de demonstração do material cromatínico de células eucarióticas. No entanto, a sua revelação depende da hidrólise e remoção do ácido ribonucleico, em que o citoplasma da célula procariótica é relativamente muito mais rico do que o das células superiores.

I — Método de Robinow, recomendado, S.A.B.[5], ligeiramente modificado.

Tampão de fosfatos (pH 6,9-7,0):

a) K_2HPO_4, solução aquosa a 9,46g%
b) KH_2PO_4, solução aquosa a 0,06g%

Juntar 4 ml de a) e 1 ml de b) e completar o volume para 100 ml com água destilada. Verificar se o pH corresponde ao nível desejado.

Fixação e preparo do esfregaço:

a) Cultivar em agar, em placa de Petri entre 2-5 horas.
b) Remover um pedaço do agar com o crescimento, colocar sobre lamínula e expor (crescimento para cima) aos vapores de ácido ósmico a 2%. O tempo, segundo os germes, varia de poucos segundos a várias horas.
c) Fazer preparado por impressão em lamínula.
d) Conservar em álcool a 70% até a coloração.

Execução:

1) Remover a preparação do álcool e lavar em água.
2) Tratar por 5-10 minutos com HCl N/1 a 60°C.
3) Lavar em água corrente.
4) Corar entre 1 a 15 minutos, segundo o germe, com Giemsa diluído, em tampão de pH 7,0 a 37°C.
5) Montar em água e examinar por imersão.

Resultado:

Coloração intensa do material cromatínico que se sobressai no corpo bacilar. ROBINOW[19] indica também a coloração pelo azul de metileno, mas os resultados obtidos com 0,1% de tionina durante 40 segundos, nos parecem superiores a todos os demais corantes. Para uma determinada amostra bacteriana podem ser necessários várias tentativas, variando a idade do cultivo, o tempo de exposição aos vapores de ácido ósmico, e o tempo de hidrólise e de coloração.

II — Método de Cassel [3]

Esta técnica serve para a demonstração simultânea da parede e do núcleo bacteriano em microrganismos do gênero *Baccilus*.

1) Fazer o esfregaço, fixando em vapores de ácido ósmico, como descrito acima para a técnica de Robinow.

2) Tratar pelo HCl N/1 a 60°C, 7 minutos.

3) Lavar em água.

4) Corar com fucsina básica a 0,1% em água, 5 minutos.

5) Tratar pelo ácido tânico a 10% em água, 5 minutos.

6) Secar, ou montar em água, e observar com imersão.

Resultado:

Núcleo em vermelho e parede em róseo muito pálido. Embora limitados a germes do gênero *Bacillus*, os resultados nos parecem mais nítidos e reprodutíveis que os obtidos com o método anterior.

III — Método de Tulasne & Vendrely [32]

Esses autores empregam o tratamento das células pela ribonuclease, após fixação com o líquido de Chabaud. A concentração da enzima, tempo de ação e temperatura ótima, freqentemente, têm que ser determinados para cada germe. Um tempo de 15 a 60 minutos à temperatura de 60°C é aconselhado. Corar a seguir pelo Giemsa diluído.

Líquido de Chabaud:

Álcool a 80%	60 ml
Fenol	15 ml
Formalina	2 ml
Ácido acético	2 ml

Para o propósito descrito aplicar durante aproximadamente 5 minutos. Outros corantes, como a fucsina e o azul de metileno e, principalmente, a tionina podem substituir o Giemsa.

IV — Reação de Feulgen

Um processo simples para emprego dessa reação, frequentemente utilizada para a evidenciação dos corpos cromatóides das bactérias, é descrito por SALLE [22], com o emprego do líquido de Schaudinn como fixador.

Fixador de Schaudinn:

Solução saturada de bicloreto de mercúrio em solução salina a 0,85%	2 partes
Álcool etílico a 95%	1 parte
Ácido acético glacial q.s.p. ..	1%

Reagente de Schiff — O reativo descrito por SALLE [22] é ligeiramente diverso em modo de preparo e variável de acordo com certas partidas de fucsina. Uma fórmula de resultados mais constantes é a descrita a seguir [15]:

Ácido clorídrico 0,15 N	100 ml
Fucsina básica	1,0 g
Metabisulfito de sódio	1,9 g

Agitar a intervalos ou deixar em um agitador mecânico durante duas horas. Descorar com carvão e filtrar. Para obter o reagente perfeitamente claro é preciso usar carvão recentemente ativado. Ao contrário do que ocorre com outras técnicas em que é usada a fucsina básica, certas partidas do corante são mais adequadas que outras para o preparo desse reativo [4].

O reagente de Schiff precipita uma substância cristalina após algum tempo de conservação na geladeira. Isto é menos tendente a ocorrer, se o reagente for conservado em frascos pequenos quase totalmente cheios, usados um de cada vez. Elevando-se a concentração do HCl para 0.2 N ou baixando a proporção de fucsina para 0,5 g na fórmula dada, também tende a prevenir a formação de precipitado, sem prejuizo aparente da eficácia da preparação.

Execução:

a) Fixar o esfregaço com o líquido de Schaudinn, 5 a 10 minutos.

b) Hidrolizar com HCl normal por 5 minutos à temperatura ambiente, mais 5 min a 60°C e, novamente, 5 min à temperatura ambiente.

c) Lavar com água destilada.

d) Mordençar com solução de formalina a 2% durante 4 minutos.

e) Lavar em água destilada.

f) Aplicar o reativo de Schiff, por tempo variável.

g) Lavar com água e examinar.

Resultado:

Nucleóides em vermelho.

J — EVIDENCIAÇÃO DE INCLUSÕES LIPÍDICAS

O método descrito a seguir é o mais geralmente utilizado, satisfazendo plenamente aos propósitos práticos, particularmente no estudo e classificação do gênero *Bacillus*. A coloração simples pelo azul de metileno, como anteriormente descrita, pode servir para seleção de amostras bacterianas adequadas (ver secção B).

I — Método de Burdon, recomendado, S.A.B.[5]

Solução corante

Sudan Black B	0,3 g
Álcool a 70%	100 ml

Procurar dissolver a maior parte do corante por agitação, a intervalos. Deixar em repouso durante uma noite.

Execução:

a) Fazer esfregaços de cultura com 18 a 20 horas e fixar pelo calor.

b) Cobrir com o corante e deixar no ambiente entre 5 a 15 minutos. O corante pode ser deixado secar sobre a preparação.

c) Se o corante não estiver seco, escorrer e enxugar completamente com papel mata-borrão.

d) Lavar com xilol, gota a gota, ou por imersão em cuba de coloração. Enxugar com mata-borrão.

e) Contrastar com solução a 0,5% de safranina, durante 5 a 10 segundos. É preciso cuidado para não corar em excesso.

Resultado:

Granulações em azul escuro ou azul-acinzentado. O resto da célula em róseo.

K — COLORAÇÃO DE GRÂNULOS DE VOLUTINA

Apesar de haver uma grande variedade de processos para demonstração de inclusões de volutina (granulações metacromáticas), muitas delas, de fato, oferecem excelentes resultados. No entanto é particularmente des-

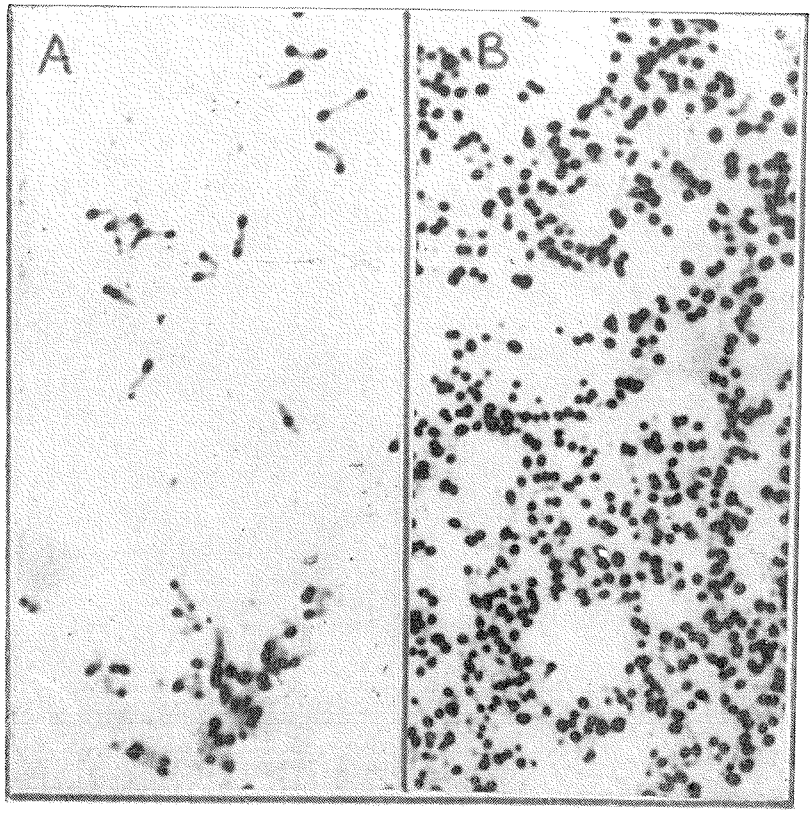


Fig. 3 — Granulações de volutina no bacilo diftérico, cultivado em meio do Loeffler (A) e no mesmo meio adicionado de 7% de glicerol (B). Coloração de Albert-Laybourn.

curada a influência das condições de cultivo no desenvolvimento dessas inclusões. Habitualmente, o desequilíbrio propiciado pela limitação da fonte de nitrogênio, em abundância do suprimento de carboidratos, favorece a formação de grânulos de volutina [25]. No caso particular do bacilo diftérico em que reside a maior importância prática da demonstração das granulações metacromáticas, a adição de cerca de 4 a 7% de glicerol aos meios clássicos com soro ou ovo coagulado resulta em grande estímulo da produção de volutina (Figura 3).

I — **Método de Albert-Laybourn,** recomendado, S.A.B.[5]

Corante:

Azul de Toluidina	0,15	g
Verde malaquita	0,20	g
Ácido acético glacial	1	ml
Álcool etílico a 95%	2	ml
Água destilada	100	ml

Lugol modificado:

Iodo	2,0	g
Iodeto de potássio	3,0	g
Água destilada	300	ml

Execução: (ligeiramente modificada)

a) Tratar o esfregaço pelo corante durante 5 minutos.
b) Lavar, muito rapidamente, com água.
c) Tratar pelo Lugol, 1 minuto.
d) Lavar em água, enxugar, e examinar.

Resultado:

Os grânulos metacromáticos em preto e os corpos bacilares em verde claro. A lavagem com água na etapa 2 acima não é usualmente referida, mas evita a formação de precipitados.

II — **Azul de metileno,** recomendado, S.A.B.[5]

Corar poucos segundos com solução de azul de metileno. Lavar e examinar.

Resultado:

Um pouco variável, de acordo com a natureza da solução de azul de metileno utilizada. O azul de metileno alcalino de Loeffler dá grânulos entre roxo e avermelhado, devido à oxidação do corante básico pelo álcali. Essa oxidação acentua-se naturalmente com o envelhecimento do corante, que é dito então "policrômico" [4]; alguns preferem outras soluções de azul de metileno (ver a empregada para o método de Ziehl) que mostram os grânulos em azul intenso e o corpo bacilar em azul mais pálido.

III — **Método de Ljubinsky,** recomendado, S.A.B.[5]

Os dois métodos acima são indiscutivelmente os mais geralmente usados. No entanto, apesar de sua simplicidade, o azul de metileno pode mostrar preparações pouco nítidas em função da partida de corante utilizada, e o método de Albert-Laybourn mostra certa tendência à formação de precipitados, que eventualmente perturbam a observação. Uma alternativa das melhores corresponde ao processo de Ljubinsky.

Corantes

1 — Metilvioleta 2B (ou cristal violeta) ..... 0,25 g
Ácido acético glacial ..... 5 ml
Água destilada ..... 100 ml

2 — Vesuvina (ou Bismarck Brown Y) ..... 0,1 g
Água desitilada ..... 100 ml

Execução:

a) Corar com solução 1 durante 1 min.
b) Lavar com água.
c) Corar com solução 2 durante 1 min.
d) Lavar com água.

Resultado:

Grânulos negro-azulados e corpo bacteriano róseo. Pode substituir-se o corante 2 por crisoidina resultando em grânulos negros e corpo bacteriano em amarelo claro [2].

IV — **Método de Wachstein & Pisano**

O presente método parece um dos mais sensíveis e específicos [32]. O esquema a seguir é descrito por Bier [2].

Execução:

a) Tratar por 5 minutos com solução de nitrato de chumbo a 10%.

b) Lavar em água.

c) Cobrir com solução de sulfeto de amônio a 1%.

d) Lavar em água.

e) Contrastar com solução aquosa a 1% de safranina, ou com fucsina diluída.

f) Lavar, secar e examinar.

Resultado:

Granulações negras, corpo bacteriano em vermelho ou róseo. Outros sulfetos alcalinos (Na ou K) podem ser usados em concentrações equivalentes (1 a 2%).

L — DEMONSTRAÇÃO DE ENDÓSPOROS

São normalmente observados pelo contraste negativo que apresentam em colorações simples ou na coloração de Gram. Com a coloração de Ziehl-Neelsen podem aparecer álcool-ácido resistentes (vermelho) no corpo bacilar azul.

O método de Dorner é baseado nessa aceitação da fucsina de Ziehl pelo esporo bacteriano, sendo os resultados mais constantes, os obtidos com o emprego da modificação de Snyder.

I — Método de Dorner, modificado por Snyder, recomendado S.A.B.[5]

a) Preparar um esfregaço, na forma convencional, e cobrir com um pedaço de papel filtro.

b) Verter a fucsina de Ziehl sobre o pedaço de papel até embebê-lo completamente.

c) Aquecer até emissão de vapores, mantendo o aquecimento adequado por 5 a 10 minutos. Manter o papel úmido por adição de mais corante.

d) Lavar com água.

e) Aplicar solução de nigrosina, como descrito nos processos de coloração negativa (Secção B-II).

f) Secar e examinar.

Resultado:

Células descoradas, no fundo azulado, devido à nigrosina. Esporos em vermelho. Resultados mais nítidos podem ser obtidos descorando ligeiramente com álcool a 95%, logo após a etapa c, uma vez que, eventualmente, a nigrosina não é capaz de adsorver todo o corante que não penetrou no esporo.

II — Método de Wirts, modificado por Conklim, recomendado, S.A.B.[5]

a) Cobrir o esfregaço com solução aquosa de verde malaquita a 5%, e aquecer até emissão de vapores por 10 minutos. Manter o volume líquido com a adição de mais corante.

b) Lavar com água por 30 segundos.

c) Contrastar com solução aquosa de mercúrio cromo a 5%, durante 1 minuto.

d) Lavar em água, enxugar e examinar.

Resultado:

As células em vermelho e os esporos em verde. De todos os métodos usados esse nos parece de resultados mais constantes.

SUMMARY

Selected techniques for staining and optical cytology of bacteria

Selected techniques for staining and optical demonstration of the bacterial structure, which have been tried by the authors, are described. Related to the most used coloration methods, their eventual value for medical diagnostic work is stressed, besides their usefulness for pure culture study.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAMMAN, L. L.; ARAUJO, W. C. de & PEDREIRA, R. A. — Bacteriologia do sulco gengival em relação ao índice periodontal e ao índice de higiene oral. *R. bras. Odont.*, 25:194-201, 1968.

2. BIER, O. — Bacteriologia e Imunologia. 10.ª ed. Edições Melhoramentos, São Paulo. 1961.

3. CASSEL, W. A. — A procedure for the simultaneous demonstration of the cell walls and chromatinic bodies of bacteria. *J. Bact.*, 62:239-241, 1951.

4. CONN, H. J. — Biological stains. 6th ed. Williams & Wilkins, Baltimore. 1953.

5. CONN, H. J.; BARTHOLOMEW, J. W. & JENNISON, M. W. — Staining Methods, p. 10-36. *In* Society of American Bacteriologists, Commitee on Bacteriological Technic. Manual of Microbiological Methods. McGraw-Hill, New York. 1957.

6. DARZINS, E. — The bacteriology of tuberculosis. University of Minnesota Press, Minneapolis. 1958.

7. DOWSON, W. J. — Plant disease due to bacteria. 2nd ed. The University Press, Cambridge. 1957.

8. DUGUID, J. P. — The demonstration of bacterial capsules and slime. *J. Path. Bact.*, 63:673-685, 1951.

9. EDWARDS, P. R. & EWING, W. H. — Identification of *Enterobacteriaceae*. Burgess Publishing Co., Minneapolis. 1955.

10. GIMENEZ, D. F. — Staining rickettsiae in yolk sac cultures. *Stain Technol.*, 39:135-140, 1964.

11. GOLDENBERG, M. I.; HUDSON, B. W. & KARTMAN, L. — *Pasteurella* infections. 1. *Pasteurella pestis*, p. 422-439. *In* H. L. BODILY, E. L. UPDYKE & J. O. MASON

(Eds.) — Diagnostic Procedures for Bacterial, Mycotic and Parasitic Infections. American Public Health Association, New York, 1970.

12. HALE, C. M. F. — The use of phosphomolybdic acid in the mordanting of bacterial cell walls. *Lab. Pract.*, **2**:115-116, 1963.

13. KNAYSI, G. — Elements of bacterial cytology. 2nd ed. Comstock Publishing Co., Ithaca, New York. 1951.

14. LEIFSON, E. — Atlas of bacterial flagellation. Academic Press, New York & London. 1960.

15. LILLIE, R. D. — Simplification of the manufacture of Schiff reagent for use in histochemical procedures. *Stain Technol.*, **26**:163-165, 1951.

16. MURRAY, R. G. E. — The internal structure of the cell. p. 35-96. *In* I. C. GUNSALUS & R. Y. STANIER (Eds.) The Bacteria, vol. I, Academic Press, New York. 1960.

17. OSOL, A. E. — Tuberkelbazillenfarbung im dicken Ausstrich. *Dtsch. med. Wschr.*, **53**: 1002-1003, 1927.

18. RHODES, M. E. — The cytology of *Pseudomonas* spp. as revealed by a silver-plating staining method. *J. gen. Microbiol.*, **18**:639-648, 1958.

19. ROBINOW, C. F. — Nuclear apparatus and cell structure of rodshaped bacteria, p. 355-377. *In* R. J. Dubos (Ed.) — The bacterial cell. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. 1955.

20. ROBINOW, C. F. — Outline of the visible organization of bacteria. p. 45-108. *In* J. Bracet & A. E. Mirsky (Eds.) The cell. Vol. IV. Academic Press, New York. 1960.

21. RYU, E. — A simple method for staining *Leptospira* and *Treponema*. *Jap. J. Microbiol.*, **7**:81-85, 1963.

22. SALLE, A. J. — Fundamental principles of bacteriology, 5th ed. McGraw-Hill, New York. 1961.

23. SCANGA, F. — La celula bacteriana (Traducción). Aguilar, Madrid. 1959.

24. SCHAUB, I. G.; FOLEY, M. K.; SCOTT, E. G. & BAILEY, W. R. — Diagnostic bacteriology. C. V. Mosby Co., St. Louis. 1958.

25. SMITH, I. W.; WILKINSON, J. F. & DUGUID, J. P. — Volutin production in *Aerobacter aerogenes* due to nutrient imbalance. *J. Bact.*, **68**:450-463, 1954.

26. SMITH, N. R.; GORDON, R. E. & CLARCK, F. E. — Aerobic sporeforming bacteria. Agriculture Monograph n.º 16, Dep. Agric. U. S. Government Printing Office, Washington, D.C. 1953.

27. ST. HILL, C. A. — Methods of staining, p. 105-118. *In* M. A. Soltys. — Tubercle bacillus and laboratory methods in tuberculosis. E & S. Livingstone, Edinburgh & London. 1952.

28. STURDZA, N. & SAFIRESCO, D. — Sur la colorabilité des leptospires et des tréponèmes. *Arch. roum. Path. exp.*, **23**:927-938, 1964.

29. SUASSUNA, I. & PABST, P. A. — Novo método para demonstração de cápsula bacteriana. *Ci. e Cult.*, **18**:201, 1966.

30. TURNER, L. H. — Leptospirosis. III. Maintenance, isolation and demonstration of leptospires. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, **64**:623-646, 1970.

31. VALEIRO, J. F.; SUASSUNA, I. & SERPA, C.E.V. — Efeito do glicerol e do telurito de potássio sôbre os grânulos metacromáticos e a morfologia do bacilo diftérico. *R. Soc. Bras. Med. Trop.*, **3**:237-244, 1969.

32. VENDRELY, R. — Histochimie du noyau et du cytoplasme bacterien, p. 82-107. *In* Symposium, Citologia Batterica. VI Cong. Internaz. Microbiol. Fondazione Emanuele Paterno, Roma. 1953.

Recebido para publicação em 8/2/1972.