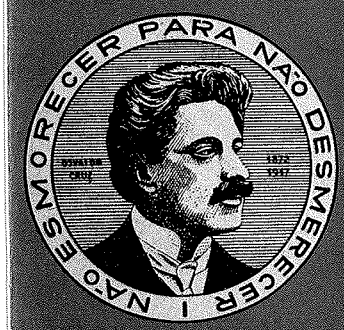
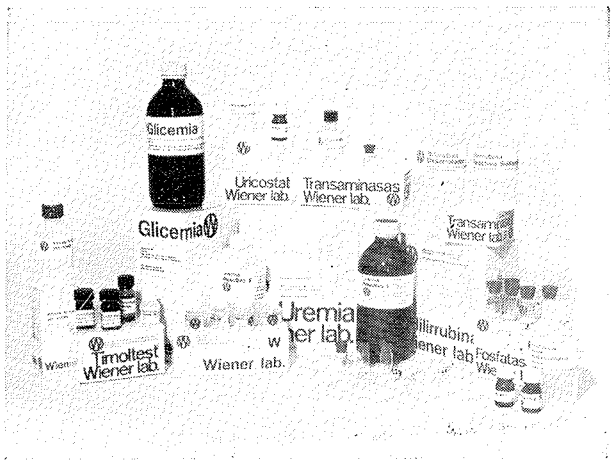
Vol. 3, n.º 3, p. 121-168
1972

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 3	Pág. 121-168	Julho / Setembro, 1972

CONTEÚDO

ARTIGOS ORIGINAIS

Pág.

Search of B-1 aflatoxin and similar fluorescent compounds in brazilian cassava-flour — ADHEMAR PURCHIO 121

Estudo bacteriológico de infecções entéricas em crianças até 2 anos, no município de Araraquara, SP — DEISE PASETTO FALCÃO 127

Método semi-quantitativo com alça bacteriológica calibrada para investigação epidemiológica da bacteriúria assintomática — N. J. LOURENÇO, L. B. COLLARES, P. A. PABST, H. DE A. CORDEIRO, D. R. GUIMARÃES, J. A. GERK, S. J. FERREIRA, J. F. DE S. OLIVEIRA, ALBA L. S. NOLETO & I. SUASSUNA 139

Estudo da flora microfúngica de uma área mineralizada de cobre, em Maragipe, E. da Bahia — REGINA M. RIBEIRO, HEBE LABARTHE MARTELLI & ADELAIDE MUSSI SANTOS 147

NOTA

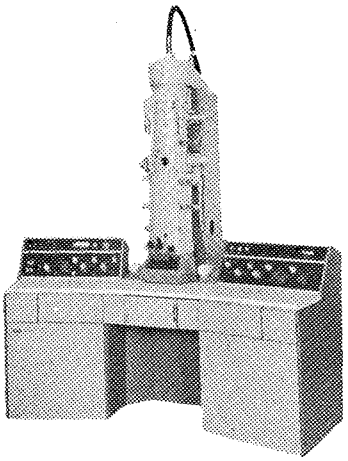
O método turbidimétrico na medida de concentração e de velocidades de reprodução de microrganismos — WALTER BORZANI 153

REVISÃO

O ciclo parassexual em fungos — JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO 157

JEOL

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

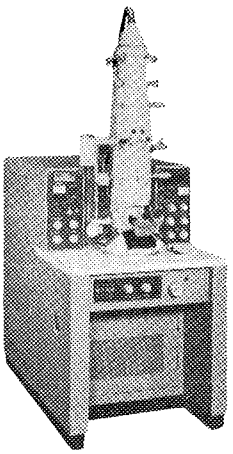


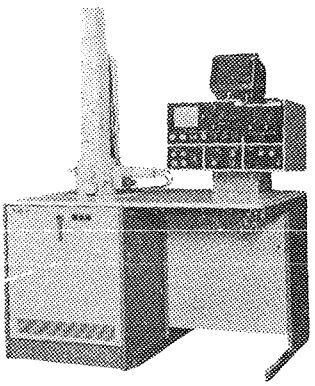
Microscópio Eletrônico JEM-100B

- 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 (μ litros/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(3):121-126, julho-setembro, 1972

SEARCH OF B-1 AFLATOXIN AND SIMILAR FLUORESCENT COMPOUNDS IN BRAZILIAN CASSAVA-FLOUR

Adhemar PURCHIO (*)

SUMMARY

Following previous studies on the investigation of B-1 Aflatoxin in food samples[3] we report in this paper the results presently obtained through spectrophotometric analysis using thin layer chromatography (TLC) with two different solvent systems in order to differentiate actual B-1 Aflatoxin and Aflatoxin-like substances. Twenty mannioc or cassava-flour samples were studied. B-1 Aflatoxin was regularly absent; an aflatoxin-like substance, yielding similar fluorescence was, however, to be found in the whole lot studied. No Aflotaxin-producing *Aspergillus* was isolated.

INTRODUCTION

In a previous paper on the investigation of B-1 Aflatoxin and similar compounds [3], we had suggested a modification of the methods of PONS Jr. et al.[2], introducing the purification of the food extracts with ethylic ether as preconized by NABNEY & NESBITT [1], in the same chromatographic plate. Subsequently, we carried out the spectrophotometric analysis, using thin layer chromatography (T.L.C.) with two other solvent systems in order to differentiate those substances. We have also investigated the presence of Aflatoxin-producing *Aspergillus* in the same materials.

Applying the method described below, we analysed twenty cassava-flour samples. Many fluorescent compounds were detected in all the samples, which apparently could be mistaken as Aflatoxin if the current solvent system would be employed alone. Later, we were able to characterize them by spectrophotometric analysis, as similarly fluorescing compounds. Therefore, we did not make the running in other solvent systems.

MATERIAL AND METHODS

Twenty samples of cassava or mannioc-flour destinated for human use, were investigated. Such samples had been picked at some supermarkets, in São Paulo, the capital of the State of São Paulo, Brazil. Eight of them were toasted, and twelve were crude or white.

1. *Extraction and detection of B-1 Aflatoxin*

The technique for the extraction of Aflatoxin was the one of PONS Jr. et al.[2]. The material was previously defatted with acetone (70 per cent), the interfering pigments precipitated with lead acetate, and the extraction carried out with chloroform.

The resultant extracts were submitted to thin-layer chromatography (Kieselgel-G — 500 mμ) in 20 × 20 cm glass-plates.

The purification of the extracts in the chromatographic plate was performed as preconized by NABNEY & NESBITT [1]. As it is well known, the ethylic ether carries the Aflatoxin spots slightly beyond the start-point whereas certain of the interfering fluorescent spots go to the front. After the passage of the ethylic ether in the plate, we run the classic solvent system, chloroform-methanol (97 : 3). This was Chromatographic Method Number two.

This method was then compared to Chromatographic Method Number one, where

(*) Professor Assistant Doctor of "Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo — Brasil". Department of Microbiology and Immunology. Professor of Microbiology and Immunology of the "Faculdade de Medicina de Jundiaí — Estado de São Paulo — Brasil".

TABLE I

Thin layer chromatographic results from the cassava-flour (CF) extracts using two different methods

	Chromatographic method								Presence of B-1 Aflatoxin
	Number 1				Number 2				
Extracts	N	C	Rf_c	Rf_s	N	C	Rf_c	Rf_s	
CF-1	3	blue green blue	0.47 0.40 0.19	0.55 0.45	3	blue green blue	0.63 0.45 0.22	0.65 0.55	+
CF-2	3	blue green blue	0.47 0.40 0.19	0.55 0.45	3	blue green blue	0.63 0.45 0.22	0.65 0.55	+
CF-3	3	blue green blue	0.47 0.40 0.19	0.55 0.45	3	blue green blue	[0.63] 0.45 0.22	0.65 0.55	+
CF-4	3	blue green blue	0.47 0.40 0.19	0.55 0.45	3	blue green blue	0.63 0.45 0.22	0.65 0.55	+
CF-5	2	blue green	0.47 0.38	0.55 0.45	2	blue green	0.63 0.45	0.65 0.55	+
CF-6	2	blue green	0.47 0.38	0.55 0.45	2	blue green	0.63 0.45	0.65 0.55	+
CF-7	2	blue green	0.47 0.38	0.55 0.45	2	blue green	0.63 0.45	0.65 0.55	+
CF-8	2	blue green	0.47 0.38	0.55 0.45	2	blue green	0.63 0.45	0.65 0.55	+
CF-9	2	blue green	0.47 0.38	0.55 0.45	2	blue green	0.63 0.45	0.65 0.55	+
CF-10	2	blue green	0.45 0.38	0.55 0.45	2	blue green	0.65 0.45	0.65 0.55	+
CF-11	3	blue green blue	0.46 0.39 0.19	0.52 0.43	3	blue green blue	0.76 0.45 0.25	0.62 0.52	±
CF-12	3	blue green blue	0.46 0.39 0.19	0.52 0.43	3	blue green blue	0.70 0.45 0.25	0.62 0.54	±
CF-13	3	blue green blue	0.46 0.39 0.19	0.52 0.43	3	blue green blue	0.70 0.45 0.25	0.62 0.54	±
CF-14	2	blue green	0.46 0.39	0.52 0.43	2	blue green	[0.70] 0.45	0.62 0.52	±
CF-15	3	blue green blue	0.46 0.39 0.19	0.52 0.43	2	blue green	0.70 0.45	0.62 0.32	±
CF-16	3	blue green blue	0.46 0.39 0.19	0.52 0.43	2	blue green	0.65 0.45	0.62 0.52	+
CF-17	3	blue green blue	0.46 0.39 0.19	0.52 0.43	3	blue green blue	0.65 0.49 0.25	0.62 0.52	+
CF-18	3	blue green blue	0.46 0.39 0.19	0.52 0.43	3	blue green blue	[0.65] 0.49 0.25	0.62 0.52	+
CF-19	1	blue	0.40	0.52 0.43	1	blue	0.72	0.62 0.52	±
CF-20	1	blue	0.43	0.52 0.43	1	blue	[0.75]	0.62 0.52	±

Rf_c — cassa-flour Rf

Rf_s — standard Rf { high Rf — B-1 Aflatoxin = blue; low Rf — G-1 Aflatoxin = green }

N — number of fluorescent spots

C — colour of fluorescence

[ ] — Rf of the sample eluted for spectrophotometry

the ethylic ether was not used. This was done in order to evaluate its real efficacy as a purifying agent.

The suspected spots were eluted and methanolic solutions employed for the spectrophotometric analysis. The same procedure was obeyed with the standard spot, and the results compared with those of the standard solution. Our quantitative standard was supplied as a chloroform solution by the "Agricultural Research Service", New Orleans, Louisiana, in ampoules.

2. *Isolation of Aspergillus in the samples studied*

We tried to isolate any Aflatoxin-producing *Aspergillus* eventually present in the flour samples, by the usual mycological techniques. A suspension of the material, prepared in sterile saline, was seeded in Petri dishes with Sabouraud-Chloramphenicol medium (antibiotic concentration 3 mg/100 ml).

RESULTS

Table I summarizes all the results obtained by the T.L.C. of twenty samples of cassava flour. It is remarkable that the results obtained (positive + and suspected ±) are based only on the sample Rf, compared to that of the standard and to the tonality of the fluorescent spot. When the solution Rf were the same or very close (difference of 0.05) by Chromatographic Method Number 2, we considered the extract as positive. When the difference between both Rfs was higher than 0.05, we considered the sample as Aflatoxin-suspected.

Thus, according to Table I, we had Aflatoxin (13 samples) or Aflatoxin-suspected material (7 samples) in all of the samples of cassava-flour. We obtained the disappearance of one fluorescent spot in the CF-15 and CF-16 extracts. As we suspected that all these fluorescent spots were a single substance that could usually exist in cassava-flour, we eluted four representative spots (two positive ones: CF-3, CF-18, and two Aflatoxin-suspected: CF-14 and CF-20) in order to carry out the spectrophotometric analysis. The results are shown in Table II. In Table III, we have the absorbancies of the Aflatoxin B-1 standard eluted from the T.L.C.

Therefore, we may conclude that in the samples examined, we had neither B-1 Aflatoxin nor any Aflatoxin-producing *Aspergillus*. The fungi actually isolated, are listed in Table IV. It is to be noted that two strains of *Aspergillus* sp isolated (CF-6 and CF-18) were the *niger* groups and we obviously did not submit their cultures to extraction.

DISCUSSION

According to our results, the influence of ethylic ether to differentiate the Aflatoxin-liye substance does not seem to be very good, if we consider the results of Chromatographic Method Number 2, to those of Chromatographic Method Number 1, in which ethylic ether is not employed.

We can realize that the Aflatoxin-like substances moved further than the Aflatoxin standard when ethylic ether was used in the T.L.C., which is a characteristic of that kind of substances. These results were clearly confirmed in the spectrophotometric analysis. (Table II). None of the analysed extracts presented a peak or a "plateau" in the 360 n m region. We know that this "plateau" appears in the 350, 360 and 370 regions, when there is a small concentration of Aflatoxin [3].

We could observe that in the cassava-flour, there was probably a native substance present in all the samples submited to T.L.C. with the same fluorescence colour and very easily confounded with B-1 Aflatoxin.

So, we agree with YOKOTSUKA et al.[4] when they say that "In the detection and characterization of samples suscepted to be contaminated with Aflatoxins, Rf values should be determined with two or more solvent systems, and ultraviolet and infrared absorption spectral data should also be used. This implies that the compounds must be isolated and identified".

We did not succeed in isolating any Aflatoxin-producing *Aspergillus*. We have observed that in the twenty samples of cassava-flour there was no green *Aspergillus*, a fact which is not common in our laboratory, since in all the different food samples we had so far analysed, the isolation of these fungi was very frequent.

CONCLUSIONS

We could not detect Aflatoxin in twenty samples of cassava-flour studied. Aflatoxin-like substances were present in all samples submitted to T.L.C. and we suspect that

TABLE II

Absorbancies of methanolic solutions containing fluorescent substances eluted from T.L.C. of cassava-flour extracts

Sample \ λ (n m)	250	260	270	300	350	360	370	400
CF-3	0.185	0.145	0.135	0.048	0.026	0.022	0.018	0.010
CF-14	0.240	0.192	0.182	0.066	0.038	0.034	0.030	0.024
CF-18	0.195	0.150	0.145	0.042	0.026	0.020	0.018	0.010
CF-20	0.210	0.165	0.155	0.062	0.058	0.054	0.032	0.026

TABLE III

Absorbancies of methanolic solutions of Aflatoxin B-1 standard obtained by the elution of the corresponding fluorescent spot in T.L.C. (Aflatoxin B-1 concentration = 12.5 and μg/5 ml)

Sample \ λ (n m)	250	260	270	300	350	360	370	400
Q.L.S.	0.046	0.034	0.022	0.010	0.002	0.006	0.004	0.002
Q.S.	0.084	0.069	0.046	0.006	0.020	0.028	0.012	0

Q.L.S. = qualitative standard
Q.S. = quantitative standard

TABLE IV

Sample	Fungus	Sample	Fungus
CF-1	Phycomycetes	CF-11	*Penicillium* sp
CF-2	Yeasts	CF-12	Phycomycetes, Yeasts
CF-3	Yeasts	CF-13	—
CF-4	Yeasts	CF-14	Yeasts
CF-5	Phycomycetes, Yeasts	CF-15	Phycomycetes, *Penicillium* sp
CF-6	*Aspergillus* sp, Yeasts, Phycomycetes	CF-16	Phycomycetes
CF-7	*Penicillium* sp, Yeasts	CF-17	—
CF-8	Phycomycetes	CF-18	Phycomycetes, *Aspergillus* sp
CF-9	Phycomycetes, Yeasts	CF-19	Yeasts, *Penicillium* sp
CF-10	Yeasts	CF-20	*Penicillium* sp

it is a particular type of substance usually occurring in such material. We failed to isolate any Aflatoxin-producing *Aspergillus* from the food samples.

Thus, it seems indeed very easy to have misresults if proper methods are not employed in the analysis of cassava-flour.

RESUMO

Pesquisa de Aflatoxina B-1 e substâncias fluorescentes similares em farinha de mandioca

Estudou-se, neste trabalho, a ocorrência de aflatoxina B-1 e substâncias fluorescentes similares em vinte amostras de farinha de mandioca. Apresentavam-se acondicionadas em sacos plásticos com a capacidade variando entre 400 e 480 g e não apresentavam sinal visível de emboloramento. Apesar disto, procurou-se isolar amostras toxigênicas de *Aspergillus* sp que poderiam contaminar as farinhas sob a forma de esporos.

O autor associou as técnicas de extração, PONS Jr. & col.[2], e de detecção NABNEY & NESBITT [1] para caracterização da aflatoxina B-1, utilizando ainda para comprovação dos resultados, cromatografia em camada delgada com outros dois sistemas de solventes e espectrofotometria na região do ultra-violeta. Para o isolamento de fungos utilizou os métodos usuais em micologia.

O seguinte resultado foi obtido: nas 20 amostras apareceram manchas fluorescentes, quando os cromatogramas foram expostos à luz de Wood. Todas estas manchas, após a passagem de éter etílico, mudaram seus respectivos Rf para valores mais altos. Evidenciou-se, pelos cromatogramas, que estas manchas fluorescentes tinham um Rf bastante uniforme indicando talvez uma mesma substância diferente da aflatoxina. Isto ficou comprovado inclusive pela espectrofotometria. Nestas análises a ação do éter etílico para diferenciar estas substâncias fluorescentes da aflatoxina foi de grande valia pois a tonalidade de suas fluorescências é bastante parecida e também possibilitando excluir a realização de outros cromatogramas utilizando solventes diversos.

REFERENCES

1. NABNEY, J. & NESBITT, B. F. — A spectrophotometric method for determining the aflatoxin. *Analyst,* **90**:155-160, 1965.

2. PONS Jr., W. A.; CUCULLU, A. F.; LEE, L. S.;; ROBERTSON, J. A.; FRANZ, A. O. & GOLDBLATT, L. A. — Determination of aflatoxins in agricultural products: use of aqueous acetone for extraction. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.,* **49**:554-562, 1966.

3. PURCHIO, A. — Pesquisa de Aflatoxina B-1 e substâncias fluorescentes similares em farinha de trigo. *Rev. Microbiol.,* **1**(1):33-42, 1970.

4. YOKOTSUKA, T.; SASAKI, M.; KIKUCHI, T.; ASAO, Y. & NOBUHARA, A. — Production of fluorescent compounds other than aflatoxins by Japanese industrial molds. In MATELES, R. I. & WOGAN, G. N. — Biochemistry of some foodborne microbial toxins. Cambridge, Mass., *The M.I.T. Press,* 131-152, 1967.

Recebido para publicação em 7/6/1972.

Rev. Microbiol.
3(3):127-138, julho-setembro, 1972

ESTUDO BACTERIOLÓGICO DE INFECÇÕES ENTÉRICAS EM CRIANÇAS ATÉ 2 ANOS, NO MUNICÍPIO DE ARARAQUARA, SP (*)

Deise Pasetto FALCÃO (1)

RESUMO

No período compreendido entre 1.º de dezembro de 1969 a 30 de novembro de 1970, realizaram-se coproculturas de 755 crianças, na faixa etária de 0 a 2 anos, de ambos os sexos, residentes na cidade de Araraquara ou em região dependente de sua assistência sanitária, todas com história de diarréia aguda de intensidade variável, acompanhada ou não de febre e vômito. Colheu-se material antes da administração de qualquer medicação.

Essas coproculturas objetivaram o isolamento de enterobactérias, com especial atenção a *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* enteropatogênica e das chamadas "novas enterobactérias patogênicas" para o homem.

Os resultados apresentaram 16,29% de positividade para os três primeiros grupos de germes estudados. Em relação às "novas enterobactérias", os estudos não estão completos. As *Salmonella* apareceram na porcentagem de 4,5%, as *Shigella* de 2,4% e a *E. coli* enteropatogênica 9,15%. Das 755 crianças examinadas, 116 apresentaram um ou mais dos germes pesquisados (15,36%). Sete apresentaram infecções mistas.

INTRODUÇÃO

No Brasil, a mortalidade na primeira infância por doenças diarréicas (gastrenterites), assume importância fundamental na nosologia.

Pelo boletim do Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA) do Ministério do Planejamento, do ano de 1966, verifica-se que a taxa de mortalidade infantil no Brasil é cerca de cinco vezes maior que a da Dinamarca e quatro vezes maior que a dos Estados Unidos. Entre as causas de morte, encontram-se as doenças transmissíveis, as quais no ano de 1964 representaram 40% do total das causas de morte no país.

Dentro desse grupo salientam-se as diarréias infecciosas, a gripe e pneumonia, a tuberculose do aparelho respiratório, o sarampo e o tétano, que representam 85 a 90% do total. No que diz respeito especificamente às diarréias infecciosas, a correspondente taxa de mortalidade entre crianças de menos de 5 anos de idade, foi estimada em 1.245 por 100.000 em 1964. A taxa de mortalidade por diarréia infecciosa, tem sido utilizada como um dos bons indicadores de desenvolvimento econômico. Em todos os países desenvolvidos como os Estados Unidos, Canadá, Suécia e Holanda, ela se mostra muito baixa, enquanto nos países de condições econômicas ainda desfavoráveis, como Colômbia, México, Brasil, Egito, ela é várias dezenas e por vezes duas ou três centenas de vezes mais alta. Na cidade de São Paulo, onde se registram os mais baixos índices de mortalidade infantil por diarréia infecciosa (em relação às outras capitais brasileiras), verifica-se que a taxa é aproximadamente a mesma apresentada pela soma das taxas da França, Holanda, Dinamarca, Inglaterra e Estados Unidos [33].

Dados mais recentes do Ministério da Saúde, mostram que no ano de 1969 no Brasil,

(*) Investigação financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).
(1) Prof. Assistente Doutor, Departamento de Microbiologia, Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araraquara, São Paulo, Brasil.

as diarréias infecciosas causaram a morte de 161.000 crianças de menos de cinco anos de idade, correspondendo a uma taxa de 1.095 óbitos por 100.000 crianças, número este que corresponde a 30% das causas de morte nessa faixa etária [35].

Segundo dados fornecidos pelo Ministério da Saúde, no período de julho de 1968 a maio de 1969, na cidade de São Paulo, houve 1.623.008 atendimentos a crianças menores de 5 anos, em Hospitais, Postos de Puericultura, Centros de Saúde e Postos de Pronto Socorro. Dentre o número de atendimentos, registram-se 245.533 casos de desidratação, ou seja, uma incidência de 15,1%, não tendo sido apurados os agentes etiológicos das infecções. Neste período foram registrados 1.928 óbitos por desidratação [34].

Esses dados podem ser complementados pelos resultados provisórios da "Investigação Interamericana de Mortalidade na Infância", na cidade de São Paulo, no período de junho de 1968 a maio de 1969, que mostram que dentre as doenças infecciosas, a gastrenterite (n.º 002-009 da Classificação Internacional de Doenças, 1965) foi o grande grupo, responsável, sòzinho, por 26,6% dos óbitos por todas as causas em menores de 1 ano [22].

No Município de Araraquara, as taxas assemelham-se às do Estado e do restante do Brasil. Assim, segundo dados fornecidos pelo Serviço Especial de Saúde Pública, os índices de mortalidade infantil em menores de 1 ano, nos últimos 10 anos (por 1.000 nascidos vivos) são os seguintes:

1961	60,5
1962	50,6
1963	49,3
1964	61,4
1965	66,3
1966	76,4
1967	84,9
1968	69,4
1969	83,2
1970	65,1

Observando-se levantamento realizado nos últimos cinco anos das causas de mortalidade infantil em menores de 1 ano, no Município de Araraquara [59], verifica-se que, as diarréias ocupam o 1.º lugar como causa de morte, apresentando as porcentagens que se seguem:

1966	32,0%
1967	33,4%
1968	39,7%
1969	42,4%
1970	38,5%

Segundo a Organização Mundial de Saúde, define-se diarréia em crianças até 2 anos de idade, como sendo a eliminação de fezes semi-líquidas em número de 3 ou mais vezes, nas 12 horas, ou uma única vez semilíquidas ou líquidas com sangue, pús ou muco. Nas crianças de 3 anos ou mais, fezes semi-líquidas ou líquidas em número de 2 ou mais nas 12 horas, ou uma única evacuação semilíquida ou líquida, com sangue, pús ou muco.

Podem-se classificar essas diarréias nas seguintes categorias [43]:

1 — Diarréias não infecciosas (alimentares, carenciais, alérgicas, endócrinas).

2 — Diarréias infecciosas:

a) enterais — por bactérias, por fungos;

b) parenterais — por vírus, por cogumelos.

3 — Diarréias por infestação (helmintos).

Conforme dados relatados anteriormente, as diarréias infecciosas são as responsáveis pelos altos índices de mortalidade infantil e as bactérias são os principais agentes causadores dessas enteroinfecções.

Entre as bactérias causadoras dessas enfermidades, encontram-se aquelas pertencentes às famílias *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Spirillaceae* e *Micrococaceae*, sendo que a família *Enterobacteriaceae*, inclui os principais grupos de bactérias patogênicas [49]. Entretanto, os agentes etiológicos específicos variam muito de acordo com a região examinada [2]. Podemos, entretanto, dizer que os principais agentes infecciosos específicos são os diversos sorotipos de *Shigella*, *Salmonella* e *E. coli* enteropatogênica [5, 18, 25, 50], os quais acham-se presentes em 14-20% dos casos de diarréia, podendo, em condições especiais, chegar a 40% e excepcionalmente a 60% [19, 60].

O perfeito conhecimento da etiologia dessas diarréias infecciosas é fundamental, tanto para o clínico, que encara o problema do tratamento, como para o epidemiologista que afronta os problemas de controle [2].

Investigações procurando estabelecer os agentes causais dessas enteroinfecções, no Estado de São Paulo, foram realizadas quase que somente na capital [16, 17, 23, 39, 46, 52, 53, 54]. Há poucos dados relativos ao Interior, onde se sabe que há elevada mortalidade infantil

devida a tais infecções. VALLADA [58], isolou em Botucatú, de fezes de crianças com enterite aguda, *E. coli* 055:B5 e *E. coli* 0111:B4. RAYA e col.[42], isolaram durante um surto de gastrenterite entre prematuros do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, *E. cole* 0111:B4 em 54% dos espécimens examinados. SOLÉ-VERNIN e col.[47], também em Ribeirão Preto, fazendo um levantamento sobre a ocorrência de enterobactérias patogênicas, verificaram a baixa incidência de *Shigella*, a quase inexistência de *Salmonella* e uma taxa razoável de *E. coli* enteropatogênica naquela cidade. MONTELLI e col.[36], em Botucatu, isolaram de fezes de pacientes com diarréia aguda ou crônica, 10,4% de *Shigella*, 4,0% de colibacilos enteropatogênicos e 1,2% de *Salmonella*.

Em Araraquara, SOLÉ-VERNIN e col.[48], isolaram *Shigella Quetta-454*, tanto de pessoas que sofriam de diarréia ou desinteria, como de outras consideradas portadoras. Também em Araraquara, TAUNAY e col.[53], fizeram um levantamento de bactérias dos gêneros *Shigella* e *Salmonella*, a partir de fezes de crianças e de adultos, obtendo 6,4% de positividade para *Shigella* e 2,8% para *Salmonella*. Em nosso trabalho de tese [10], isolamos em Araraquara, 6,4% de *Salmonella* e 12,7% de *Shigella*, a partir de 48 coproculturas de crianças com menos de 2 anos com problemas agudos de gastrenterites, durante o período de março a julho de 1968. Deve-se notar que neste último trabalho as colheitas de material foram realizadas em apenas 4 meses do ano.

No presente trabalho realizamos coproculturas de crianças do grupo etário de 0 a 2 anos que são as mais atingidas por essas infecções. Essas coproculturas foram realizadas no período compreendido entre 1.º de dezembro de 1969 a 30 de novembro de 1970, a fim de se observar a possível influência dos diversos períodos do ano na ocorrência dessas enfermidades. Pretendemos verificar não apenas a presença de *Salmonella* e *Shigella* em Araraquara, como foi realizado nos trabalhos anteriormente mencionados, mas também pesquisar a presença de diferentes sorotipos de *E. coli* do Grupo Entérico Infantil, bem como a presença de outras enterobactérias, atualmente consideradas como patogênicas, tais como as denominadas "*Parashigella*" [51] e de outras semelhantes descritas por vários autores [15, 24, 40, 45, 56, 57, 61].

Pretendemos, desse modo, contribuir para o estudo desses germes e da prevalência das respectivas doenças infecciosas, em Araraquara e seus arredores.

MATERIAL E MÉTODOS

Durante o período de 1 ano foram realizadas coproculturas de 755 crianças, da faixa etária de 0 a 2 anos, de ambos os sexos, todas com história de diarréia aguda de intensidade variável, acompanhada ou não de vômito e febre. Colheu-se material, antes da administração de qualquer medicamento, de todas as crianças nessas condições, residentes na cidade de Araraquara ou em regiões dependentes quanto à sua assistência sanitária, que procuravam os Postos de Saúde, Pronto Socorro, ou, daquelas que eram internadas nas Secções de Pediatria ou de Hidratação da Santa Casa local.

Realizou-se apenas uma cultura de cada criança.

O material foi colhido por meio de "swab". Fizeram-se três "swabs" de cada criança, os quais eram levados imediatamente para os meios de Teague-Clurman, de Tetrationato de Kauffman e de Rappaport, estes dois últimos visando o enriquecimento de *Salmonella* e o primeiro como conservador, para posterior pesquisa de *Shigella*, *E. coli* enteropatogênica e das "novas bactérias patogênicas intestinais" [8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 41].

A partir do Teague-Clurman, a amostra era imediatamente semeada em "SS Agar" e em "EMB Agar" [8]. Após enriquecimento em Rappaport por 24 horas, era semeado em "SS Agar" e em "Agar Verde Brilhante" e após enriquecimento em tetrationato de Kauffmann, em "Agar Verde Brilhante" e em "EMB Agar", levando-se em conta experiência anterior [10].

O meio de Rappaport foi usado com concentração de cloreto de magnésio a 1,8%.

Identificação: 1 — *E. coli enteropatogênica*: de cada placa com meio de "EMB Agar", retiraram-se 10 colônias lactose positivas e semeadas em agar simples para posterior aglutinação com soros polivalentes OB. As amostras que se positivaram nessa prova foram testadas com os respectivos soros individuais OB, e posteriormente foram realizadas titulações com os respectivos soros O. As suspensões que aglutinaram até a diluição correspondente ao título do soro foram submetidas às provas bioquímicas para confirmação do gênero. Foram pesquisados os seguintes sorotipos de *E. coli*: 026:B6, 086:B7, 0127:B8, 055:B5, 0111:B4, 0119:B14, 0125:B15, 0126:B16, 0128:B12.

2 — *Shigella* e *Salmonella*: as colônias lactose negativas que cresceram nos meios seletivos indicadores foram semeadas em tríplice açúcar modificado [3] e, quando confirmaram a suspeita foram semeadas na série bioquímica. Quando a bioquímica revelou a presença de *Shigella*, fez-se confirmação sorológica, empregando-se soros polivalentes dos grupos A, B, C, D. As amostras que se revelaram positivas foram submetidas aos respectivos soros monovalentes e posteriormente aos soros tipo-específicos.

As amostras que na série bioquímica revelaram ser *Salmonella* foram submetidas aos soros polivalentes somático e flagelar. Posteriormente as amostras positivas foram submetidas às outras provas sorológicas de acordo com o esquema usual [20].

3 — "*Outras Enterobactérias Patogênicas*": Todas as colônias lactose positivas como as lactose negativas isoladas para as pesquisas anteriores foram submetidas a um soro polivalente constituído dos seguintes sorotipos: *E. coli* 028 ac, 0185, 0193, 032 e *Saigon*. Quando ocorreu aglutinação a amostra foi submetida aos soros individuais e posteriormente estudada sob o ponto de vista bioquímico.

Para todos os germes foram realizadas as seguintes provas bioquímicas:

a) fermentação de: glicose, lactose, sacarose, manita, dulcita, salicina, adonita, inosita, sorbita, arabinose, rafinose e raminose;
b) produção de indol;
c) produção de H_2S;
d) reação do VM e do VP;
e) crescimento em citrato, acetato e malonato;
f) desaminação da fenil alanina;
g) descarboxilação da lisina e ornitina;
h) motilidade;
i) hidrólise da uréia;
j) redução do nitrato;
k) liquefação da gelatina.

RESULTADOS

Das 755 crianças examinadas, 116 apresentaram os germes pesquisados, sendo que em 7 delas foram isoladas mais de um, com um total de 123 isolamentos (16,3% do total). Portanto em 15,36% das crianças havia uma infecção enteral específica, quer por *Salmonella* (4,5%), *Shigella* (2,6%), *E. coli* enteropatogênica (9,2%), ou por associações diversas entre esses germes. (Tabelas I, II, III).

TABELA I

Distribuição de isolamento

	Total	Presença	Ausência
Casos estudados	755	116	639
Porcentagem	100%	15,36%	84,64%

FIGURA 1

DISTRIBUIÇÃO MENSAL DOS CASOS POSITIVOS TOTAIS - SALMONELLA, SHIGELLA E E. COLI G.E.I.

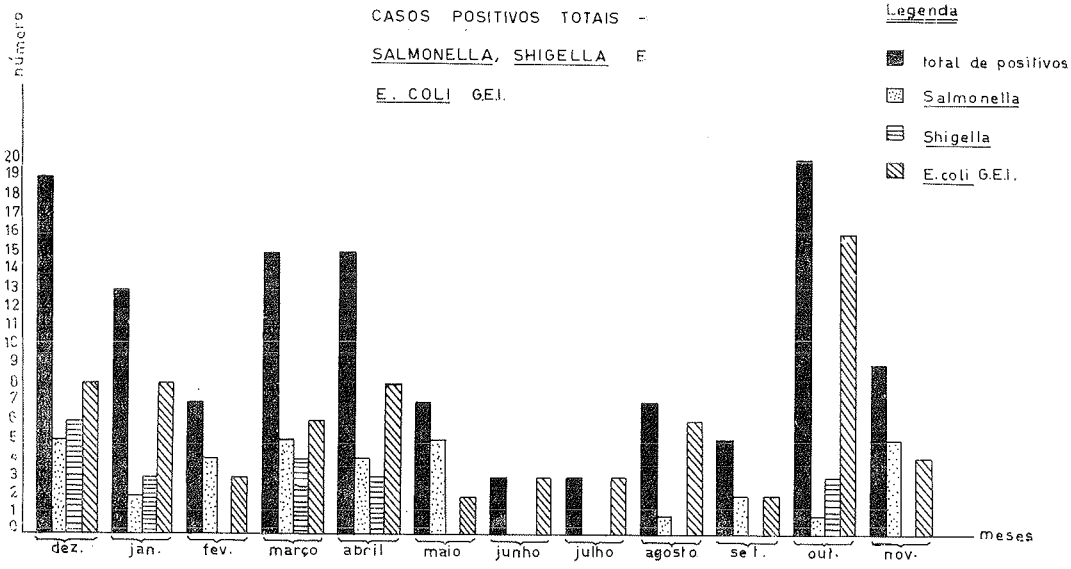


TABELA II

Freqüência dos germes encontrados

Germe	Número	Porcentagem
Salmonella	34	27,64
Shigella	20	16,26
E. coli GEI	69	56,09
Total	123	100,00

TABELA III

Infecções mistas

N.º do caso	Germes
1	*Shigella sonnei* + *E. coli* 0111:B4
8	*Shigella flexneri* + *E. coli* 055:B5
20	*Salmonella newport* + *E. coli* 0111:B4
75	*E. coli* 0128:B12 + *E. coli* 0127:B8
80	*Salmonella derby* + *E. coli* 055:B5
216	*Shighella sonnei* + *Salmonella newport*
670	*Shigella boydi* + *E. coli* 086:B7

Os resultados das tipagens das amostras de *Salmonella*, *Shigella* e *E. coli* enteropatogênica constam das tabelas IV, V e VI.

Os resultados relacionados com as chamadas "novas enterobactérias patogênicas" não estão sendo computados nos presentes dados. Após realização das provas, isolaram-se 27 amostras de "*Saigon*", cuja caracterização final está dependente de provas de absorção, titulação com soro 0 e prova de patogenicidade (inoculação em ôlho de cobaia) [56, 57].

Estudou-se a distribuição mensal dos casos de diarréia e dos isolamentos dos germes pesquisados, correlacionando-se esses dados com as médias mensais de temperatura e precipitação. (Tabela VII, Figura 1).

As Tabelas VIII-X mostram a distribuição dos casos positivos de acôrdo com:

a) sexo dos pacientes;
b) sintomatologia observada;
c) localização geográfica.

Os dados relativos à distribuição de germes segundo a idade do paciente, constam das figuras 2-6 e Tabela XI. Essa divisão foi realizada por meses de vida (3 em 3 meses) e por anos de vida (1.º e 2.º ano).

Utilizaram-se dois meios para enriquecimento de *Salmonella*, levando em conta experiência anterior e os resultados correspondentes constam da Tabela XII.

DISCUSSÃO

Nossos achados foram algumas vezes concordantes, outras vezes discordantes dos de outros autores; acreditamos isso se deva a diferença da amostragem utilizada, à diferenciação ecológica e, provavelmente, a variações nas técnicas de isolamento empregadas. Observamos, porém, que na grande maioria (84,64%) desses casos de diarréia aguda não se encontraram os germes pesquisados, dados esses, concordantes com os de COSTA e col.[5].

FIGURA 2

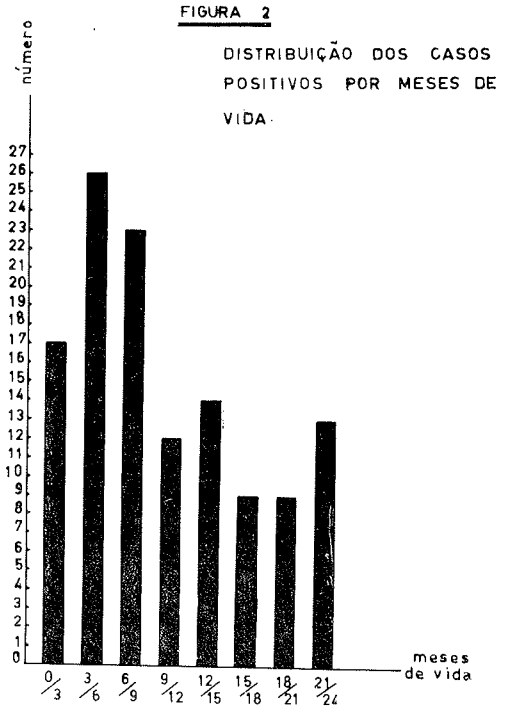


FIGURA 3

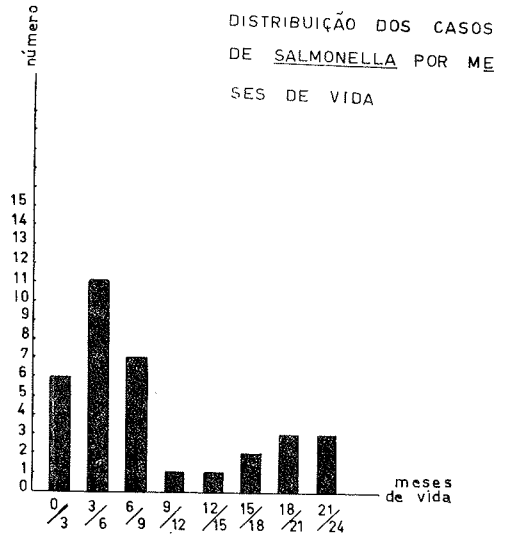


TABELA IV

Distribuição sorológica das amostras de *Salmonella* isoladas
Total de 34 amostras

Germe	Grupo B	Grupo C_1	Grupo C_2	Grupo D	Grupo E_1
	S. derby	*S. parathyphi C*	*S. newport*	*S. panama*	*S. anatum*
Freqüência	6	1	25	1	1
Porcentagem	17,64%	2,94%	73,25%	2,94%	2,94%

TABELA V

Distribuição sorológica das amostras de *Shigella* isoladas
Total 20 amostras

	Grupo B	Freq.	Grupo C	Freq.	Grupo D	Freq.
Germe	*S. flexneri* tipo 1	1	*S. boydi* tipo 6	1	*S. sonnei*	9
Germe	*S. flexneri* tipo 2	2				
Germe	*S. flexneri* tipo 3	3				
Germe	*S. flexneri* tipo 4	3				
Germe	*S. flexneri* tipo 6	1				
Total	10-50%		1-5%		9-45%	

TABELA VI

Distribuição sorológica das amostras de *E. coli* enteropatogênica isoladas — Total 69 amostras

Tipo	Freqüência	Porcentagem
E. coli 0111:B4	21	30,43%
E. coli 086:B7	16	23,18%
E. coli 0128:B12	14	20,28%
E. coli 055:B5	8	11,59%
E. coli 0127:B8	5	7,24%
E. coli 026:B6	2	2,89%
E. coli 0119:B14	2	2,89%
E. coli 0126:B16	1	1,44%

NEEDHAN e col.[38], nos Estados Unidos, isolaram 3,4% de *Salmonella*, 4,3% de *E. coli* enteropatogênica e nenhuma *Shigella*, em coproculturas de 412 crianças. BARRET-CONNOR e col.[4], também nos Estados Unidos, mas em região diferente, observaram durante um período de 4 anos, 330 casos de shigelose devidas quase que exclusivamente a *S. sonnei* e a *S. flexneri*. KANDUJA e col.[21], na Índia, isolaram a partir de pacientes com diarréia, 7,5% de *E. coli* enteropatogênica, 2,4% de *Salmonella* e 4,4% de *Shigella*. No Brasil os achados são também bastante contraditórios. Assim, COSTA e col.[6], no Rio de Janeiro, examinando fezes de 560 crianças com diarréia aguda, observaram que em 14,3% havia *Salmonella* (5,9%) ou *Shigella* (8,4%). FISCHER [16, 17], em São Paulo, realizando cultura de fezes de crianças com diarréia, isolou 16,6% de *E. coli* enteropatogênica e 8,3% de *Shigella*. MAROJA e col.[26], em Fortaleza, obteve um índice de positividade de 67,7%, sendo 42,8% de *Shigella*, 10,0% de *Salmonella* e 14,3% de *E. coli* enteropatogênica. Realizando trabalho semelhante em Palmares [27] isolou 26,5% de *Shigella*, 2,0% de *Salmonella* e 43,8% de *E. coli* enteropatogênica. Em Santarém [30], isolou 48,0% de *Shigella* e 8,0% de *Salmonella*. MIKOSZEWSKA[32], em Curitiba, isolou 12,5% de *Shigella*. MURAHOVSCHI e col.[37], em São Paulo, isolaram 6,17% de *Salmonella*, 7,41% de *Shigella* e 29,0% de *E. coli* enteropatogênica. ROUQUIROL [44] em Fortaleza, isolou 24,4% de *Shigella* e 2,0% de *Salmonella*. SERRANO e col.[46], em São Paulo, em 175 coproculturas isolaram 19,42% de *Shigella*, 14,85% de *E. coli* enteropatogênica e 4,0% de *Salmonella*. TAUNAY [52], em um levantamento de enterobactérias patogênicas, isoladas no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, apresenta os seguintes resultados para crianças até 5 anos durante o ano de 1964: 5,0% de *Salmonella*, 10,0% de *Shigella*, 23,0% de *E. coli* do GEI.

TABELA VII

Distribuição mensal dos casos de diarréia, dos isolamentos de germes pesquisados e das temperatura e precipitação médias

Mês	N.º de casos de diarréia	Número de isolamentos	Temperatura média — °C	Precipitação média — m/m
Dezembro — 1969	73	19 — 26,0%	22,6	176,6
Janeiro — 1970	52	13 — 25,0%	23,4	458,7
Fevereiro — 1970	44	7 — 15,9%	22,8	317,8
Março — 1970	74	15 — 20,2%	23,6	189,9
Abril — 1970	92	15 — 16,3%	21,8	45,7
Maio — 1970	58	7 — 12,0%	20,0	40,3
Junho — 1970	49	3 — 6,1%	19,2	51,7
Julho — 1970	40	3 — 7,1%	17,7	4,6
Agosto — 1970	53	7 — 13,2%	19,1	84,6
Setembro — 1970	54	5 — 9,25%	20,3	69,0
Outubro — 1970	95	20 — 21,0%	22,0	97,6
Novembro — 1970	60	9 — 15,0%	21,6	159,2

QUADRO VIII

Distribuição dos casos positivos de acordo com o sexo

Sexo	Número	Porcentagem
Masculino	70	57,0%
Feminino	53	43,0%

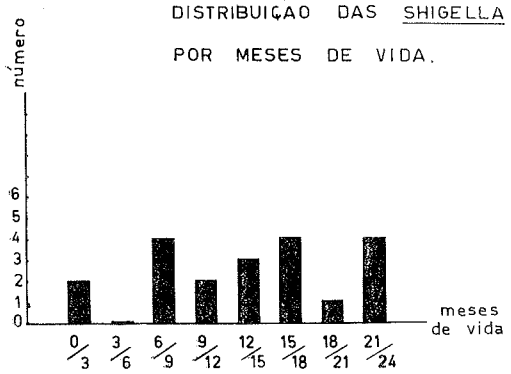
TABELA IX

Distribuição dos casos positivos de acordo com a sintomatologia observada

Sintoma	N.º de casos	Porcentagem
Diarréia	35	28,45%
Diarréia e vômito	31	25,20%
Diarréia e febre	29	23,57%
Diarréia, vômito e febre	28	22,76%

FIGURA 4

DISTRIBUIÇÃO DAS SHIGELLA POR MESES DE VIDA.



Em relação à *Salmonella*, especificamente em nossa região, observamos que nossas porcentagens são relativamente maiores que as de outros autores. Assim, SOLÉ-VERNIN e col.[47], isolaram menos de 1,0% desses germes em Ribeirão Preto e MONTELLI e col.[36], em Botucatú, isolaram-nos na porcentagem de 1,2%.

Pelos resultados apresentados na Tabela XII, evidencia-se a importância do emprego de mais de um meio de enriquecimento para *Salmonella*: 12 amostras foram isoladas apenas a partir do enriquecimento com Rappaport, não tendo crescido no Tetrationato de

FIGURA 5

DISTRIBUIÇÃO DE E. COLI ENTEROPATOGÊNICA POR MESES DE VIDA.

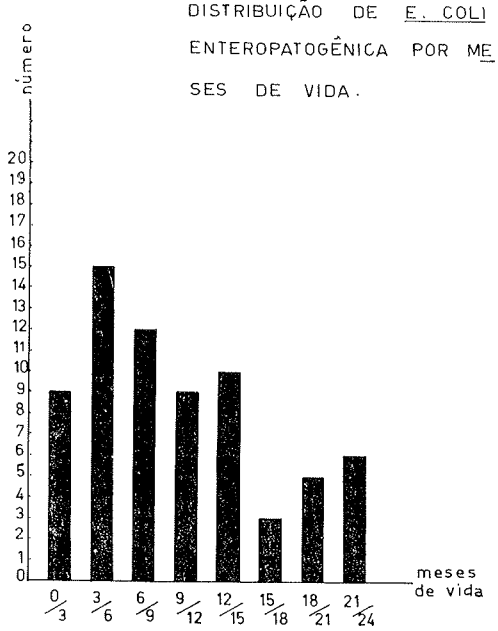


TABELA X

Distribuição dos casos positivos por localização

	Total	*Salmonella*	*Shigella*	*E. coli* enterop.
Araraquara — zona urbana	96	23	16	56
Araraquara — zona rural	14	6	1	7
Outras localidades	11	4	—	1
Endereços desconhecidos	2	1	—	1
Total geral	123	34	20	69

TABELA XI

Distribuição dos 123 isolamentos de *Salmonella, Shigella* e *E. coli* enteropatogênica de acordo com a idade em anos de vida.

	0 a 1 ano			1 a 2 anos		
Salmonella	25	—	73,5%	9	—	26,5%
Shigella	8	—	40,0%	12	—	60,0%
E. coli	45	—	65,2%	24	—	34,8%
Total dos achados positivos	78	—	63,4%	45	—	36,6%

Kauffmann. Por outro lado, só com o Rappaport teriamos deixado de isolar 7 amostras que cresceram apenas após enriquecimento em Tetrationato de Kauffmann. Em nosso trabalho de tese [10], usamos o meio de Rappaport modificado em relação à concentração do cloreto de magnésio (2,5% ao invés de 4,0%) conforme recomendado pelo autor [41], levando em conta experiências anteriores [13, 14], que comprovam ser excessiva a concentração de 4,0%. Entretanto, mesmo à concentração de 2,5%, o meio se mostrou inferior ao de Tetrationato de Kauffamnn para enriquecimento de *Salmonella;* no presente trabalho, empregando cloreto de magnésio à concentração de 1,8%, obtivemos um meio que se mostrou superior ao caldo Tetrationato.

Pela Tabela IV, verifica-se a quase total predominância, entre as salmonellas, daquelas do grupo C_2 — *Salmonella newport* (73,25% das amostras isoladas), enquanto em trabalho anterior [10], isolamos em Araraquara, com maior freqüência, amostras de *S. anatum* e a *S. newport* não foi isolada uma vez sequer. Isolaram-se ainda amostras dos grupos B, C_1, D e E_1. Também TAUNAY [52], em um levantamento dos sorotipos de salmonela isolados durante 17 anos no Instituto Adolfo Lutz em São Paulo, observou entre aqueles mais freqüentes, *S. newport, S. anatum, S. typhimurium* e *S. derby.* MAROJA e col.[28], em Pernambuco, encontraram como sorotipos predominantes, de *Salmonella*: *S. anatum, S. newport, S. muechem* e *S. typhi.* Em Santarém [31], os sorotipos que esses autores isolaram com maior freqüência foram *S. oraniemburg* e *S. newport.* Queremos ressaltar, ainda, o não isolamento de *S. typhimurium*, encontrado com freqüência em casos de diarréia infantil.

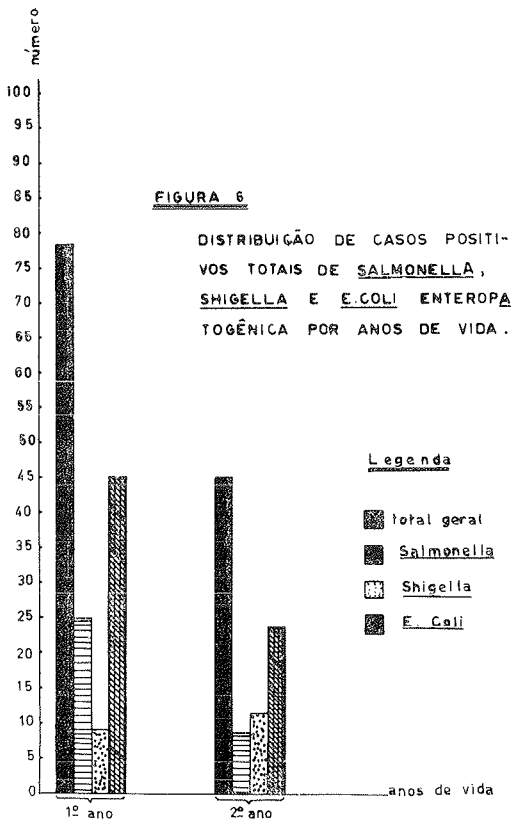


TABELA XII

Isolamento de *Salmonella*, segundo esquemas variados

Número do caso	Direto	Tetrationato	Rappaport	Número do caso	Direto	Tetrationato	Rappaport
13	—	13K-VB	13R-VB	313	—	—	313R-VB 313R-SS
14	—	14K-VB	—	314	—	314K-VB 314K-T	314R-VB 314R-SS
15	—	15K-VB	—	320	—	—	320R-VB 320R-SS
20	—	20K-VB	20R-VB 20R-SS	363	—	363K-VB	363R-SS
50	—	—	50R-VB	366	—	—	366R-SS
80	—	80K-T	—	369	—	369K-VB	—
116	—	116K-VB 116K-T	116R-VB 116R-SS	380	—	—	380R-SS
129	129SS	129K-VB 129K-T	129R-VB 129R-SS	382	—	382K-VB	382R-VB 382R-SS
136	136SS	136K-VB 136K-T	136R-VB 136R-SS	498	498SS	498K-VB 498K-T	498R-VB 498R-SS
139	—	139K-VB 139K-T	—	574	—	574K-VB 574K-T	—
146	146T 146SS	146K-VB 146K-T	146R-VB 146R-SS	596	—	—	596R-VB 596R-SS
186	—	—	186R-VB 186R-SS	603	—	603K-VB	—
207	207T	—	—	697	—	697K-T	697R-VB 697R-SS
216	—	—	216R-VB 216R-SS	701	—	701K-VB 701K-T	701R-VB 701R-SS
220	—	—	220R-VB 220R-SS	708	—	—	708R-VB 708R-SS
235	—	235K-VB 235K-T	235R-VB 235R-SS	750	—	—	750R-VB 750R-SS
263	—	—	263R-SS	752	—	752K-VB	752R-VB 752R-SS

SS — Isolamento direto em meio de "SS Agar"
T — Isolamento direto em meio de "EMB Agar"
K-VB — Enriquecimento em tetrationato e isolamento em "Agar Verde Brilhante"
K-T — Enriquecimento em tetrationato e isolamento em "EMB Agar".
R-SS — Enriquecimento em Rappaport e isolamento em "SS Agar"
R-VB — Enriquecimento em Rappaport e isolamento em "Agar Verde Brilhante".

Entre as *Shigella*, conforme dados da Tabela V, predominam os variados subtipos de *Shigella flexneri* e a *Shigela sonnei*. Não isolamos qualquer amostra de *Shigella* do grupo A, enquanto que do grupo C foi isolada apenas uma amostra. Também MAROJA e col.[29] em trabalho realizado na Zona da Mata em Pernambuco, observou a predominância desses dois grupos de *Shigella*, enquanto COSTA e col.[7] em levantamento realizado no Rio de Janeiro, assinalam a predominância de *S. flexneri*.

Em relação aos sorotipos de *E. coli* enteropatogênica, de acordo com os dados da Tabela VI, nota-se uma predominância do sorotipo 0111:B4, fato também observado por outros autores [1, 23, 26, 28, 36, 37, 46, 54]. Isolamos ainda amostras de todos os outros sorotipos estudados com exceção apenas da 0125:B15.

Pela Tabela VII verifica-se que não houve variação significativa entre o número de casos de diarréia e a temperatura média mensal. No que diz respeito à distribuição mensal dos germes pesquisados, de acordo com

a Figura 1, nota-se uma queda acentuada em junho e julho, que apesar de serem meses de inverno, na cidade de Araraquara, apresentaram temperatura média não muito inferior à média de temperatura ocorrida durante o ano.

Pelas Figuras 2, 3, 4, 5 e 6 e a Tabela XI, verifica-se que a infectividade foi bem maior nos primeiros 12 meses de vida. Estudando-se separadamente cada um dos germes, observa-se uma infectividade maior no 1.º ano de vida em relação à *Salmonella* e *E. coli* enteropatogênica. No que diz respeito à *Shigella*, houve predominância no 2.º ano de vida, dados esses concordantes com os de COSTA e col.[6].

SUMMARY

Bacteriological Study of Intestinal Infections in Children up Two Years of Age, in the Municipality of Araraquara

In the period between december 1, 1969 and november 30, 1970 tests were made on the feces of 755 children of both sexes, from birth up to 2 years of age. All these children had a history of acute diarrhoea of varying intensity, sometimes accompanied by fever. The material was collected from the children in this condition before the administration of any medication. The patients were all residents of Araraquara and the surrounding comunity. Some of them had been hospitalized because of dehydration.

The object of this research was to isolate intestinal bacteria with special attention to *Salmonella*, *Shigella* enterophatogenic, *Escherichia coli* and the so-called "new pathogenic intestinal bacteria" of man.

In the isolation of *Salmonella* there was some concern on the improvement of the tests, taking into consideration the experience of previous investigations.

The results yielded 16,3% positive for the three first groups of germs studied: *Salmonella*, 4,5%, *Shigella*, 2,6%; and *E. coli* 9,2%. Of the 755 children tested, 116 presented evidence of one more of the germs investigated (15,36%). Seven showed evidence of mixed infections. In relation to the "new pathogenic intestinal bacteria", the studies are not complete.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Solé-Vernin pela sugestão do presente trabalho.

Ao Departamento de Matemática e Estatística da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e particularmente ao Prof. Dr. Euclides Lima, pelo planejamento e orientação estatística.

Ao Prof. Dr. L. R. Trabulsi pelo fornecimento de soros para tipagem de *E. coli* e ao Instituto Adolfo Lutz, de São Paulo — Secção de Bacteriologia, que permitiu que ali realizassemos a tipagem das amostras de *Salmonella* e *Shigella*, sob a orientação de seus responsáveis.

À Veterinária Maria Cristina Lombardi pela ajuda na execução da parte técnica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABUASSI, W. L.; SUASSUNA, I.; MOTA, M. J.; SILVA, M. & SUASSUNA, I. R. — Investigação sobre a etiologia bacteriana e o tratamento das gastrenterites agudas na primeira infância. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **13**:18-27, 1971.

2. ARMIJO, R. — Epidemiologia de las diarreas agudas de la infancia. *In*: Symposium sobre diarreas agudas de la infancia. *Bol. Ofic. sanit. panamer.*, **57**:444-453, 1964.

3. BARACCHINE, O. — Identificação de Enterobactérias. *O Hospital*, **49**:537-539, 1956.

4. BARRETT-CONNOR, E. & CONNOR, J. D. — — Diversos aspectos da infecção por Shigelas. *J. Fla. med. Ass.*, **55**:540, 1968, Apud: *Atualid. méd.*, **5**:74, 1969.

5. COSTA, G. A. — Diarréia aguda no lactente. Etiologia infecciosa em geral. *In*: Simpósio sobre as diarréias agudas do lactente. *Bol. Inst. Pueric. (Rio de J.)*, **17**:204-208, 1960.

6. COSTA, G. A.; COSTA, A. & BROOKING, C. — As shigeloses e as salmoneloses na etiologia das diarréias agudas da criança. *Bol. Inst. Pueric. (Rio de J.)*, **14**:79-98, 1957.

7. COSTA, G. A.; SUASSUNA, I. & SUASSUNA, I. R. — Tipos de *Salmonella* e *Shigella* ocorrentes no Rio de Janeiro. *An. de Microbiol. (Rio de J.)*, **5**:305-318, 1957.

8. DIFCO MANUAL — 9.ª ed., Detroit, Difco Laboratoires, 350, 1964.

9. EDWARDS, P. R. & EWING, W. H. — *Identification of Enterobacteriaceae*. 2.ª ed., Atlanta, Burgess Publishing, 258, r1964.

10. FALCÃO, D. P. — Investigação sôbre a presença de *Salmonella* em Araraquara (SP) com referência especial aos processos de isolamento. Araraquara, Faculdade de Farmácia e Odontologia, [Tese], 1969.

11. FALCÃO, D. P. & SUASSUNA, I. — Comparação do meio de Rappaport e do meio de tetrationato de Kauffman, em diversos esquemas para isolamento de *Salmonella*. Isolamento eventual de *Shigella*. *Rev. Microbiol.*, **2**:29-36, 1971.

12. FALCÃO, D. P. & SUASSUNA, I. — Crescimento e viabilidade de *Salmonella* em diversas variações do meio de Rappaport. *Rev. Microbiol.*, **1**:13-18, 1970.

13. FALCÃO, D. P.; SUASSUNA, I. & SUASSUNA, I. R. — Avaliação do poder seletivo do meio de Rappaport para diversas espécies de enterobactérias. *Rev. Soc. bras. Med. Trop.*, **3**:129-136, 1969.

14. FALCÃO, D. P.; SUASSUNA, I. & SUASSUNA, I. R. — Comportamento de algumas enterobactérias no meio de Rappaport, com referência especial a Shigella. *Cienc. Cult.*, **19**:457-458, 1967.

15. FERNANDES, M. R. & TRABULSI, L. R. — A new *E. coli* serotype causing experimental keratoconjunctivitis in the guinea pig. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, **9**:62, 1967.

16. FISCHER, A. R. — Etiologia bacteriana das diarréias infantis. I — Achados bacteriológicos em lactentes e crianças maiores até 5 anos. *J. de Pediat.*, **26**:192-201, 1961.

17. FISCHER, A. R. — Etiologia bacteriana das diarréias infantis. II — Incidência de tipos enteropatogênicos de *E. coli* na diarréia no neonatal. *J. de Pediat.*, **26**:202-207, 1961.

18. GOES, P.; SUASSUNA, I. & SUASSUNA, I. R. — Considerações sôbre a etiologia das infecções intestinais. *An. Microbiol.* (*Rio de J.*), **5**:221-237, 1957.

19. GORDON, J. E.; BEHAR, M. & SCHRIMSHAW, N. S. — La enfermidad diarréica aguda en los paises en vias de desarrolo. 1 — Base epidemiológica de su control. *In*: U. S. Organización Panamericana de la Salud — *Control de las infecciones entéricas*. Washington, Publicacions Cientificas n. 100, 1964.

20. KAUFFMANN, F. — *Enterobacteriaceae*. 2.º ed., Copenhagen, Ejnar Munksgard Publ., 382, 1954.

21. KHANDUJA, P. C.; BHARGAVA, S. K.; GOUR, H. K. & MALIK, D. N. — A etiological aspects of diarrhoea in infants and children under 5 years. *Indian J. Pediat.*, **36**:237-241, 1969.

22. LAURENTI, R. — Causas de mortalidade infantil em crianças de 1-4 anos em São Paulo: resultados provisórios referentes ao 1.º ano da "Investigação Interamericana de Mortalidade na Infância". *Rev. Saúde públ.*, **4**:101-104, 1970.

23. MANISSADJIAN, A.; PENNA, H. A. O.; BARBIERI, D. & TRABULSI, L. R. — Incidência de Enterobactérias em Berçário Aberto. *Rev. paul. Med.*, **66**:63-67, 1965.

24. MANOLOV, D. G. — A new species of bacterium of genus *Shigella*. *J. Microbiol. Epidem. Immunobiol.*, **29**:1979-1982, 1958.

25. MAROJA, R. C. & ALMEIDA, A. S. — Diarréias infectuosas e Desnutrição. *Rev. SESP*, **10**:715-732, 1959.

26. MAROJA, R. C.; ALMEIDA, A. J.; SOUZA, E. B. & FREITAS, E. N. — Estudo de uma epidemia de diarréia infantil em Fortaleza, Ceará. 1957. *Rev. SESP*, **10**:733-739, 1959.

27. MAROJA, R. C.; FREITAS, E. N. & FERRO, T. L. — Frequência de Enterobactérias e enteroparasitas em casos de diarréia aguda em menores de 1 ano, Palmares, Pernambuco, 1956. *Rev. SESP*, **10**:747-757, 1959.

28. MAROJA, R. C.; FREITAS, E. N. & CRUZ, F. M. — Tipos de *Salmonella* isolados na zona da Mata em Pernambuco, 1956-1958. *Rev. SESP*, **10**:759-763, 1959.

29. MAROJA, R. C.; FREITAS, E. N. & CRUZ, F. M. — Tipos de *Shigella* isolados na cidade de Agua Preta, Joaquim Nabuco de Palmares, Pernambuco. *Rev. SESP*, **10**:765-768, 1959.

30. MAROJA, R. C. & LOVERY, W. D. — Estudo sobre diarréias agudas. II — Freqüência de *Shigella* e *Salmonella* nos casos de diarréia aguda em Santarém, Pará. *Rev. SESP*, **8**: 585-589, 1956.

31. MAROJA, R. C. & LOVERY, W. D. — Estudos sobre diarréias agudas. IV — Tipos de *Salmonella* isolados em casos de diarréias em Santarém, Pará. *Rev. SESP*, **8**:595-598, 1956.

32. MIKOSZEWSKA, I. — Shigelose em crianças de Curitiba. *An Fac. Med. Univ. Fed. Paraná*, **3**:83-86, 1960.

33. Ministério do Planejamento e Coordenação Econômica — Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. *Saúde e Saneamento*. Rio de Janeiro, maio, 40-42, 145, 146, 148, 1966.

34. Ministério da Saúde — Centro de Investigações epidemiológicas. Notas epidemiológicas. Desidratação na cidade de São Paulo. *Bol. Epidemiol.* (*Rio de J.*), **1**:65-67, 1969.

35. Ministério da Saúde. Centro de Investigação Epidemiológica. Notas Epidemiológicas. Mortalidade por diarréia infecciosa entre crianças no Brasil. *Bol. Epidemiol.*, **2**:17, 1970.

36. MONTELLI, A. C. & TRABULSI, L. R. — Diarréias causadas por *Shigella*, *Salmonella* e *E. coli* enteropatogênica no Município de Botucatú, São Paulo. *Rev. Assoc. Méd. Bras.*, **16**:23-26, 1970.

37. MURAHOVSCHI, J.; CIOCHETTI, D.; ZACCHI, M. A. S.; SARMENTO, F. M.; GOULART, G. G.; CRESPIN, J.; STEIN, M. L.; SANTIAGO, J. R.; ZENOV, T.; TEIXEIRA, O.; FARIA, M. C. O.; SIMON, M. A. B.; MERCÚRIO, M. H. B.; ALVES, N.; FRANCO de ALMEIDA, S.; BELIGNI, A.; SCAFF, A.; GOLDMAN, L.; TULIO, C. V. & BLASI, R. — Estudo sobre a etiologia das diarréias agudas do lactente e ensaio de tratamento com o sulfato de framicetina e o sulfato de canamicina. *J. de Pediat.*, **28**:1-50, 1963.

38. NEEDHAN, G. M. & WENZL. J. E. — Coli patogênico e surto de diarréia. *Minn. Med.*, **50**:1311, 1967, APUD: *Attual. méd.*, 4(8): 133, 1968.

39. PELUFFO, C. A.; BIER, O.; AMARAL, J. P. & BIOCCA, E. — Estudos sobre as salmoneloses em São Paulo. I — Incidência dos diferentes tipos em diarréias infantis. *Mem. Inst. Butantan*, **19**:211-215, 1946.

40. PIÉCHAUD, D.; SZTURN-RUBINSTEN, S. & CHARPAK, M. — Un nouveau sérotype de "Parashigella". *Ann. Inst. Pasteur Lille*, **108**:125-129, 1965.

41. RAPPAPORT, F.; KONFORTI, N. & NAVON, B. — A new enrichment medium for certain. *Salmonellae. J. clin. Path.*, **9**:261-266, 1956.

42. RAYA, L. C.; SOLÉ-VERNIN, C. & MOLINARI, A. S. — Verificação de *E. coli* 0111: B4 em surto de gastroenterocolite entre prematuros no berçário do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. *O Hospital*, **72**:1175-1187, 1967.

43. ROCHA, J. M. — Introdução. Sistemática. Definição. *In*: Simpósio sobre as diarréias agudas no lactente. *Bol. Inst. Pueric. (Rio de J.)*, **17**:199-200, 1960.

44. ROUQUAYROL, M. Z. — Diarréias infantis em Fortaleza, contribuição ao estudo com especial referência às shigeloses. Faculdade de Farmácia e Odontologia da Universidade do Ceará. [Tese], 1962.

45. SERENY, B. — Bichemical reactions and virulence of *E. coli* 0124:K72 (B17) — *Acta microbiol. Acad. Sci. hung.*, **10**:11-18, 1963.

46. SERRANO, J. A. & TRABULSI, L. R. — Observações sobre a freqüência de isolamento de *Shigella, Salmonella* e *E. coli* enteropatogênica das fezes de crianças com diarréia aguda, na cidade de São Paulo. *Arq. Gastroenterol.*, **3**:221-225, 1966.

47. SOLÉ-VERNIN, C.; BARACCHINI, O.; COSTA, A. & ITO, I. Y. — Nota sobre a família Enterobacteriaceae em Ribeirão Preto, SP. — *O Hospital*, **74**:229-234, 1968.

48. SOLÉ-VERNIN, C. & SOARES, R. — Verificação de *Shigella Quetia* 454, de Sachs, em Araraquara, São Paulo. *O Hospital*, **40**:159-169, 1951.

49. SUASSUNA, I. & SUASSUNA, I. R. — Dificuldades e Problemas na conceituação etiológica dos distúrbios diarréicos. *J. de Pediat.*, **25**:392-405, 1960.

50. SUASSUNA, I. & SUASSUNA, I. R. — Interações entre infecções intestinais e distúrbios do estado nutritivo. *Bol. Ofic. sanit. panamer.*, **61**:504-521, 1966.

51. SZTURN-RUBINSTEN, S.; PIACHAUD, D. & CHARPAK, M. — Shigella Alkalescens Dispar: Souches intermediaries. *Ann. Inst. Pasteur Lille*, **106**:122-126, 1964.

52. TAUNAY, A. E. — Diagnóstico bacteriológico das salmonelas de origem animal, sua importância e freqüência no Município de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **28**:43-69, 1968.

53. TAUNAY, A. E.; CORRÊA, G. A. & FLEURY, C. T. — Freqüência de alguns agentes microbianos nas chamadas diarréias infantis em São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **5**: 331-336, 1945.

54. TAUNAY, A. E.; MARTINS, H.; TOPOROWSKI, J.; TOLEDO, L. A. & PEIXOTO, E. S. — Investigações Laboratoriais sobre a enterite infantil por *E. coli* G.E.I. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **18**:45-81, 1958.

55. TAUNAY, A. E. & SOLÉ-VERNIN, C. — Sobre a ocorrência de bactérias dos gêneros *Shigella* e *Salmonella* em Araraquara, SP. *O Hospital*, **41**:43-49, 1952.

56. TRABULSI, L. R.; FERNANDES, M. R. F. & ZULIANI, M. E. — Novas bactérias patogênicas para o intestino do homem. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, **9**:31-39, 1967.

57. TRABULSI, L. R.; ZULIANI, M. E. & SERRANO, J. A. — On two enterobacteria pathogenic to the guinea-pig eye (cultures 185T-64 and 193T-64). *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, **7**:241-246, 1965.

58. VALLADA, E. P. — Ocorrência de *E. coli* do grupo G.E.I. em Botucatu. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **19**:9-10, 1959.

59. VERTUAN, V. — Principais causas de mortalidade infantil em Araraquara. *Rev. Fac. Farm. Odont. Araraquara*, **4**:229-235, 1970.

60. VILLASEÑOR, J. V. — Epidemiologia de las diarreas. *Salud públ. Méx.*, **11**:741-757, 1969.

61. VOROS, S.; REDEY, B. & CSIZMAZIA, F. — Antigenic structure of a new enteropathogenic *E. coli* strain. *Acta microbiol. Acad. Sci. hung.*, **11**:125-129, 1964.

Recebido para publicação em 25/2/1972.

Rev. Microbiol.
3(3):139-146, julho-setembro, 1972

MÉTODO SEMI-QUANTITATIVO COM ALÇA BACTERIOLÓGICA CALIBRADA PARA INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA BACTERIÚRIA ASSINTOMÁTICA (*)

LOURENÇO, N. J.; COLLARES, L. B. (**); PABST, P. A. (**); CORDEIRO, H. DE A.; GUIMARÃES, O. R.; GERK, J. R.; FERREIRA, S. J.; OLIVEIRA, J. F. DE S.; Noleto, ALBA L. S. & SUASSUNA, I. (1)

RESUMO

Foi feita avaliação de espécimes urinárias pelo método semi-quantitativo descrito por Hoeprich. O método foi aplicado no estudo de 931 crianças em idade escolar na faixa de 6 a 14 anos de idade, no Rio de Janeiro. Foi utilizada uma alça de platina padronizada para descarregar 0,001 ml de urina, na superfície de um agar-extrato de levedura-glicosado, sendo o meio distribuído em garrafas de faces paralelas e retangulares.

781 espécimes (83,9%) não apresentaram crescimento ou houve crescimento de bactérias em número menor de 10 colônias (10^4 colônias/ml), não sendo posteriormente examinados.

Em 150 casos (16,1%) com contagens acima deste limite, um segundo exame foi solicitado para confronto com os métodos de cultivo quantitativo mais convencionais. Destes, 146 casos atenderam a solicitação e novos espécimes urinários foram obtidos, dando nessa repetição contagens inferiores a 10^4 colônias/ml em 136 casos (93,1%), cinco (3,4%) mostraram contagens entre 10^4-10^5 colônias/ml e outras 5 mais do que 10^5 colônias/ml.

Os casos (5) que mostraram bastonetes Gram negativos, com contagem superior a 10^4 colônias/ml, pelo método semi-quantitativo ou pelo método convencional foram submetidos a controle clínico para acompanhar a bacteriúria e investigar fatores responsáveis pela mesma, como descrito em trabalho subseqüente.

No conjunto, o método adotado pareceu econômico e adequado para analisar um grande número de casos em tempo curto, visto que aparentemente induziu a um erro para o lado de falso positivos, permitindo o reexame de reduzido número de casos selecionados (1 em 6 em nossa experiência), o que seria feito de modo mais dispendioso e demorado pelos métodos convencionais.

INTRODUÇÃO

A conceituação quantitativa da bacteriúria introduzida por KASS & SANFORD [27], permitiu a avaliação de bacteriúria significativa sob o ponto de vista clínico e epidemiológico, surpreendendo desta forma pielonefrites assintomáticas, que podem evoluir para a forma crônica [8, 17, 18, 19, 20] dando posterior quadro de insuficiência renal, hipertensão arterial e talvez justificando a freqüência de diagnóstico através a necrópsia [15].

Com a urinocultura quantitativa, foi possível a diferenciação entre flora normal da uretra e bactérias responsáveis por infecções urinárias as quais se multiplicam na urina e trato urinário, aparecendo em número elevado, embora qualitativamente idênticos aos anfibiontes de contaminação [11].

(*) Trabalho do Serviço de Microbiologia e Imunologia, Cadeira de Medicina Social e Seção de Rim e Eletrolitos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de do Estado da Guanabara.

(**) Bolsista do Conselho Nacional de Pesquisas.

(1) Da Faculdade de Ciências Médicas da U.E.G., e do Instituto de Microbiologia da U.F.R.J.

Entretanto, em inquéritos epidemiológicos a adoção de tal método se torna laboriosa, somada à necessidade de grande quantidade de material, pessoal e tempo, sendo por conseguinte desejável para aplicação em massa o emprego de técnicas bacteriológicas que contornem essas dificuldades.

Baseados nestes princípios, foram propostos diferentes métodos, tais como a simples bacterioscopia e avaliação da piúria do sedimento urinário [3, 4, 5, 16], os testes bioquímicos de redução do nitrato [29, 30], da catalase [1, 9, 31] e de redução do trifenil tetrazólio [7, 10, 28], e, ainda, os testes turbidimétricos [23].

Analisando os dados de diferentes autores, propusemo-nos empregar um método semi-quantitativo, utilizando-se alça de platina calibrada, segundo observações de HOEPRICH [11], O'SULLIVAN et al.[24], MOU & FELDMAN [23] e RANDOLPH et al.[25, 26].

MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho, foram analisadas 931 espécimes urinárias de crianças de ambos os sexos, com idade variável entre 6 e 14 anos, de uma escola primária da Secretaria de Educação da Guanabara (Escola Argentina).

A colheita do material foi efetuada no Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas, por enfermeira devidamente orientada no sentido de fazer a lavagem cuidadosa da genitália externa com água e sabão, desprezando-se o primeiro jato e colhendo-se em frasco esterilizado a porção subseqüente, anterior a final (meio do jato) [11].

Os espécimes foram enviados ao laboratório num período de tempo inferior à 1 hora, e conservados à temperatura de 4-6°C [23], sendo o plantio efetuado no máximo até 24 h.

O diagrama I, resume as etapas concernentes ao exame bacteriológico. Foi inicialmente utilizado um método semi-quantitativo (Etapa I), consistindo no plantio do material, homogeneizado por agitação manual do recipiente, em frascos de vidro de faces retangulares paralelas com capacidade de 100 ml, contendo agar extrato de levedura glicosado, com a seguinte composição:

Trypticase (B.B.L.)	0,5 g
Peptona Bacteriológica (Geyger) (*)	0,5 g
Extrato de levedura	0,3 g
Cloreto de sódio	0,5 g
Fosfato dibásico de potássio	0,1 g
Glicose	0,1 g
Agar-Agar	2,0 g
Água destilada	100,0ml
pH ..... 7,2 a 7,4	

(*) Laboratório Geyer S.A. — Rua Pelotas, 320 Porto Alegre — R. G. do Sul.

Este plantio primário foi feito com alça de platina padronizada para descarregar 0,001 ml de líquido (Inoculating loop. Platinum-Rhodium Shank (75mm long. Arthur Thomas, n.° 7433-G). O período de incubação foi de 48h à 37°C.

Os espécimes com contagens de colônias por milímetro superiores ou iguais a 10^4, eram submetidos à análise quantitativa (Etapa II), semeando-se este material, em placas de Petri de 10 cm de diâmetro com o meio acima descrito, após diluição em solução salina estéril à 0,85%, diluições estas correspondentes à 10^{-2} ou 10^{-3}, de acordo com prévia bacterioscopia de uma gota não sedimentada, corada pelo método de Gram, respeitadas as mesmas condições de tempo e temperatura de incubação acima referidas.

Acompanhando o diagrama I, podemos verificar que as contagens inferiores à 10^4 foram consideradas como espécimes negativos nas etapas I e II. A presença de microrganismos significativos, responsáveis por infecções urinárias, com contagem superior a 10^5 colônias/ml era considerado um resultado positivo sob o ponto de vista bacteriológico, e os casos selecionados para estudo clínico. Quando se obtinham essas mesmas contagens, porém, com presença de germes "difteróides", micrococos ou outros contaminantes menos significativos da microbiota normal da uretra, os espécimes originais eram submetidos à nova verificação quantitativa. O mesmo ocorria com contagens na faixa de 10^4 a 10^5 colônias/ml com presença de bactérias consideradas significativas, tais como bastonetes Gram negativos e *Staphylococcus aureus*. Quando se confirmava a presença destes últimos microrganismos nas culturas subseqentes, os pacientes eram encaminhados à observação e controle clínico.

RESULTADOS

De acordo com a tabela I, 781 (83,9%) espécimes urinárias apresentaram contagem inferior a 10^4 colônias/ml na etapa I, considerada como não significativa de bacteriúria assintomática [2, 22].

A maior prevalência de casos acima desta contagem verificou-se em meninas, num total de 115, contra 35 meninos, sendo que na faixa de 10^4 a 5×10^4 colônias/ml, encontramos a maior prevalência para ambos os sexos.

Era esperado encontrar maior número de casos no sexo feminino, devido à riqueza da flora vaginal em relação à da uretra masculi-

DIAGRAMA I

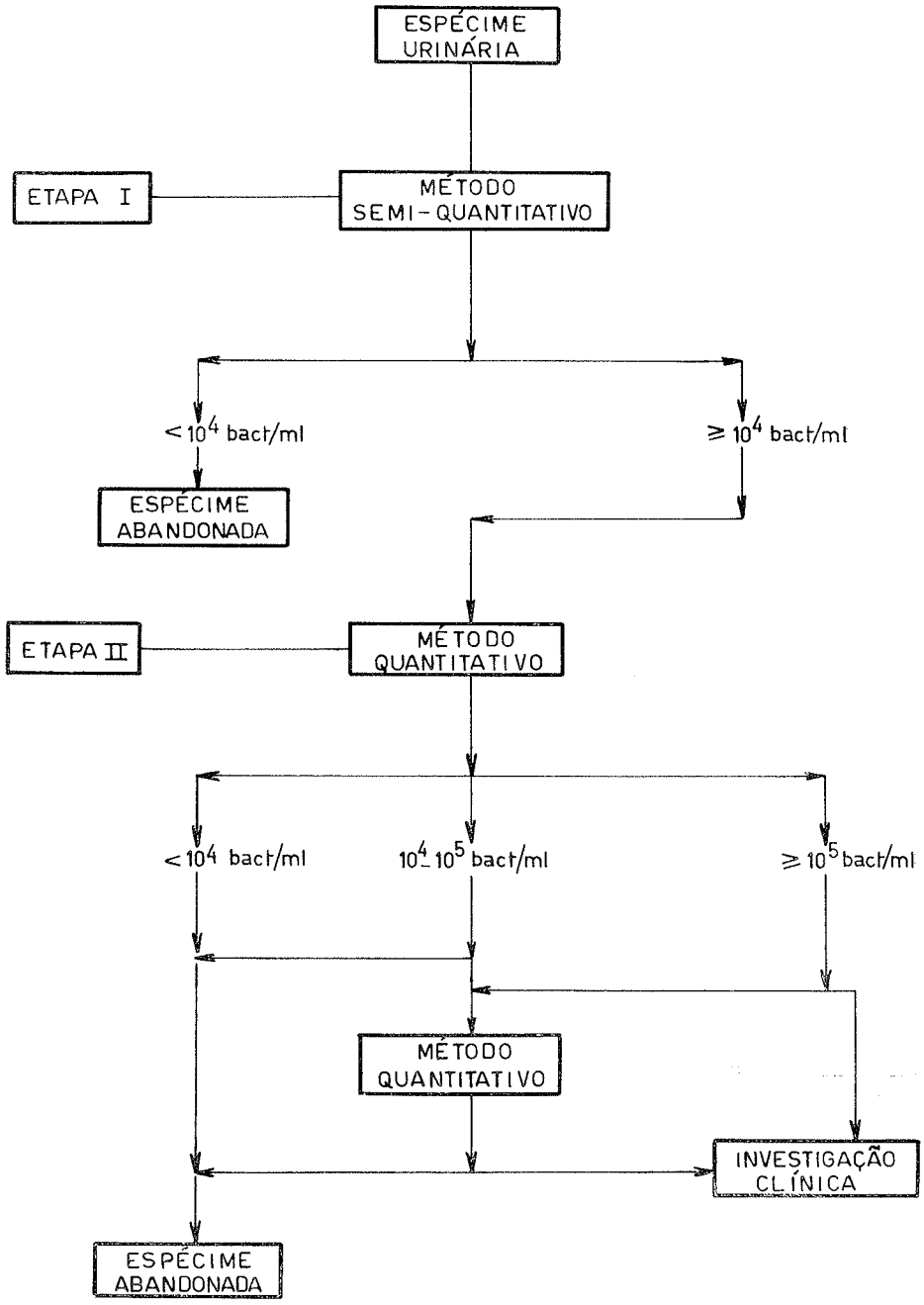

ESPÉCIME URINÁRIA
ETAPA I
MÉTODO SEMI-QUANTITATIVO
< 10^4 bact/ml
≥ 10^4 bact/ml
ESPÉCIME ABANDONADA
ETAPA II
MÉTODO QUANTITATIVO
< 10^4 bact/ml
10^4-10^5 bact/ml
≥ 10^5 bact/ml
MÉTODO QUANTITATIVO
INVESTIGAÇÃO CLÍNICA
ESPÉCIME ABANDONADA

TABELA I

Valores obtidos com o método semi-quantitativo (alça calibrada) para avaliação de bacteriúria em 931 espécimes de escolares.

Número examinado			Colônias/ml							
			$< 10^4$		$10^4-5\times10^4$		$5\times10^4-10^5$		$> 10^5$	
	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%
Meninos	527	100	492	93,4	24	4,6	5	0,9	6	1,1
Meninas	400	100	289	71,5	67	16,6	18	4,5	30	7,4
Total	931	100	781	83,9	91	9,8	23	2,5	36	3,8

TABELA II

Resultados obtidos com 146 urinoculturas selecionadas pelo método semi-quantitativo, quando repetidas pela técnica convencional de diluições seriadas em meio sólido.

Número examinado			Colônias/ml								Não compareceram
			$< 10^4$		$10^4-5\times10^4$		$5\times10^4-10^5$		$> 10^5$		
	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	
Meninos	34	100	32	94,1	1	2,9	0	—	1	2,9	1
Meninas	112	100	104	92,8	2	1,8	2	1,8	4	3,6	3
Total	146	100	136	93,1	3	2,1	2	1,4	5	3,4	4

na observando-se uma predominância de bastonetes e cocos Gram positivos. Em 11 casos foi verificada a presença de bastonetes Gram negativos, distribuídos entre oito meninas e três meninos. Naquelas, cinco casos corresponderam à contagem entre 10^4 e 10^5 e três estavam acima de 10^5 colônias/ml. Entre os meninos, dois mostravam contagem entre 10^4 e 10^5 e um acima de 10^5 colônias/ml. Dos quatro casos, com contagem superior à 10^5 colônias/ml, dois revelaram *Escherichia coli*, um *Klebsiella-Enterobacter* e outro estava associado a um bastonete Gram positivo não identificado.

Segundo a tabela I e baseado no diagrama I, as contagens superiores ou iguais a 10^4 colônias/ml num total de 150 (16,1%), foram submetidas a novos estudos (Etapa II). De acordo com a tabela II onde são apresentados os resultados dessa etapa podemos verificar que 104 (92,8%) meninas e 32 (94,1%) meninos apresentaram contagem inferior a 10^4, duas (1,8%) meninas e um (2,9%) menino, com contagem na faixa de 10^4 e 5×10^4 colônias/ml, duas (1,8%) meninas entre 5×10^4 e 10^5 colônias/ml e finalmente quatro (3,6%) meninas e um (2,9%) menino acima de 10^5 colônias/ml. Quatro crianças não foram reexaminadas, por haverem deixado de comparecer.

Foi verificada a predominância de *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus* não hemolíticos (gama), "difteróides" e *Lactobacillus*. De acordo com o diagrama I, verificamos que só as contagens superiores a 10^5 colônias/ml com o isolamento destes microrganismos mereceram nova reavaliação.

Verificamos a presença do gênero *Proteus*, na faixa entre 10^4 e 10^5 colônias/ml, sendo estes casos submetidos a nova cultura.

De duas meninas foi isolado *Escherichia coli* em um caso com contagem igual a 97.000 colônias/ml e um outro acima de 10^6 colônias/ml. De um menino isolou-se *Klebsiella-Enterobacter*, com contagem igual a 5×10^5 colônias/ml. Os dois últimos casos citados foram entregues à exploração clínica e foi reexaminado o caso próximo a 100.000 colônias/ml.

Em um dos dois meninos evidenciamos a presença de *Proteus* na faixa de 10^4 a 5×10^4 colônias/ml, sendo submetido a novo controle bacteriológico.

Numa terceira cultura (Tabela III) verificamos que cinco meninas tiveram contagens inferiores a 10^4 sendo que um dos espécimes permaneceu na faixa de 10^4 a 5×10^4, tendo-se isolado mais uma vez *Proteus*. Não conseguimos isolar *Escherichia coli*, do caso anterior com contagem igual a 97.000 colônias/ml.

TABELA III

Confirmação da bacteriúria assintomática pela repetição da urinocultura quantitativa em um novo espécimen de urina.

Número examinado			Colônias/ml								Não compareceram
			$< 10^4$		$10^4-5\times10^4$		$5\times10^4-10^5$		$> 10^5$		
	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	
Meninos	1	100	1	100	—	—	—	—	—	—	—
Meninas	6	100	5	83,3	1	16,7	—	—	—	—	1
Total	7	100	6	85,7	1	14,3	—	—	—	—	1

TABELA IV

Correlação entre os valores obtidos para a contagem de colônias com método quantitativo e semi-quantitativo em 136 espécimes de urina.

Método semi-quantitativo	Método quantitativo							
Colônias/ml	Colônias/ml							
	$< 10^4$		$10^4-5\times10^4$		$5\times10^4-10^5$		$> 10^5$	
	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%
$10^4 - 5 \times 10^4$	87	59,6	1	0,7	1	0,7	—	—
$5 \times 10^4 - 10^5$	20	13,7	—	—	1	0,7	2	1,4
$> 10^5$	29	19,9	2	1,4	—	—	3	2,1
Total	136	93,1	3	2,1	2	1,4	5	3,4

Obtivemos, contagem menor que 10^4, em relação ao menino, apesar de se isolar a mesma espécie de microrganismo.

Na primeira cultura, como já foi mencionado, uma das meninas apresentava *Escherichia coli*, com contagem superior a 10^5 colônias/ml, entretanto em culturas subsequentes (duas), o mesmo microrganismo não foi isolado. Não compareceram duas crianças na segunda repetição e uma na terceira, de acordo com o expresso nas tabelas II e III.

DISCUSSÃO

Como podemos verificar nas tabelas I e II, observamos uma maior prevalência do que poderiam ser considerados resultados positivos nas contagens superiores a 10^4 colônias/ml, em relação ao método semi-quantitativo.

Dos 146 espécimes analisados pelo método quantitativo (Tabela IV) 136 (93,1%) apresentaram contagens inferiores a 10^4, correspondendo ao método em estudo em 87 casos (59,6%) na faixa de 10^4 — 5×10^4, 20 (13,7%) na faixa entre 5×10^4 — 10^5 e 29 (19,9%) para contagens superiores a 10^5 colônias/ml.

Nos casos, em número de 10, nos quais obtivemos contagens superiores a 10^4 colônias/ml com ambos os métodos, verificamos que 5 (3,4%) permaneceram dentro das mesmas faixas; 2 (1,4%) entre 10^4 — 5×10^4 haviam apresentado contagem superior original a 10^5 colônias/ml, com o método de triagem. Finalmente, em 1 caso (0,7%) entre 5×10^4—10^5 e em 2 (1,4%) acima de 10^5 colônias/ml havíamos encontrado, contagens nas faixas respectivamente correspondentes a 10^4 — 5×10^4 com o método semi-quantitativo.

Podemos concluir portanto que o método estudado nos possibilita a seleção de casos, apresentando um erro teórico devido ao número de falsos positivos, o que não o invalida como método de triagem. Considerando o volume de meio utilizado, a facilidade de plantio com alça graduada, evitando diluições que proporcionem uma maior perda de tempo e material, parece-nos que este método assegura a sua aplicação em inquéritos epidemiológicos, confirmando os estudos de outros autores [11, 23, 24, 25, 26].

Em relação aos achados bacteriológicos, verificamos que dois espécimes urinários tiveram contagens superiores a 10^5 colônias/ml

e foram isolados bastonetes Gram negativos em ambas as etapas, não sendo necessária nova repetição (Tabela III).

Um caso em que na etapa I (Diagrama I), foi isolado *Escherichia coli*, com contagem superior a 10^5, não foi confirmado em culturas subseqentes, entretanto foram estas últimas efetuadas num espaço de tempo superior a 1 mês, sendo a criança submetida a observação clínica para conclusões finais. O mesmo aconteceu com o caso com contagem igual a 97.000 colônias/ml.

Na faixa de 10^4 a 10^5, isolou-se *Proteus*, que entre os meninos talvez deva merecer melhor atenção pois como sabemos, a microbiota uretral é mais pobre que a vaginal, parecendo pertinente o exame de tais casos.

Como poderá ser verificado em um outro trabalho desta série [6] das 931 crianças, cinco (0,537%) mereceram melhores estudos sob o ponto de vista clínico, de acordo com a orientação dos achados bacteriológicos nas observações acima referidas.

SUMMARY

An evaluation was done of the semi-quantitative colony counting method in urine cultures as described by Hoeprich. The method was applied to the study of 931 Grammar-school children with ages ranging from 6 to 14 years, in Rio de Janeiro.

By using a calibrated platinum bacteriological loop, delivering 0,001 ml of urine, a drop was spread on the surface of a Trypticase-dextrose-yeast extract-agar, dispensed in medicine bottles of retangular and parallel faces. Seven hundred eight one specimens (83,9%) showing none, or less than 10 colonies on the plated medium (less than 10^4 colonies/ml) were no further examined. In 150 cases (16,1%) with counts above this limit, a second bacteriological examination was requested to be performed with more conventional quantitative cultural methods.

From these, 146 cases made available a new urinary specimen which gave on repetition, less than 10^4 colonies per milliliter in 136 cases (93,1%). Five (3,4%) showed counts between 10^4-10^5 colonies per milliliter, and other 5 gave more than 10^5 colonies per milliliter.

The cases (5) which yielded gram-negative rods in counts above 10^4 colonies/ml by the semi-quantitative method and/or the conventional method, were submitted to clinical control to follow the bacteriuria and to investigate the underlying factors responsible.

In the overall the adopted method seemed unexpensive and adequate for screening large number of cases in short time, since it apparently induced to error on the side of false-positives results, allowing to reexamination of a reduced number of selected cases (1 in 6 our experience) by the more expensive and time-consuming conventional methods.

AGRADECIMENTOS

Queremos externar nossos agradecimentos à Professora Maria Antonieta Bittencourt Borges, Diretora da Escola Argentina, por nos ter facilitado a realização deste trabalho e à Enfermeira Nilce Xavier de Lima e suas auxiliares Renê Alves, Valquíria Pereira Vieira, Lêda Figueiredo e Dirce Paula, na realização da colheita do material.

Uma palavra especial de agradecimento ainda, ao Professor Jayme Landmann, pelo estímulo e facilidade concedidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRAUDE, A. I. & BERKOWITZ, H. — Detection of urinary catalase by disk flotation. *J. Lab. clin. Med.*, **57**:490-494, 1961.

2. BULGER, R. J. & KIRBY, W. M. M. — Simple test for significant bacteriuria. *Arch. intern. Med.*, **112**:742-746, 1963.

3. COOK, E. N. — Pratical aspects of the managment of urinary tract infections. *J. Lancet*, **79**:335-339, 1959.

4. COOK, E. N. — Thirty-three years perspective of urinary tract infections. *Mayo Clin. Proc.*, **41**:536-537, 1966.

5. COOK, E. N. — Infections of urinary tract. Fundamental concepts of diagnosis and treatment. *J. Amer. med. Ass.*, **195**:193-194, 1966.

6. CORDEIRO, H. de A.; LOURENÇO, N. J.; GERK, J. R.; GUIMARÃES, O. R.; OLIVEIRA, J. F. S.; FERREIRA, S. J.; PABST, R. A.; COLLARES, L. B. & SUASSUNA, I. — Investigação clínico-epidemiológica da bacteriúria assintomática em escolares de nível primário no Estado da Guanabara. *O Hospital*, **78**:1275-1288, 1970.

7. DARRICARRERE, R. T. T; LEON, M. B.; ESTACIO, G. Z. & ROMERO, V. — Prueba de laboratório para diagnóstico de infección urinária. Reducion del cloruro de 2, 3, 5, trifenil-tetrazolium. *Acta med. venez.*, **13**: 152-155, 1966.

8. FAVOUR, C. B. — Response of the connective tissue and the local immune reaction in the kidney as related to pyelonephritis. *Sth. med. J. (Bgham, Ala.)*, **54**:839-848, 1961.

9. GREENBERG, N. D.; STALLER, J. & ANDELMON, S. L. — Detection of urinary tract infections in pregmant women. *Publ. Hlth Rep.* (Wash.), **80**:805-811, 1965.

10. GUZE, L. B. & KALMANSON, G. M. — Observations on the use of the tryphenyl tetrazolium chloride test to determine significant bacteriuria. *Amer. J. med. Sci.*, **246**: 691-694, 1963.

11. HOEPRICH, P. D. — Culture of the urine. *J. Lab. clin. Med.*, **56**:899-907, 1960.

12. KAITZ, A. L. & WILLIAMS, E. J. — Bacteriuria and urinary-tract infections in hospitalized patients. *New Engl. J. Med.*, **262**: 425-431, 1960.

13. KASS, E. H. — Chemotherapeutic and antibiotic drugs in the managment of the urinary tract. *Amer. J. Med.*, **18**:764-781, 1955.

14. KASS, E. H. — Bacteriuria and diagnosis of infections of the urinary tract. *Arch. intern. Med.*, **100**:709-714, 1957.

15. KLEEMAN, C. R.; HEWITT, W. L. & GUZE, L. B. — Pyelonephritis. *Medicine* (Baltimore), **39**:3-116, 1960.

16. KOLMER, J. A. — Clinical Diagnosis by Laboratory Examinations. 2nd. ed. New York, Applenton-Century-Crofts, 1949.

17. KUNIN, C. M. — Epidemiology and natural history of urinary tract infections in school children. *Bull N. Y. Acad. Med.*, **40**:767-775, 1964.

18. KUNIN, C. M.; DEUTSCHER, R. & PAQUIN Jr., A. J. — Urinary-tract infections in school children: an epidemiologic, clinical and laboratory study. *Medicine* (Baltimore), **43**: 91-130, 1964.

19. KUNIN, C. M.; ZACHA, E. & PAQUIN Jr., A. J. — Urinary-tract infections in school children. I. Prevalence of bacteriuria and associated urologic findings. *New Engl. J. Med.*, **266**:1287-1296, 1962.

20. LINCOLN, K. & WINBERG, J. — Studies of urinary tract infections infance and childhood. II. Quantitative estimation of bacteriuria in unselected neonates with special reference to the occurence of assymptomatic infections. *Acta Pediatr.*, **53**:307-316, 1964.

21. MANION, R. E. & HALL, W. H. — A rapid method for quantitative urine cultures. *J. Lab. clin. Med.*, **49**:819-824, 1957.

22. MILLER, S. E. — A Textbook of Clinical Pathology. 6th ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1960.

23. MOU, T. W. & FELDMAN, H. A. — The enumeration and preservation of bacteria in urine. *Amer. J. clin. Path.*, **35**:572-575, 1961.

24. O'SULLIVAN, O. J.; FITZGERALD, M. G.; MEYNELL, M. J. & MALINS, J. M. — A simplified method for the quantitative bacterial culture of urine. *J. clin. Path.*, **13**: 527-528, 1960.

25. RANDOLPH, M. F.; GREENFIELD, M. & GREASY, J. — Ten-second urine culture and colony count. *Amer. J. Dis. Child.*, **108**: 348-350, 1964.

26. RANDOLPH, M. F. & GREENFIELD, M. — The incidence of assymptomatic bacteriuria and pyuria in infance. *J. Pediat.*, **65**:57-66, 1964.

27. SANFORD, J. P.; FAVOUR, C. B.; MAO, F. H. & HARRISON, J. H. — Evaluation of "positive" urine culture: approach to differentiation of significant bacteria from contaminants. *Amer. J. Med.*, **20**:88-93, 1956.

28. SIMMONS, N. A. & WILLIAMS, J. D. — A simple test for significant bacteriuria. *Lancet*, **1**:1377-1378, 1962.

29. SLEIGH, J. D. — Detection of bacteriuria by a modification of the nitrite test. *Brit. med. J.*, **1**:765-767, 1965.

30. SMITH, L. G.; THAYER, W. R.; MALTA, E. M. & UTZ, J. P. — Relationship of the Griess nitrite test to bacterial culture in the diagnosis of urinary tract infection. *Ann. Intern. Med.*, **54**:66-72, 1961.

31. WEISER, O. L. & EMERSON, J. S. — Selective screening for quantitative urine cultures. *Amer. J. clin. Path.* **45**:649-650, 1966.

Recebido para publicação em 16/5/1972.

Rev. Microbiol.
3(3):147-152, julho-setembro, 1972

ESTUDO DA FLORA MICROFÚNGICA DE UMA ÁREA MINERALIZADA DE COBRE, EM MARAGOGIPE, EST. DA BAHIA

Regina M. RIBEIRO (*), Hebe Labarthe MARTELLI (**) & Adelaide Mussi SANTOS (*)

RESUMO

Foi estudada a possibilidade de relacionar o grau de mineralização e o teor de cobre de solos com a natureza da flora microfúngica isolada. Houve predominância definida e uniforme das espécies do gênero Penicillium. As condições não foram suficientes para estabelecer nesses solos uma flora microfúngica típica, tendo porém ocorrido limitação quantitativa a partir de 40 μg/ml de cobre no solo.

INTRODUÇÃO

A idéia básica que orientou esta pesquisa foi verificar se o teor de um elemento no solo podia condicionar uma flora de fungos filamentosos específica, considerando que o crescimento de alguns fungos pode ser dependente e proporcional ao teor de certos elementos presentes. E, inversamente, se a presença de flora específica poderia servir de orientação para a avaliação do grau de mineralização do solo. Foi escolhido o cation cobre. Trata-se de um trabalho de tentativa visando introduzir métodos microbiológicos como elementos comprobatórios de pesquisa geoquímica. É parte de uma pesquisa geoquímica mais ampla, em curso no Departamento 01 do Instituto de Geociências da Universidade Federal da Bahia, cujos resultados globais serão publicados oportunamente.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Foram escolhidas duas áreas para a execução do trabalho, ambas no Recôncavo baiano, município de Maragogipe:

1. Fazenda Guaí, em cujo solo fôra localizada uma anomalia de cobre, sugerindo existência de um corpo de minério.

2. Fazenda Água Fria, cujos solos tiveram seu teor de cobre previamente determinados, e em valores normais.

Estas áreas estão localizadas numa região de clima Af, segundo a classificação de Koppen, ou seja, clima das selvas quentes e úmidas, sem estação seca, com precipitações pluviométricas superiores a 1000 mm anuais. O relevo é acentuado, altitude de 110 m, compreendendo variações de 50 a 100 m entre os vales dos rios e as cristas mais elevadas, com encostas inclinadas de 15° a 35°.

Encontram-se na área da Fazenda Água Fria, florestas tropicais de vinháticos, massarundubas, sucupiras e pau brasil. A área da Fazenda Guaí já se encontra devastada pela atividade humana.

Os solos são do tipo ferrolítico; a argila predominante é a caolinita, com baixa capacidade de troca e pequena retenção de matéria orgânica. As cristas dos morros estão bastante lixiviados. Em certos trechos da Fazenda Guaí, próximo da área estudada, existe uma crosta ferruginosa.

As amostras para as determinações microbiológicas foram colhidas sobre rochas do precambriano inferior: gnaisses, anfibolitos, migmatitos, granulitos félsicos e máficos, predominando os últimos (embasamento cristalino). O pH dos solos está em torno de 5,0.

* Departamento 01 do Instituto de Geociências da UFBa.
** Departamento de Engenharia Bioquímica da Escola de Química, UFRJ.

TABELA I

Flora microfúngica de solos em relação com teores de cobre

Amostra	µg/ml Cu++	Gênero	N.º espécies	Gênero predominante
1	10	*Penicillium*	14	*Penicillium*
		Trichoderma	2	*Trichoderma*
		Chaetomium	1	
		Pyrecocheta	1	
2	15	*Penicillium*	9	*Penicillium*
		Fuzarium	4	
		Gongromella	4	
		Trichoderma	4	
		Chaetomium	2	
3	20	*Penicillium*	20	*Penicillium*
		Trichoderma	5	
		Gongromella	2	
		Aspergillus	1	
		Chaetomium	1	
		Circinella	1	
		Arachniotus	1	
		Verticillium	1	
4	25	*Penicillium*	4	*Penicillium*
		Aspergillus	3	
		Trichoderma	1	
		Fusarium	1	
5	30	*Penicillium*	15	*Penicillium*
		Fusarium	2	*Arpergillus*
		Aspergillus	2	
		Chaetomium	1	
		Gongromella	1	
6	35	*Penicillium*	1	*Penicillium*
7	40	*Penicillium*	2	*Penicillium*
		Rhizopus	1	
		Hyalopus	1	
		Fuzarium	1	
		Gongromella	1	
		Hymenochaeta	1	
		Curvularia	1	
8	50	*Penicillium*	6	*Penicillium*
		Aspergillus	4	*Aspergillus*
		Pithomyces	1	
		Phoma	1	
		Fomes	1	
		Paecilomyces	1	
9	65	*Penicillium*	6	*Penicillium*
		Hymenochaeta	1	
		Paecilonyces	1	
		Arachniotus	1	
		Aspergillus	1	
		Fusarium	1	

Amostra	µg/ml Cu++	Gênero	N.º espécies	Gênero predominante
10	85	*Penicillium*	11	*Penicillium*
		Trichoderma	2	
11	115	*Penicillium*	7	*Penicillium*
		Aspergillus	3	*Aspergillus*
		Trichoderma	2	
		Fusarium	2	
		Myrothecium	1	
		Paecilomyces	1	
12	165	*Penicillium*	5	*Penicillium*
		Trichoderma	2	*Trichoderma*
		Phialophora	1	
		Hymenochaeta	1	
		Phoma	1	
		Paecilomuces	1	
		Aspergillus	1	
13	175	*Penicillium*	4	*Penicillium*
		Trichoderma	2	*Trichoderma*
		Fusarium	1	
14	190	*Penicillium*	5	*Penicillium*
		Phialophora	1	
		Trichoderma	1	
		Phoma	1	
15	1.250	*Penicillium*	6	*Penicillium*
		Fomes	2	
		Phoma	1	
		Phialophora	1	
		Paecilomyces	1	
		Aspergillus	1	
16	1.750	*Penicillium*	4	*Penicillium*
		Nigrospora	3	*Nigrospora*
		Trichoderma	2	
		Thiclaviopsis	1	
		Aspergillus	1	
		Chlaridium	1	
		Hymenochaeta	1	
		Hyalopus	1	
		Chaetomium	1	
		Fusarium	1	
17	2.500	*Penicillium*	8	*Penicillium*
		Trichoderma	5	*Trichoderma*

O teor de matéria orgânica é inferior ao valor padrão mínimo, pelo que os solos são considerados mineralizados.

Foram coletados, em cada caso, 100,0 g de solo localizados no intervalo de profundidade entre 5 e 15 cm. A coleta do material foi feita nas paredes de escavações razas (30 cm) com espátulas de aço inoxidável flambadas, tendo sido acondicionado em placas de Petri esterilizadas.

Meios de cultura

Foram empregados os seguintes meios de cultura:

1. Gelose-extrato de malte — extrato de malte, 10,0 g; glicose 4,0 g; agar 10,0 g; água desionizada 1000 ml; pH 7.3 (1).
2. Gelose-batata glicose fabricação (B.B.L.) pH 3.5.
3. Gelose peptona glicosada, segundo Sabouraud, fabricação (Merck) pH 5,5-5,7.
4. Gelose Czapeck-Dox, segundo Thom e Paper (10), fabricação (Merck) pH 6,6.

Gelose-peptona glicosada, segundo Sabouraud, mostrou-se o melhor meio de cultura para isolamento de fungos filamentosos, ao curso deste trabalho.

Isolamento

Foi feito em placa de Petri, usando o método das diluições sucessivas e incorporação no meio descrito por Alexander [2]. As amostras foram peneiradas (peneira de 1,16 *mesh*, previamente flambadas) e porções de 1,0 g de cada foram agitados com 100 ml de solução fisiológica, por 15 min; cada sobrenadante era diluído a 10^{-4} e 10^{-5} da suspensão original de 1,0 ml de cada diluição incorporada a 30 ml do meio fundido (48°C), distribuindo-se por agitação durante 1 min, e espelhando em placas de Petri de 15 cm. As placas foram incubadas a 25°C por 7 dias. As colonias foram contadas em contador Quebec. As colônias foram repicadas para tubo de gelose Sabouraud inclinada, incubadas a 25°C/7 dias e conservadas no refrigerador. Os procedimentos gerais obedeceram ao descrito por MARTELLI & ROSEMBERG [1].

Os elementos para o reconhecimento das características macro e microscópicas das espécies e sua identificação foram obtidos de acordo com o descrito nas referências bibliográficas [3, 10].

RESULTADOS

Os resultados estão, até certo ponto, na dependência de poderem ser obtidos sob forma de colônias em placa, os esporos dos fungos disseminados no solo. É possível que muitos escapem à contagem devidos à técnica de isolamento empregada na investigação. O método tende para uma estimativa da densidade de população, inferior à real. Procurou-se compensar, colhendo as amostras na altura em que a população microbiana do solo é mais expressiva, segundo WASSMAN [10].

Foram isoladas 118 amostras de fungos filamentosos dos solos da Fazenda Guaí e 190 dos solos da Fazenda Água Fria. Os resultados da média de 3 determinações estão agrupadas na tabela 1, relativamente ao teor de cobre na amostra de solo.

Como pode ser visto nesta tabela, a flora é variada com predominância absoluta do gênero *Penicillium*, independente do teor do cation cobre no solo. As espécies deste gênero demonstraram, nestas condições, resistência a teores considerados anormalmente elevados do cation cobre. No gráfico 1 estão relacionados os teores do cation cobre no solo e o número total de espécies isoladas por grama de amostra. Como pode ser visto, a maior densidade de população foi encontrada nas amostras contendo 20 μg/ml de Cu^{++}. A partir de 40 μg/ml do cation cobre, a densidade da flora se estabiliza em tôrno de 10 espécies por grama do solo, mesmo naqueles contendo quantidades anomalas do cation cobre, de 1250 a 2500 μg/ml, representadas no gráfico com traço pontilhado.

DISCUSSÃO

É interessante registrar ter sido isolada uma flora micro-fungica ponderável e variada a partir de solos contendo teores de cation cobre entre 10 e 40 μg/ml, apesar da escassez de matéria orgânica no solo.

Lembrando que sais de cobre são usados como fungicidas, é de estranhar que fungos estejam presentes em solos contendo até 2500 μg/ml de cation de cobre. Isto pode ser explicado porque o cation cobre se encontra sob forma de sais insolúveis. Por outro lado, como os fungos no solo se apre-

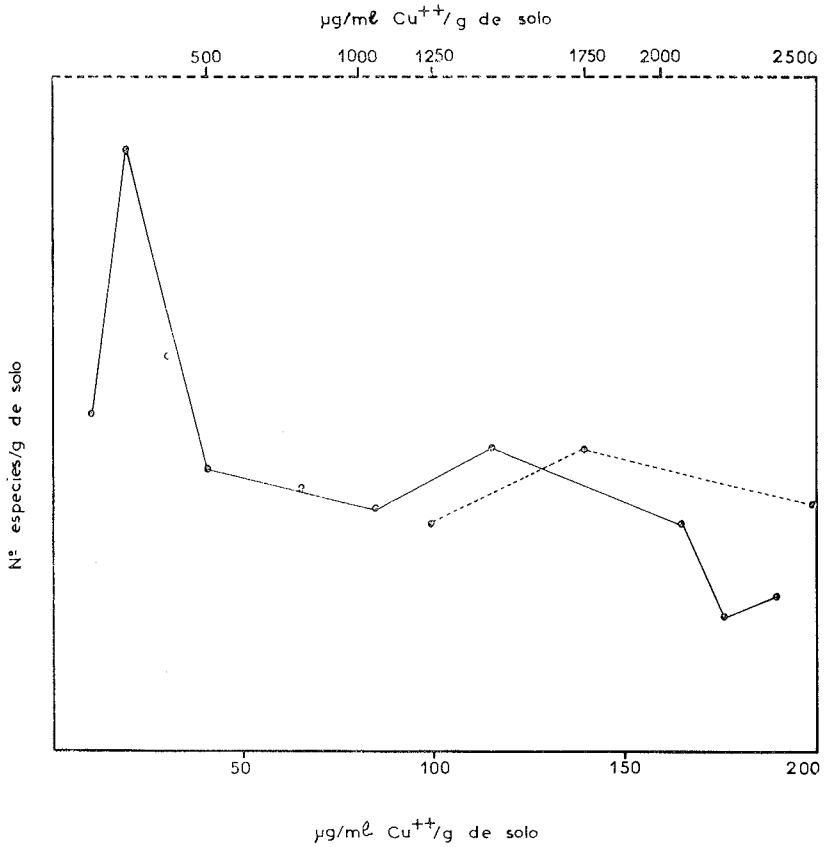


Fig. 1 — Densidade da flora microfúngica relativamente ao teor cation cobre.

●——● — teores de Cu^{++} inferiores a 200 µg/ml.
●....● — teores de Cu^{++} superiores a 1000 µg/ml.

sentam sob forma de esporos, o estado de latência também reduz a influência das condições locais. A predominância do gênero *Penicillium* nas amostras foi uniforme e a natureza do restante da microflora também, o que pode ser explicado porque a baixa capacidade de retenção das argilas e sua tendência à lixiviação contribuiram para disseminar uniformemente os esporos. Os resultados parecem depender mais de uma ação conjunta de fatores geofísicos e geoquímicos, do que isoladamente destes. A definida predominância de gênero *Penicillium* não foi considerada significativa porque este é um gênero normalmente abundante no solo.

Embora negativos, os resultados parecem interessantes porque dão um perfil dos tipos de fungos encontrados nesses solos, o que não fora anteriormente feito. As experiências prosseguem visando extender esta investigação a outros grupos de microrganismos, bem como estudar solos de outras regiões apresentando características similares.

SUMMARY

It was tried to relate the mineralization degree and the copper content of soils with the nature of microfungic flora isolated. It was found a difinit and uniform predominance of species Penicillium. The conditions were not enough to stablish in these soils a typical microfungic flora. However a quantitativ limitation did occur with 40 µg/ml of copper in soil.

AGRADECIMENTOS

Aos microbiologistas do Instituto de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, particularmente ao seu Diretor, Prof. José Luiz Bezerra, pela identificação das culturas.

Aos geólogos Raymundo José Portella Brim e José Luiz Batista Vidal, do Instituto de Geociências da Universidade Federal da Bahia, pela colheita das amostras.

Ao Dr. J. A. Rosemberg pela discussão do manuscrito.

Ao Banco Nacional do Desenvolvimento Econômico e ao Conselho Nacional de Pesquisas, pelo suporte financeiro concedido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MARTELLI, H. L. e ROSEMBERG, J. A. — Microbiologia Industrial (Guia de Trabalho Prático) — I, Edição E. de Química, Rio de Janeiro, 1962.

2. ALEXANDER, M. — Methods of Soil Analysis. Most probable number method for microbial population Part II pp — 1467 — 1972, John Willey and Sons, New York and London, 1964.

3. ALEXOPOULOS, C. U. — Introductory Mycology, John Wiley & Sons, New York, 1962.

4. BARNETT, H. L. — Illustrated Genera of Imperfecti fungi, Burgess Publishing Co., Mineapolis, 1967.

5. BESSEY, E. A. — Morphology and Taxonomy of Fungi, The Blakiston Co., Philadelphia, 1967.

6. GILMAN, C. J. — Manual de los Hongos del Suelo, Companhia Editorial Condimental S/A., B. Aires, 1963.

7. RAPER, K. B. — Manual of the Aspergilli. Hafner Publishing Company, New York and London, 1968.

8. RAPER, K. B. — Manual of the Penicillia. Hafner Publishing Company, New York and London, 1968.

9. THON, C. e RAPER, K. B. — "A Manual of the Aspergilli". W. S. Wilking, Co., Baltimore, 1945.

10. WASSMAN, S. A. — Principles of Soil Microbiology USA, The Williams & Willkins Company, Baltimore, 1965.

Recebido para publicação em 6/6/1972.

Rev. Microbiol.
3(3):153-156, julho-setembro, 1972

O MÉTODO TURBIDIMÉTRICO NA MEDIDA DE CONCENTRAÇÕES E DE VELOCIDADES DE REPRODUÇÃO DE MICRORGANISMOS

Walter BORZANI (*)

Entre os diversos métodos de medida de concentração de microrganismos, o turbidimétrico talvez seja um dos mais freqüentemente utilizados no caso de leveduras e bactérias.

A simplicidade e a relativa rapidez com que se obtém resultados bastante reprodutíveis, seja empregando turbidímetros, seja lançando mão de espectrofotômetros, faz com que essa técnica seja uma das mais escolhidas entre as muitas conhecidas.

Em linhas gerais, indicando-se com X a concentração de microrganismos na suspensão (expressa, quase sempre, pela relação entre a massa de células secas e o volume da suspensão) e com D a absorbância correspondente, tem-se:

$$X = K.D \qquad [1]$$

Sendo T a transmitância da suspensão, expressa em %, a equação [1] pode ser escrita:

$$X = 2K - K.\lg T \qquad [2]$$

O valor da constante de proporcionalidade K pode ser determinado experimentalmente preparando-se suspensões do microrganismo de concentrações conhecidas e medindo-se os correspondentes valores de D ou de T. Conhecendo-se, assim, a equação [1], ou a [2], e medindo-se a absorbância, ou a transmitância, de uma suspensão de concentração desconhecida, esta última pode ser facilmente calculada.

Evidentemente, esse cálculo só conduzirá a um valor verdadeiro se as condições em que se realizaram as medidas não introduzirem variações no valor de K. Caso contrário, o resultado obtido poderá diferir substancialmente do verdadeiro valor da concentração que se procura conhecer.

Entre os fatores que interferem no valor de K interessa-nos destacar, neste artigo, a dimensão média das células em suspensão.

É fato bastante conhecido que as dimensões de um microrganismo podem ser profundamente modificadas variando-se as condições em que é cultivado. Essa alteração nas dimensões das células pode modificar sensivelmente o efeito por elas produzido em um feixe de luz incidente, conduzindo a valores de absorbância, ou de transmitância, que não guardam mais a mesma relação com a concentração celular.

Exemplificando: consideremos duas suspensões, A e B, de um mesmo microrganismo e de mesma concentração celular X. Suponhamos que, como conseqüência de diferentes condições de cultivo, as células de A sejam menores que as de B. Neste caso, a absorbância de A será maior do que a de B, isto é, a medida turbidimétrica indicará, na suspensão A, uma concentração maior do que em B, quando na realidade ambas são iguais entre si.

Analogamente, se no caso anterior as duas suspensões tivessem mesma absorbância, o que pareceria indicar mesma concentração celular, como as células de A são menores que as de B, a concentração desta última será de fato maior do que a da primeira.

Convém, para fixar idéias, citar alguns casos em que tais discrepâncias foram medidas.

Em trabalho publicado há pouco tempo, ZINES & ROGERS [1] verificaram, cultivando *Klebsiella aerogenes* em meios contendo diferentes concentrações de etanol, que suspensões do microrganismo de diferentes concentrações apresentavam mesma absorbância. Quanto maior o teor de etanol, menor a dimensão da célula e, conseqüentemente, me-

* Professor Catedrático de Engenharia Bioquímica da Escola Politécnica da U.S.P.

nor a concentração necessária para preparar uma suspensão com uma dada absorbância. A Tabela 1 reune os resultados obtidos no trabalho supra citado.

Observe-se que o maior dos valores da Tabela 1 é 1,85 vezes superior ao menor deles.

Outro fato a ser apontado foi recentemente observado na Escola de Engenharia Mauá *. *Candida guilliermondii* Y-8 foi cultivada em três meios distintos, com as seguintes composições:

TABELA I

Concentração de *Klebisiella aerogenes* necessárias para preparar suspensões com uma mesma absorbância

Concentração de etanol no meio em que foi cultivada a *Klebsiella* (% em volume)	Concentração celular, em g/l, para conduzir a uma mesma absorbância
0,07	3,05
0,74	2,52
1,00	2,77
1,80	2,62
2,65	2,47
2,85	2,20
3,65	1,80
4,00	2,24
4,80	1,82
5,85	1,65

Valores determinados por Zines e Rogers [1]

a) Meio M.1:

$(NH_4)_2SO_4$	7,0	g/l
KH_2PO_4	3,5	g/l
$MgSO_4$	0,35	g/l
$Na_2HPO_4.7H_2O$	2,8	g/l
Extrato de levedura	0,10	g/l

b) Meio M.2: obtido do meio M.1 por adição de óleo diesel baiano na proporção de 2,1 g de óleo para 1.000 ml de M.1

c) Meio M.3: obtido do meio M.1 por adição de glicose (15 g/l).

* CONCONE, B. R. V.; PAZ, MARIA P. G. & PATRÍCIO CAROLINA, G., informação pessoal.

Curvas de calibração de um espectrofotômetro, determinadas com um comprimento de onda igual a 600 mm, conduziram às seguintes equações (sendo X expressa em g de matéria seca por litro):

a) para as células cultivadas no meio M.1:

$$X = 1{,}983 - 1{,}013 . \lg T \qquad [3]$$

b) para as células cultivadas no meio M.2:

$$X = 2{,}204 - 1{,}101 . \lg T \qquad [4]$$

c) para as células cultivadas no meio M.3:

$$X = 3{,}191 - 1{,}605 . \lg T \qquad [5]$$

Não é difícil calcular o erro cometido se, na medida de concentração de células cultivadas no meio M.1 utilizássemos, por exemplo,a equação [5]. Erros consideráveis poderiam ser alcançados, como indica esquematicamente a Figura 1.

Outro caso, observado na Escola Politécnica da U.S.P. *, merece também ser citado. Em ensaios em andamento com *Saccharomyces cerevisiae*, procedeu-se à calibração de um espectrofotômetro a partir de células cultivadas em mosto de melaço (concentração de açúcares redutores totais: 50 g/l) enriquecido com $NH_4H_2PO_4$ (2,0 g/l) e

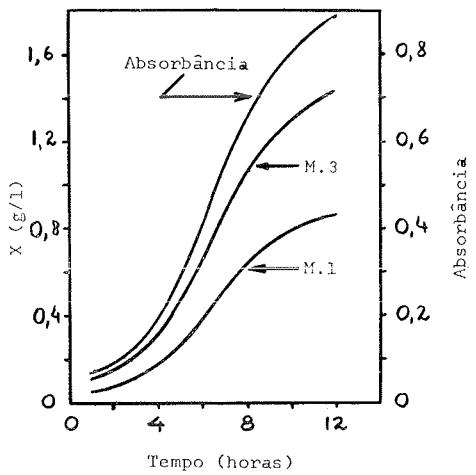


Fig. 1 — Curvas de variação da concentração (X) de *Candida guilliermondii* nos meios M.1 e M.3 calculadas a partir de uma mesma curva de variação de absorbância.

* VAIRO, MARINA, L. R. & GREGORI, ROSANA E., informação pessoal.

$MgSO_4.7H_2O$ (0,25 g/l). Chegando-se à equação (sendo X expressa em g de matéria seca por litro):

$$X = 2{,}503 - 1{,}258.\lg T \qquad [6]$$

A aplicação da equação [6] a suspensões de células cultivadas em mosto de melaço ao qual não se adicionou o sal de amônio, conduziu a valores de X cerca de 66% maiores do que os verdadeiros.

Esses fatos nos mostram que curvas de crescimento de um mesmo microrganismo em meios diferentes, obtidos por simples leituras de absorbância ou de transmitâncias, não podem ser comparadas a não ser que se conheçam as curvas de calibração do aparelho para os microrganismos cultivados nos meios em estudo.

Cumpre, finalmente, chamar a atenção a outro fato importante. Quando o microrganismo é cultivado sempre no mesmo meio, as curvas de calibração obtidas com amostras de células cultivadas em épocas diferentes são bastante coincidentes. Em trabalho recentemente publicado [2], tivemos a oportunidade de verificar esse fato com *Candida guilliermondii* Y-8 cultivada no meio M.2 já citado. Quatro curvas de calibração, determinadas em um período de 12 meses, conduziram a resultados praticamente coincidentes (a máxima diferença relativa observada foi da ordem de 4% para um valor de transmitância igual a 50%).

Em resumo: a comparação de curvas de crescimento de um mesmo microrganismo cultivado em condições diferentes, por simples medidas de absorbâncias ou de transmitâncias, pode conduzir a erros consideráveis, a não ser que se tenha verificado, de antemão, que as condições de cultivo do microrganismo não interferem na curva de calibração do aparelho utilizado nas medidas ópticas.

Deve-se contudo chamar a atenção a um ponto importante. A equação [1] permite escrever:

$$\frac{dX}{dt} = K.\ \frac{dD}{dt} \therefore \frac{1}{X}.\ \frac{dX}{dt} = \frac{1}{D}.\ \frac{dD}{dt}$$

isto é, a velocidade específica de reprodução do microrganismo $\left(\frac{1}{X}.\ \frac{dX}{dt}\right)$ pode ser calculada diretamente a partir da curva que representa o crescimento do microrganismo expresso em unidades de absorbância, mesmo desconhecendo-se o valor da constante K. Evidentemente, afirmativa análoga é válida para o cálculo do tempo de geração.

Concluindo. Curvas de crescimento de microrganismos cultivados em condições diferentes, representadas pela variação da absorbância em função do tempo, podem ser utilizadas para o cálculo de velocidades específicas de reprodução $\left(\frac{1}{X}.\ \frac{dX}{dt}\right)$ ou de tempos de geração. Tais curvas, porém, não nos permitem comparar concentrações celulares (X) ou velocidades de reprodução $\left(\frac{dX}{dt}\right)$ a não ser que se conheçam os respectivos valores de K (ver equação [1]).

SUMMARY

The author points out the influence of the cell size on the spectrophotometric measurement of cell concentrations. The growth curves obtained by means of absorbance measurements can be used to calculate the specific growth rate and the generation time, but can not be used to compare cell concentrations or to measure growth rates unless the calibration curve (cell concentration vs. absorbance) was previously stated.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ZINES, D. O. & ROGERS, P. L. — The effect of ethanol on cotinuous culture stability. *Biotechnol. Bioeng.*, **12**:561, 1970.

2. CONCONE, B. R. V.; HISS, H.; PAZ, MARIA P. G.; PATRÍCIO, CAROLINA & BORZANI, W. — Measurement of yeast concentrations in liquid hydrocarbon fermentations: influence of experimental conditions and statistical significance of the results obtained. *Biotechnol. Bioeng.*, **14**:609, 1972.

Recebido para publicação em 19/10/72.

Rev. Microbiol.
3(3):157-168, julho-setembro, 1972

O CICLO PARASSEXUAL EM FUNGOS

João Lúcio de AZEVEDO [1]

RESUMO

Nos fungos, além do processo sexual que ocorre em muitas espécies, existe ainda uma alternativa do sexo que é denominada de ciclo parassexual e foi descoberta em *Aspergillus nidulans*. O ciclo parassexual se caracteriza basicamente pela formação de diplóides seguindo-se permutas mitóticas ou haploidização o que dá origem então aos recombinantes mitóticos. Na presente revisão é dada ênfase ao mecanismo do processo parassexual, sua ocorrência e sua importância para estudos genéticos e para o melhoramento de fungos de valor econômico.

INTRODUÇÃO

Para que qualquer organismo seja efetivamente estudado do ponto de vista genético, há necessidade de que ele apresente mutantes que sejam diferentes do tipo selvagem original em uma ou mais características e em segundo lugar, que ele apresente um sistema de recombinação. Até praticamente há um quarto de século, o ciclo sexual era a única maneira conhecida pela qual podia ocorrer recombinação genética. No entanto, foi verificado que outros mecanismos não ortodoxos de recombinação também podem ocorrer em microrganismos. Os processos de transformação AVERY & col. [2] e transdução ZINDER & LEDERBERG [75], que à semelhança do processo de conjugação LEDERBERG & TATUM [40] produzem recombinação em bactérias, são exemplos típicos de alternativas do sexo. Também em função, além do processo sexual que ocorre em muitas espécies, existe um processo de alternativa do sexo descrito pela primeira vez em 1952 por PONTECORVO & ROPER [54] no fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*. A estes processos que se diferenciam em um ou mais pontos do processo sexual típico, PONTECORVO [51] deu o nome de processos parassexuais. Na presente revisão só será considerado um desses processos, qual seja o ciclo parassexual em fungos. Revisões sobre o mesmo assunto já foram publicadas anteriormente e servem para complementar certos tópicos que não serão abordados nesta revisão [6, 11, 22, 26, 56, 71].

A DESCOBERTA DO CICLO PARASSEXUAL EM FUNGOS

Devido a uma série de razões PONTECORVO & col.[56], o fungo *A. nidulans* se constitui em um organismo muito apropriado para estudos genéticos. Seus espóros uninucleados haplóides, os conídios, germinam em um meio favorável produzindo uma hifa septada multinucleada de onde emergem os conidióforos que terminam por uma vesícula globosa também multinucleada. Da superfície desta vesícula saem os esterígmas primários que são uninucleados e, destes, os esterígmas secundários também uninucleados. O núcleo dos esterígmas secundários se divide repetidamente e após cada divisão, um núcleo filho permanece no esterígma e o outro após constrição do esterígma, vai ser incluído no conídio. Uma vez que o processo se repete muitas vezes, a partir de um único esterígma secundário obtém-se uma cadeia de conídios. (Fig. 1).

Uma característica importante neste fungo é a anastomose de hifas. Quando conídios de uma mesma ou de diferentes linhagens são colocados a germinar próximos uns aos outros, as hifas resultantes podem se fundir e há passagem de núcleos resultando assim no caso de linhagens diferentes, os heterocários, que possuem núcleos de distintas cons-

(1) Professor de Disciplina, Departamento de Genética. E.S.A. "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

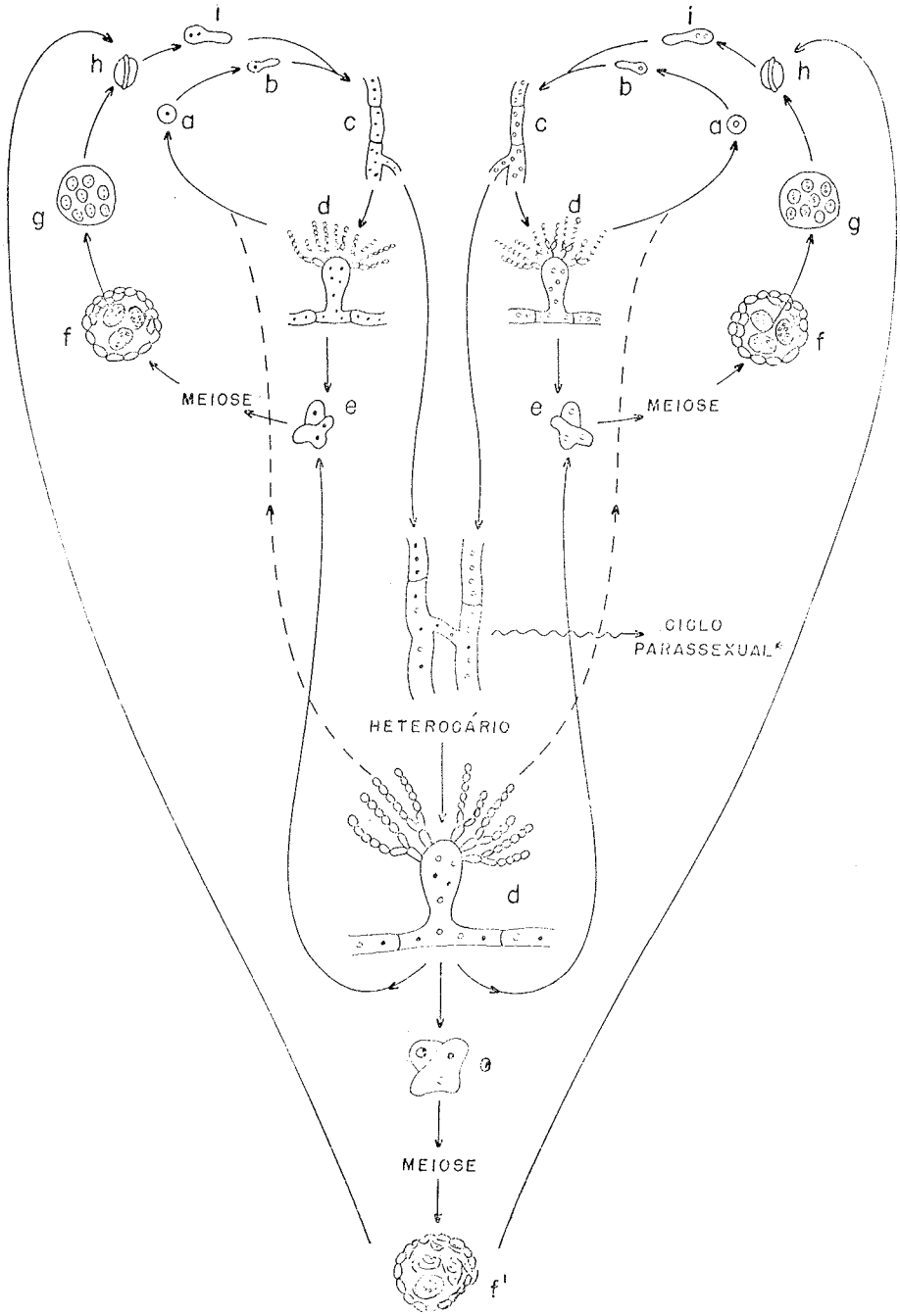


Fig. 1 — Ciclo sexual do *Aspergillus nidulans*. a) conídio; b) conídio germinando; c) hifa; d) conidióforos produzindo conídios; e) fusão de núcleos; f) cleistotécio com ascos; f') cleistotécio híbrido com ascosporos recombinantes; g) ascos com oito ascosporos; h) ascosporo; i) ascospor binucleado germinando.
* — ver Fig. 2 para os detalhes do ciclo parassexual.

tituições genéticas em um citoplasma comum. Quando este heterocário produz conídios, as duas linhagens que derem a origem ao heterocário se separam novamente pois como já salientado, os conídios são uninucleados.

O ciclo sexual do *A. nidulans* consiste basicamente na fusão de dois núcleos haplóides, em estruturas especializadas, resultando daí núcleos diplóides. Cada núcleo diplóide sofre imediatamente meiose produzindo quatro células que se dividem mitoticamente, resultando oito células haplóides denominadas de ascosporos que se constituem nos esporos sexuais do fungo. Os ascosporos ficam contidos no interior de ascos e estes ficam contidos, por sua vez, nos corpos de frutificação, os cleistotécios (Fig. 1).

A descoberta do ciclo parassexual em *A. nidulans* só foi possível graças a existência de mutantes para coloração de conídios e de mutantes deficientes nutricionais em linhagens deste fungo. O passo decisivo para esta descoberta foi o experimento conduzido por ROPER [59] que culminou com a obtenção de linhagens diplóides. Uma linhagem haplóide *ad. w* (requer adenina e tem conídios brancos), e outra linhagem haplóide *paba. y. bi* (requer ácido *p*-aminobenzóico, biotina e tem conídios amarelos) foram postas a germinar de tal modo que ocorressem anastomoses de hifas e conseqüentemente formação do heterocário. Este heterocário produziu conídios que foram semeados em meio de composição definida, ou mínimo, isto é, desprovido de adenina, biotina e ácido *p*-aminobenzóico. Nestas condições os conídios de constituição genética igual a dos conídios que deram origem ao heterocário não podiam germinar e formar colônias. No entanto, quando um grande número de conídios provenientes deste heterocário (cerca de 10^6-10^8 conídios) foi semeado em meio mínimo, algumas colônias puderam se desenvolver. Estas, eram colônias verdes (a cor da linhagem selvagem deste fungo) e não requeriam adenina, biotina e ácido *p*-aminobenzóico. Estas colônias deviam ser diplóides originando-se pela fusão de núcleos haplóides de constituição genética diferente no heterocário e, que sofreram posteriores divisões mitóticas sendo eventualmente incluídos nos conídios (Fig. 2). Várias evidências comprovaram a natureza diplóide destas colônias tais como o fenótipo esperado para um heterozigoto diplóide (prototrófico e de coloração verde), seus conídios que tinham o dobro do volume de conídios de linhagens haplóides, o conteúdo de DNA que também era o dobro do encontrado em linhagens haplóides HEAGY & ROPER [31], os ascos produzidos por estas linhagens que apresentavam 16 ascósporos e finalmente, a presença de setores nestas colônias que possuiam constituição genética diferente do resto da colônia e que eram portanto recombinantes, indicando ser a colônia heterozigoto.

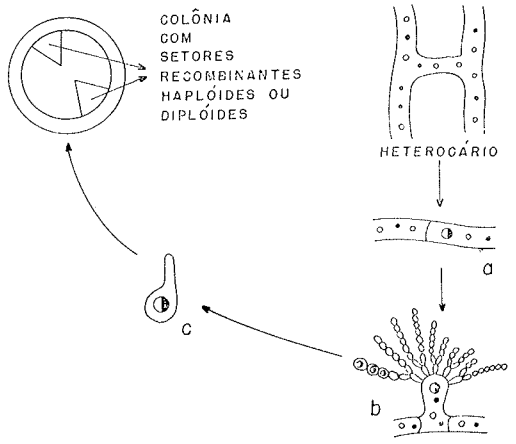


Fig. 2 — Ciclo parassexual em *Aspergillus nidulans*. a) fusão de núcleos no heterocário; b) conidióforos com conídios diplóides; c) conídios diplóides germinando.

Uma vez obtidos diplóides de *A. nidulans*, a descoberta do ciclo parassexual foi apenas questão de analisar e postular os processos que davam origem aos recombinantes mitó-

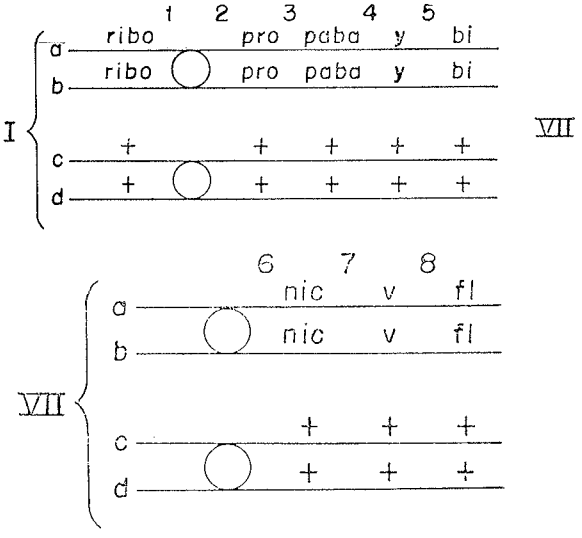


Fig. 3 — Constituição genética de um diplóide heterozigoto para os marcadores *ribo, pro, paba, y* e *bi* no grupo de ligação I e *nic, y* e *fl* no grupo de ligação VII, apresentado no estágio de quatro fios (*a, b, c, d*). Os números se referem aos locais onde pode ocorrer permuta mitótica. O sinal + representa o alelo selvagem dominante e os círculos representam o centrômero.

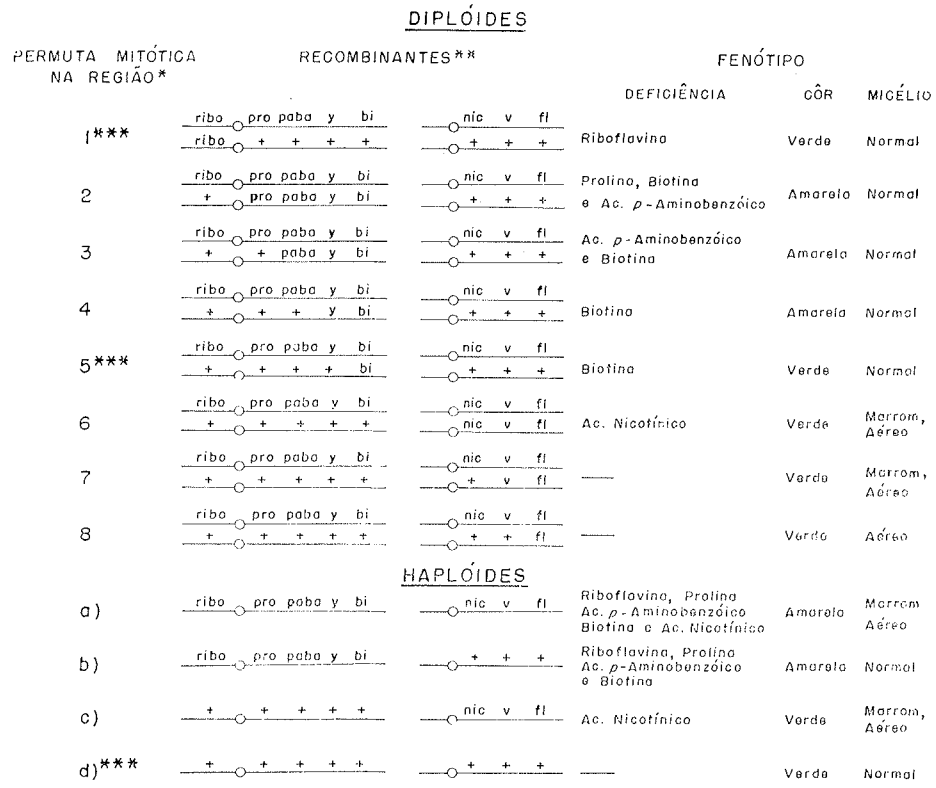


Fig. 4 — Recombinantes diplóides e haplóides que podem se originar do diplóide heterozigoto representado na Fig. 3.

* — considerando-se permutas apenas entre os fios *b* e *c* (ver Fig. 3).

** — apenas representado o genótipo de um dos recombinantes. O recombinante não representado é o recíproco.

*** — não selecionados visualmente pois têm coloração verde e micélio normal.

ticos. Um exemplo ilustrará melhor o processo de recombinação em linhagens diplóides e, que em síntese, se constitui no ciclo parassexual. Um diplóide cuja constituição genética está apresentada na Figura 3 tem conídios verdes e pode crescer em meio mínimo mas é heterozigoto para os marcadores *ribo* (requerimento para riboflavina), *pro* (requerimento para prolina), *paba* (requerimento para ácido *p*-aminobenzóico), *bi* (requerimento para biotina) e *y* (conídios amarelos) todos localizados no grupo de ligação I e para os marcadores *nic* (requerimento para ácido nicotínico), *v* (micélio marrom) e *fl* (micélio aéreo), no grupo de ligação VII. No estágio de quatro fios pode ocorrer permuta mutótica em qualquer das regiões numeradas de 1 a 8 (Fig. 3) produzindo os recombinantes diplóides indicados na Figura 4. Através da haploidização, podem ocorrer também quatro diferentes tipos de setores haplóides no diplóide apresentado (Fig. 4). Tanto os setores recombinantes diplóides como os tipos haplóides ocorrem efetivamente em um diplóide como o usado no exemplo acima. Obtém-se desta maneira recombinação gênica sem ocorrência de um ciclo sexual, ou seja, o processo é essencialmente uma alternativa do sexo.

O MECANISMO DO PROCESSO PARASSEXUAL EM FUNGOS

O ponto inicial do processo parassexual é a heterocariose. Embora a heterocariose possa ocorrer através de mutação ISHITANI & SAKAGUCHI [37], TINLINE [69] em um clone, o que determina a existência de núcleos de composição genética diversa em um citoplasma comum, ela pode também ocorrer em virtude de anastomoses entre células vegetativas de linhagens geneticamente diferentes.

O fenômeno da heterocariose por anastomose de hifas se encontra muito bem descrito em várias revisões [17, 19, 71].

O próximo passo no processo, isto é, a fusão de núcleos dando diplóides heterozigotos é, em geral, verificado somente pela análise genética uma vez que estudos citológicos em fungos são difíceis de serem realizados. A proporção de esporos diplóides em relação ao número total de esporos vegetativos haplóides pode dar uma idéia da freqüência com que ocorre fusão nuclear em um micélio heterocariótico. Em *A. nidulans*, a proporção de esporos diplóides varia com as linhagens envolvidas mas os valores situam-se ao redor de um único conídio diplóide por cerca de 10^6 a 10^7 conídios haplóides. Estas freqüências assemelham-se àquelas encontradas em *A. niger* [55, 56] mas, em certos basidiomicetos o número de fusões nucleares medido pelo número de esporos diplóides formado é bem mais elevado. Este fato, levou TINLINE & McNEILL [71] a suporem que a freqüência de diplóides formados pode estar relacionada com a relação nuclear dentro do heterocário pois sendo os basidiomicetos geralmente dicarióticos, a oportunidade para formação de diplóides é aumentada em relação a outros tipos de heterocários. Alguns agentes como a cânfora [55, 56] e a luz ultra-violeta [21, 35] tem a propriedade de aumentar a freqüência dos diplóides formados. Quanto ao tamanho, conídios diplóides são em muitos casos maiores que os haplóides mas isto não é regra geral. Como já visto, o conídio diplóide de *A. nidulans* tem o dobro do volume do respectivo conídio haplóide, mas em *A. oryzae*, *A. sojae*, *Ustilago maydis* e *Cochliobolus sativus* estas diferenças não ocorrem [33, 36, 70].

O passo seguinte no processo parassexual é a produção de recombinantes. O mecanismo de recombinação envolve permuta genética e haploidização. A mecânica do processo foi estudada com detalhes em *A. nidulans* [53]. O processo de formação dos recombinantes é análogo ao que já havia sido descrito em 1936 por STERN [66] em *Drosophila melanogaster*, ou seja, envolve permuta mitótica. Então, recombinação ocorre por permutas mitóticas recíprocas no estágio de quatro fios e sempre entre dois dos quatro fios existentes. Desta maneira, os núcleos filhos serão, ou homozigotos para os marcadores distais com relação ao ponto de permuta, ou continuarão heterozigotos como a linhagem diplóide original. Além da permuta mitótica, ocorre também haploidização. Esta haploidização resulta de uma série de não disjunções. Assim, um diplóide com 2n cromossomos pode, por não disjunção, produzir núcleos com $2n-1$ e $2n+1$ cromossomos. O núcleo contendo um cromossomo a menos é instável e pode, através de novas não disjunções ir perdendo outros cromossomos até atingir o estado de $2n-8 = 8$ cromossomos que é o estado haplóide estável no caso do *A. nidulans*. Este mecanismo envolvendo não disjunções, e conseqüente haploidização, foi bem estudado por KAFER [39] que semeou conídios diplóides de *A. nidulans* de modo a obter poucas colônias por placa. Foi assim possível estimar o número de não disjunções que ocorre em diplóides; este valor é de cerca de 1%. Certos agentes químicos como a *p*-fluorofenilalanina [42, 47] selecionam setores haplóides a partir de colônias diplóides e são assim extremamente úteis em uma análise genética. Por exemplo, DAY & JONES [21] usando *p*-fluorofenilalanina mapearam 42 mutantes de *Ustilago violacea* por haploidização de linhagens diplóides.

Fica difícil uma determinação exata dos valores com que ocorre a permuta mitótica e a haploidização. Em uma linhagem heterozigota para o gene recessivo que determina conídios brancos (W/w) em *A. nidulans*, o número de permutas ocorrendo entre este gene e o centrômero foi de uma em cada 300 divisões mitóticas [53]. Esta freqüência pode, no entanto, ser alterada para mais ou para menos com certos agentes físicos como a luz ultra-violeta e agentes químicos. SHANFIELD & KAFER [64] apresentam uma lista de referências relativas a ação de agentes químicos e físicos alterando a freqüência de permuta mitótica em fungos. Aliás, estes mesmos autores evidenciaram os efeitos da nitrosoguanidina e da fluorodeoxiuridina em induzir permutas mitóticas em diplóides de *A. nidulans*.

COMPARAÇÃO ENTRE OS CICLOS SEXUAL E PARASSEXUAL

De uma maneira geral podemos comparar o ciclo sexual e o parassexual em fungos que possuem os dois tipos de ciclos como é o caso do *A. nidulans*. A Tabela I apresenta um resumo das semelhanças e diferenças entre os dois ciclos.

TABELA I

Comparação entre os ciclos sexual e parassexual em *Aspergillus nidulans*

CICLO SEXUAL	CICLO PARASEXUAL
1 — fusão nuclear em estruturas especializadas resultando zigotos híbridos ou não (autofecundados).	1 — fusão nuclear rara em células vegetativas dando diplóides.
2 — O zigoto persiste por apenas uma geração nuclear.	2 — O diplóide pode persistir por muitas divisões mitóticas.
3 — Recombinação na meiose com permutas no estágio de 4 fios ocorrendo em todos os cromossomos e posterior volta ao estado haplóide.	3 — Recombinação mitótica rara também no estágio de quatro fios e há geralmente uma só permuta por célula. A haploidização também ocorre devido a não disjunção através de aneuploidia.
4 — Os produtos meióticos (ascosporos) são facilmente reconhecidos e isolados.	4 — Os recombinantes ocorrem em células vegetativas e são isoladas quando se usam marcadores genéticos apropriados.

A OCORRÊNCIA DO CICLO PARASSEXUAL EM FUNGOS

Uma vez descoberto em *A. nidulans* procurou-se verificar se o fenômeno era de ocorrência geral, isto é, se outros fungos também apresentavam os ciclos parassexual. Exceto em alguns casos como em *Neurospora crassa* onde o ciclo ainda não foi constatado ou é mesmo inexistente, em muitos outros casos já foi evidenciada sua ocorrência não só em fungos que já apresentavam ciclo sexual como também em fungos imperfeitos. A Tabela II apresenta uma lista de espécies de fungos onde o ciclo parassexual já foi constatado.

TABELA II

Fungos onde já foi descrito o ciclo parassexual

Espécie	Referência
Ascochyta imperfecta	63
Aspergillus amstelodami	41
Aspergillus fumigatus	67
Aspergillus nidulans	54
Aspergillus niger	55
Aspergillus oryzae	36
Aspergillus rugulosus	18
Aspergillus sojae	36
Cephalosporium mycophylum	72
Cochliobolus sativus	70
Coprinus fimetarius	27
Coprinus lagopus	15
Fusarium oxysporum f.s. callistephi	32
Fusarium oxysporum f.s. cubense	14
Fusarium oxysporum f.s. pisi	13
Fusarium redolens	65
Penicillium chrysogenum	57
Penicillium digitatum	68
Penicillium expansum	28
Penicillium italicum	68
Phycomyces blakesleeanus	50
Puccinia graminis tritici	24
Pyricularia oryzae	74
Saccharomyces cerevisiae	38
Schizophyllum commune	25
Ustilago hordei	23
Ustilago maydis	33
Ustilago violacea	21
Verticillium albo-atrum	30
Verticillium dahliae var. longisporum	34

IMPORTÂNCIA DO CICLO PARASSEXUAL

De todas as alternativas do sexo conhecidas em microrganismos, apenas o ciclo parassexual em fungos se caracteriza por apresentar uma fase diplóide bastante estável. Além disso, em certas espécies de fungos os dois ciclos, sexual e parassexual coexistem e esta duplicidade de mecanismos de recombinação conduz a importantes conclusões com respeito a problemas de evolução do próprio sistema genético. A simples heterocariose apresenta deficiências no que se refere a propagação e exploração da variabilidade hereditária em potencial pois em espécies com conídios uninucleados os heterocários só podem se restabelecer através de mutação ou anastomose de hifas com cultura vizinha de genótipo diverso. Outra deficiência dos heterocários é de que eles não podem fornecer novos genótipos por recombinação entre núcleos. O ciclo parassexual oferece uma ma-

neira de formação de recombinantes e isto deve ser de grande importância para os fungos imperfeitos e também de valor para fungos que já apresentam um ciclo sexual. Para a Genética, o ciclo parassexual em fungos se constitui em um poderoso sistema de análise genética permitindo o mapeamento de genes nos diferentes grupos de ligação, o mapeamento de centrômeros, uma análise mais detalhada da permuta mitótica e do processo de haploidização e, principalmente, abre a possibilidade de um estudo genético em fungos imperfeitos, estudo este que só pôde ser feito depois da descoberta do ciclo parassexual. O uso de diplóides permite ainda um estudo da dominância e recessividade de genes em um mesmo núcleo (diplóides) ou em núcleos diferentes mas em um citoplasma comum (heterocários). PONTECORVO [52] salienta muito bem as diferentes vantagens deste tipo de comparação formulando inclusive uma teoria de regulação gênica "em cascata" para explicar certos casos de genes que se complementam em heterocários mas não em diplóides ou vice-versa. Genes que se comportam desta maneira já foram observados por diversos autores. ROBERTS [58], por exemplo, verificou que mutantes que são incapazes de utilizarem sorbitol como fonte de carbônio em *A. nidulans* se complementam em diplóides mas não em heterocários, o mesmo tendo sido descrito por APIRION [1] com mutantes incapazes de utilizar o acetato de amôneo como fonte de carbônio. Em *Coprinus lagopus*, CASSELTON & LEWIS [16] também compararam complementação em diplóides e em dicários e em *Ustilago maydis* [33] e *U. violacea* [20] as diferenças entre dicários e diplóides foram bastante pronunciadas pois dicários eram parasitas obrigatórios enquanto que diplóides podiam ser cultivados na ausência do hospedeiro. AYLING [3] em *A. nidulans* estudou complementação com genes supressores da deficiência para metionina e concluiu que houve semidominância dos supressores em heterocários e recessividade em diplóides. As relações de conídios de uma e outra linhagem no heterocário sugeriram que a semidominância dos supressores pudesse ser devida a relação nuclear; esta, pode variar no heterocário mas, evidentemente, é constante nos diplóides. MIRANDA FILHO [46] estudou detalhadamente, através do ciclo parassexual e sexual, supressores do mutante que causa deficiência para ácido nicotínico (*nic 8*) em *A. nidulans*. Verificou que alguns supressores desta deficiência se comportam como dominantes no heterocário e como recessivos nos diplóides. O autor estabeleceu então uma hipótese baseada no sistema de regulação em cascata [52] para explicar o fenômeno.

Um dos pontos mais complexos e discutidos da Genética vem a ser o estudo dos processos de instabilidade genética nos seres vivos. Os trabalhos de McCLINTOCK [44, 45] em milho, de GREEN [29] em *Drosophila*, de BURNS & GERSTEL [12] em *Nicotina* e muitos outros, mostraram que o processo embora de difícil estudo, deve ser geral nos seres vivos. Em fungos também ocorre instabilidade mitótica e graças ao ciclo parassexual o fenômeno pode ser melhor estudado. Assim, BAINBRIDGE & ROPER [9] constataram que certos processos de instabilidade em *A. nidulans* são desencadeados pela presença de um segmento cromossômico em duplicata. NGA & ROPER [48] propuzeram então que a instabilidade em linhagens com segmentos cromossômicos em duplicata possa ser devido a permutas mitóticas desiguais produzindo deleções em tandem o que daria respectivamente, setores mais vigorosos (perda de segmento duplicado) ou mais deteriorados (duplicações em tandem) nas colônias do fungo. AZEVEDO & ROPER [8] e AZEVEDO [5] estudaram o processo de instabilidade mitótica através da análise de setores deteriorados que são relativamente frequentes em linhagens que apresentam duplicações cromossômicas e puderam concluir que o segmento cromossômico em duplicata produz setores deteriorados muito instáveis (duplicações em tandem) e que transposições desta duplicação em tandem para outras regiões do genoma podem ocorrer, resultando variantes mais estáveis embora ainda de morfologia deteriorada (Fig. 5). O processo se assemelha bastante ao descrito em outros organismos e a transposição de material genético de um cromossomo para outro lembra casos de integração de epissomos em bactérias. No caso dos fungos, o ciclo parassexual é que torna mais acessível um estudo deste processo de instabilidade mitótica.

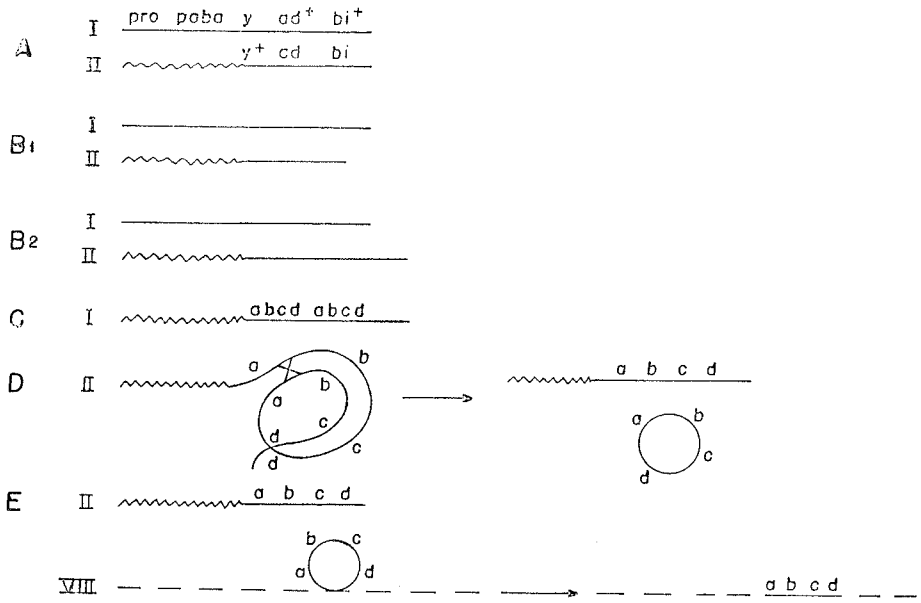


Fig. 5 — Instabilidade mitótica em fungos. A) Linhagem com duplicação cromossômica translocada para o grupo de ligação II (só os grupos de ligação I eII representados. B_1) deleção parcial no segmento em duplicata dando setor melhorado e o recíproco B_2 dando setor deteriorado com duplicação em tandem representada em C. D) Permuta dando perda de duplicação em tandem e alça. E) Incorporação, por transposição, da alça cromossômica, no grupo de ligação VIII.

Além dos problemas citados acima e que podem ser abordados graças a existência do ciclo parassexual em fungos, problemas aplicados não podem ser deixados de lado na presente revisão. A maioria dos fungos de valor industrial são desprovidos de ciclo sexual. O melhoramento genético destas espécies pode ser feito por mutação, mas, é a existência do ciclo parassexual que permite a combinação de caracteres favoráveis encontrados em diferentes linhagens, em uma linhagem comum. Neste particular o processo é de grande valia no melhoramento de fungos produtores de antibióticos. SERMONTI [60], por exemplo, demonstrou que uma linhagem diplóide de *Penicillium* sintetizada a partir de duas linhagens haplóides não produtoras de penicilina, produziu este antibiótico em quantidades comparáveis à linhagem selvagem. Revisões a respeito do uso do ciclo parassexual no melhoramento de espécies de fungos produtoras de antibióticos dão uma idéia do valor do método empregado [61, 62]. No entanto, deve ser salientado que a fase diplóide em fungos, embora relativamente estável, é uma fase transitória. Desta maneira, processos que possam manter o diplóide estável seriam de valia pois na indústria, linhagens diplóides estáveis poderiam ser empregadas para evitar o aparecimento de genes recessivos indesejáveis presentes em linhagens haplóides. Além disso certas combinações de genes em diplóides poderiam levar a heterose ou vigor de híbrido. De fato, IKEDA & col.[35] verificaram a superioridade de linhagens diplóides, triplóides e tetraplóides de *A. oryzae* quando comparadas com linhagens haplóides, na produção de protease. Da mesma maneira, ODA & IGUCHI [49] cruzaram uma linhagem mutante de *A. sojae* que apresentava capacidade de produzir altos teores de amilase e protease mas que tinha má esporulação, com a linhagem original, de crescimento estável e abundante esporulação mas que produzia pouca amilase e protease. A linhagem diplóide obtida reuniu as características favoráveis das duas linhagens haplóides usadas. Por outro lado, uma estabilização, ao menos parcial da fase diplóide pode ser obtida através de genes que selecionem contrariamente os segregantes haplóides formados como feito em *Penicillium* [43] ou então através de recessivos letais balanceados como feito em *A. nidulans* [4, 7]. Recentemente, BALL [10] discutiu a seleção de linhagens estáveis a partir de linhagens instável de *P. chrysogenum* além de se referir a outros pontos relevantes referentes ao emprego do ciclo parassexual no problema do aumento da produção de penicilina.

Também cruzamentos interespecíficos [73] podem, graças ao uso dos mesmos e do ciclo parassexual abrir novos campos para o melhoramento de fungos de valor industrial de modo semelhante ao que ocorreu no melhoramento de plantas superiores.

Finalmente, em Fitopatologia o ciclo parassexual pode também explicar diversos fenômenos, como o aparecimento de novas raças fisiológicas. Muitas espécies fitopatogênicas não apresentam um ciclo sexual e deste modo ,o ciclo parassexual é uma importante fonte de variação nestas espécies. Foi através do ciclo parassexual que BUXTON [13, 14] demonstrou o controle da patogenicidade em *Fusarium oxysporum* f.s.pisi. Diplóides heterozigotos obtidos de heterocários entre a raça 1 virulenta para ervilhas Onward e raça 2 virulenta para Onward e Alaska, produziram recombinantes que eram virulentos não só para os cultivares Onward e Alaska como também para um terceiro cultivar, o Delviche Commando cujas raças paternais 1 e 2 não podiam atacar. Uma extensa revisão da importância do ciclo parassexual em fungos fitopatogênicos pode ser encontrada em TINLINE & McNEILL [71].

Concluindo, o ciclo parassexual oferece, em espécies que já possuem o ciclo sexual, um método alternativo de estudo para inúmeros problemas genéticos tais como os de complementação e instabilidade já mencionados acima nesta revisão. Por outro lado, em fungos imperfeitos o ciclo parassexual é a única possibilidade para condução de uma análise genética nestas espécies. Especialmente em fungos de importância econômica, o ciclo parassexual abriu novas perspectivas para o melhoramento genético dos mesmos.

SUMMARY

The parassexual cycle in fungi

One type of recombination, alternative to the sexual process, do occur in fungi and it is called parassexual cycle. This cycle was discovered in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. Basically it consists in the formation of diploids which through mitotic crossing-over and haploidization produce mitotic recombinant. In the present revision emphasis is given to the steps of the parassexual cycle, its occurrence and the importance of this cycle for genetic studies and to the breeding of industrial fungi.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APIRION, D. — Recessive mutants at unlinked loci which complement in diploids out not in heterokaryons of *Aspergillus nidulans*. *Genetic*, **53**:935-941, 1966.

2. AVERY, O. C.; MAC LEOD, & MacCARTY, M. — Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J. exp. Med.*, **79**:137-158, 1944.

3. AYLING, P. D. — Methionine supressors in *Aspergillus nidulans*: Their genetics and behaviour in heterokaryons and diploids. *Genet. Res. Camb.*, **14**:275-289, 1969.

4. AZEVEDO, J. L. — Estudos sobre recessivos letais em *Aspergillus nidulans* (*Eidan*) *Winter*. [Tese de Livre-Docência, Univ. de São Paulo], 1966.

5. AZEVEDO, J. L. — Mitotic non-conformity in *Aspergillus nidulans*. PhD. Thesis Univ. Sheffield, Great-Britain. 240, 1971.

6. AZEVEDO, J. L. & NEDER, R. N. — *Alguns aspectos da genética de fungos filamentosos. In "Genética e Melhoramento"*. W. E. KERR, Organizador. Ed. Melhoramentos, São Paulo, 245-261, 1969.

7. AZEVEDO, J. L. & ROPER, J. A. — Recessive lethals and balanced lethal systems in *Aspergillus nidulans*. *J. gen. Microbiol.*, **49**: 149-155, 1967.

8. AZEVEDO, J. L. & ROPER, J. A. — Mitotic non-conformity in *Aspergillus*: *succesive* and transposable genetic changes. *Genet. Res. Camb.*, **16**:79-93, 1970.

9. BAINBRIDGE, B. W. & ROPER, J. A. — Observations on the effects of a chromosome duplication in *Aspergillus nidulans*. *J. gen. Microbiol.*, **42**:417-424, 1966.

10. BALL, C. — Haploidization analysis in *Penicillium chrysogenum*. *J. gen. Microbiol.*, **66**:63-69, 1971.

11. BRADLEY, S. G. — Parassexual phenomens in microorganisms. *Ann. Rev. Microbiol.*, **16**: 35-52, 1962.

12. BURNS, J. A. & GERSTEL, D. U. — Flower color variegation and instability of a block of heterochromatin in *Nicotiana*. *Genetics*, **57**:155-167, 1967.

13. BUXTON, E. W. — Heterokaryosis and parasexual recombination in pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *J. gen. Microbiol.*, **15**:133-139, 1956.

14. BUXTON, E. W. — Parasexual recombination in the banana-wilt *Fusarium*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, **45**:274-279, 1962.

15. CASSELTON, L. A. — The production and behavior of diploid strains of *Coprinus lagopus*. *Genet. Res. Camb.* **6**:190-208, 1965.

16. CASSELTON, L. A. & LEWIS, D. — Compatibility and stability of diploids in *Coprinus lagopus*. *Genet. Res. Camb.*, **8**:61-72, 1966.

17. CATEN, C. E. & JINKS, J. L. — Heterokaryosis: Its significance in wild homothallic ascomycetes and fungi imperfecti. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, **49**:81-93, 1966.

18. COY, D. O. & TUVESON, R. W. — Genetic control of conidiation in *Aspergillus rugulosus*. *Amer. J. Bot.*, **51**:290-293, 1964.

19. DAVIS, R. H. — *Mechanisms of inheritance. 2 — Heterokaryosis. In "The fungi*, II". AINSWORTH, G. C. & SUSSMAN, A. S. Organizadores, Academic Press, New York: 805, 1966.

20. DAY, A. W. & JONES, J. K. — The production and characteristics of diploids in *Ustilago violacea*. *Genet. Res. Camb.* **11**:63-81, 1968.

21. DAY, A. W. & JONES, J. K. — Sexual and parasexual analysis in *Ustilago violacea*. *Genet. Res. Camb.*, **14**:195-221, 1969.

22. DAY, P. R. — Variation in Phytopathogenic fungi. *Ann. Rev. Microbiol.*, **14**:1-16, 1960.

23. DINOOR, A. & PERSON, C. — Genetic complementation in *Ustilago hordei*. *Can. J. Bot.*, **47**:9-14, 1969.

24. ELLINGBOE, A. H. — Somatic recombination in *Puccinia graminis var. tritici*. *Phytopathology*, **51**:13-15, 1961.

25. ELLINGBOE, A. H. & RAPER, J. R. — Somatic recombination in *Schizophyllum commune*. *Genetics*, **47**:85-98, 1962.

26. FINCHAM, J. R. S. & DAY, P. R. — *Fungal Genetics*. Blackwell Sci. Publ., Oxford: 404, 1971.

27. GANS, M. & PRUD'HOMME, N. — Echanges nucléaires chez le basidiomycète *Coprinus fimetarius*. *C. R. Acad. Sci.*, **247**:1895-1897, 1958.

28. GARBER, E. D. & BERAHA, L. — Genetics of phytopathogenic fung. XVI. The parasexual cycle in *Penicillium expansum*. *Genetics*, **52**:487-492, 1965.

29. GREEN, M. M. — Controlling elements mediated transpositions of the white gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **61**: 429-441, 1969.

30. HASTIE, A. C. — The parasexual cycle in *Verticillium albo-atrum*. *Genetic. Res. Camb.*, **5**:305-315, 1964.

31. HEAGY, F. C. & ROPER, J. A. — Deoxyribosenucleic acid content of haploid and diploid *Aspergillus* conidia. *Nature, Lond.*, **170**:713, 1952.

32. HOFFMAN, G. M. — Unterauchungen über die Heterokaryosebild und den Parasexualcyclus bei *Fusarium oxysporum*. III. Paarungsversuche mit auxotrophen Mutanten von *Fusarium oxysporum f.callistephi*. *Arch. Mikrobiol.*, **56**:40-59, 1967.

33. HOLLIDAY, R. — Induced mitotic crossing-over in *Ustilago maydis*. *Genet. Res. Camb.*. **2**:231-249, 1961.

34. INGRAM, R. — *Verticillium dahliae var. longisporum*, a stabile diploid. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, **51**:539-541, 1968.

35. IKEDA, Y.; NAKAMURA, K.; UCHIDA, K. & ISHITANI, C. — Two attempts upon improving an industrial strain of *Aspergillus oryzae* through somatic recombination and polyploidization. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **3**:93-101, 1937.

36. ISHITANI, C.; IKEDA, Y. & SAKAGUCHI, K. — Hereditary variation and genetic recombination in Koji-moulds (*Aspergillus oryzae* and *A. sojae*). VI. Genetic recombination in heterozygous diploids. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **2**:401-430, 1956.

37. ISHITANI, C. & SAKAGUCHI, K. — Hereditary variation and genetic recombination in Koji-moulds (*Aspergillus oryzae* and *A. sojae*). V. Heterocaryosis. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **2**:345-400, 1956.

38. JAMES, A. P. & LEE-WHITING, B. — Radiation induced genetic segregation in vegetative cells of diploid yeast. *Genetics*, **40**: 826-831, 1955.

39. KAFER, E. — High frequency of spontaneous and induced somatic segregation in *Aspergillus nidulans*. *Nature, Lond.*, **186**:619-620, 1960.

40. LEDERBERG, J. & TATUM, E. L. — Novel genotypes in mixed cultures of biochemical mutants of bacteria. *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.*, **11**:113-114, 1946.

41. LEWIS, L. A. & BARRON, G. L. The pattern of the parasexual cycle in *Aspergillus amatelodami*. *Genet. Res. Camb.*, **5**:162-163, 1964.

42. LHOAS, P. — Mitotic haploidization by treatment of *Aspergillus niger* diploids with *p*-pluorophenylalanine. *Nature, Lond.*, **190**: 744, 1961.

43. MACDONALD, K. D. — Preservation of the heterozygous diploid condition in industrial microorganisms. *Nature, Lond.*, **204**:404-405, 1964.

44. McCLINTOCK, B. — Chromosome organization and genetic expression. *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.*, **16**:13-47, 1951.

45. McCLINTOCK, B. — Controlling elements and the gene. *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.*, **21**:197-216, 1956.

46. MIRANDA FILHO, J. B. de — Supressores do mutante *nic 8* em *Aspergillus nidulans*. [Tese de Mestrado, Univ. S. Paulo]: 85, 1972.

47. MORPURGO, G. — Somatic segregation induced by p-fluoro-phenylalanine. *Aspergillus News Letter*, **2**:10, 1961.

48. NGA, B. H. & ROPER, J. A. — Quantitative intrachromosomal changes arising at mitasis *in Aspergillus nidulans. Genetics,* **58**:193-209, 1968.

49. ODA, K. & IGUCHI, N. — Genetical and biochemical studies on the formation of protease in *Aspergillus sojae. Agr. Biol. Chem.,* **27**:758-766, 1963.

50. PARK, S.; KENEHAN, P. & GOODGAL, S. — Heterocaryons and recombination in *Phycomyces blakesleeanus. Genetics,* **60**:209-210, 1968.

51. PONTECORVO, G. — Mitotic recombination in the genetic systems of filamentous fungi. *Caryologia, Suppl.,* **6**:192-200, 1954.

52. PONTECORVO, G. — Microbial genetics: retrospect and prospect. *Proc. Roy. Soc. B.,* **158**:123-146, 1963.

53. PONTECORVO, G. & KAFER, E. — Genetic analysis by means of mitotic recombination. *Advance Genet.,* **9**:71-104, 1958.

54. PONTECORVO, G. & ROPER, J. A. — Genetic analysis without sexual reproduction by means of poliploidy in *Aspergillus nidulans. J. gen. Microbiol.,* **6**: vii.

55. PONTECORVO, G.; ROPER, J. A. & FORBES, E. — Genetic recombination without sexual reproduction in *Aspergillus niger. J. gen. Microbiol.,* **8**:198-210, 1953.

56. PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMMONS, L. M.; MAcDONALD, K. D. & BUFTON, A. W. J. — The genetics of *Aspergillus nidulans. Advanc. Genetics,* **5**:141-238, 1953.

57. PONTECORVO, G. & SERMONTI, G. — Recombination withouth sexual reproduction in *Penicillium chrysogenum. Nature, Lond.,* **172**:126, 1954.

58. ROBERTS, G. F. — Complementation in balanced heterocaryons and heterozygous diploids of *Aspergillus nidulans. Genet. Res. Camb.,* **5**:211-229, 1964.

59. ROPER, J. A. — Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. *Experientia,* **8**:14-15, 1952.

60. SERMONTI, G. — Complementary genes which affect penicillin yields. *J. gen. Microbiol.,* **15**:599-608, 1956.

61. SERMONTI, G. — Genetics of penicillin production. *Ann N. Y. Acad. Sci.,* **81**:950-966, 1959.

62. SERMONTI, G. — *Genetics of antibiotic producing microorganisms.* Wiley Interscience, London: 389, 1969.

63. SANDERSON, K. E. & SRB, A. M. — Heterokaryosis and parasexuality in the fungus *Ascochyta imperfecta. Amer. J. Bot.,* **52**:72-81, 1965.

64. SHANFIELD, B. & KAFER, E. — Chemical induction of mitotic recombination in *Aspergillus nidulans. Genetics,* **67**:209-219, 1971.

65. SINGH, U. P. & HOFFMAN, G. M. — Synthesis of heterokaryons and parasexual recombination in *Fusarium species. Arch. Mikrobiol.,* **67**:293-305, 1969.

66. STERN, C. — Somatic crossing-over and segregation in *Drosophila melanogaster. Genetics,* **21**:625-730, 1936.

67. STRØMNAES, Ø. & GARBER, E. D. — Heterocaryosis and the parasexual cycle in *Aspergillus fumigatus. Genetics,* **48**:653-662, 1963.

68. STRØMNAES, Ø.; GARBER, E. D. & BERAHA, L. — Genetics of phytopathogenic fungi. IX. Heterocaryosis and the parasexual cycle in *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum. Can. J. Bot.,* **42**: 423-427, 1964.

69. TINLINE, R. D. — *Cochliobolus sativus.* IV — Drug-resistance, color and nutritionally exacting mutants. *Can J. Bot.,* **39**: 1695-1704, 1961.

70. TINLINE, R. D. — *Cochliobolus sativus.* V. Heterokaryosis and parasexuality. *Can. J. Bot.,* **40**:425-437, 1962.

71. TINLINE, R. D. & McNEILL, B. H. — Parasexuality in plant pathogenic fungi. *Ann. Rev. Phytopathology,* **7**:147-170, 1969.

72. TUVESON, R. W. & COY, D. O. — Heterocaryosis and somatic recombination in *Cephalosporium mycophyllum. Mycologia,* **53**:244-253, 1961.

73. UCHIDA, K.; ISHITANI, C.; IKEDA, Y. & SAKAGUCHI, K. — An attempt to produce interspecific hybrids between *Aspergillus oryzae* and *A. sojae. J. Gen. Appl. Microbiol.,* **4**:31-38, 1958.

74. YAMASAKI, Y. & NIIZEKI, H. — Studies on variation of the rice blast fungus *Piricularia oryzae* Cav. I. Karyological and genetical studies on variation. *Bull. Natl. Inst. Agr. Sci.,* **13**:231-273, 1965.

75. ZINDER, N. D. & LEDERBERG, J. — Genetical exchange in *Salmonella. J. Bact.,* **64**: 679-697, 1952.

Recebido para publicação em 28/9/1972.

COLUMBIA AGAR BASE

OXOID

Uma nova base para agar-sangue

Columbia Agar Base OXOID combina as propriedades das bases tradicionais apresentando acentuada melhoria de rendimento em geral.

D. S. T. AGAR BASE

— seguramente o mais indicado para antibiogramas

———

— não impede a difusão de antibióticos, sulfonamidas e antissépticos urinários.

SOLICITEM-NOS LITERATURA CONSULTEM-NOS SEMPRE

MULTODISCOS PARA ANTIBIOGRAMAS

— seleção racional dos agentes

———

— práticos e econômicos

Distribuidora exclusiva:

Companhia Equipadora de Laboratórios Modernos

CELM

Rua Barata Ribeiro, 369 —— Caixa Postal 4022
Fones: 256-0508 / 256-1682 / 256-9848 / 257-1831
SÃO PAULO — SP

Edanee - Imprimiu
São Paulo