

Volume 5 Número 1 Jan.-Mar. 1974

# Revista de Microbiologia

Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia  
São Paulo – Brasil

REVISTA DE MICROBIOLOGIA  
Sociedade Brasileira de Microbiologia  
São Paulo – Brasil

# Jarras GasPak

**nova dimensão  
no sistema**

## BBL

### para anaeróbios

As infecções devidas aos germes anaeróbios são muito mais frequentes do que deixam supor os exames de laboratório. De fato, estes germes foram mal conhecidos durante muito tempo, por ser bastante complicada a sua identificação nas condições utilizadas até agora.

Hoje, o sistema BBL oferece simplicidade de trabalho e segurança nos resultados desses exames, imprescindíveis em todos os laboratórios pela multiplicidade de aplicações que representam, sejam na clínica, no ensino, na pesquisa ou na indústria.

#### PRINCÍPIO

As jarras GasPak permitem a obtenção de uma anaerobiose perfeita, numa hora, sem auxílio de qualquer aparelho anexo. Em policarbonato, material transparente, autoclavável, realizam as condições ótimas de higiene e visualidade. Os envelopes GasPak são geradores de hidrogênio e de gás carbônico que permitem realizar, sem bomba de vácuo, uma atmosfera inerte no interior da Jarra Anaeróbia.

Os dois componentes de base são:

- Um gerador de hidrogênio + um gerador de gás carbônico.
- Um catalisador de paládio agindo à temperatura ambiente. Por adição de 10 ml de água no envelope GasPak, há desprendimento de hidrogênio e gás carbônico. Sob o efeito do catalisador, o hidrogênio reage com o oxigênio do ar presente na jarra, para formar água; cria-se assim uma atmosfera anaeróbia.

O gás carbônico produzido favorece a multiplicação de certos microorganismos que se desenvolveriam mal ou seriam inibidos na ausência deste gás. Um indicador constituído por uma banda de papel de filtro embebida numa solução de azul de metileno, permite controlar visualmente a anaerobiose.

Para maiores detalhes, consultar o nosso

Departamento de Microbiologia.

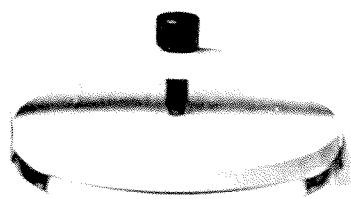


**BIOLAB-MÉRIEUX**  
**PRODUTOS PARA LABORATÓRIOS LTDA**

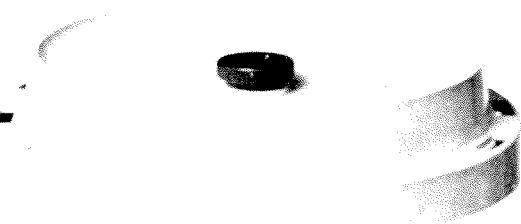
Rua do Resende, 96-A - Gr. 201 e 202. Tels.: 221-4089 e 242-0050

Rio de Janeiro, Gb. - 20.000 - ZC-06

São Paulo - Brasília - Porto Alegre - Niterói - Recife



JARRA ANAERÓBIA "100"



JARRA ANAERÓBIA "150"



## Revista de Microbiologia

**Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia  
São Paulo – Brasil**

**Conselho Editorial** Luiz Rachid Trabulsi, Italo Suassuna e Wilson Chagas de Araujo

**Editor** João Salvador Furtado  
Instituto de Botânica  
Caixa Postal 4005  
01000 São Paulo SP

**Editores Associados** Antônio F. Pestana de Castro e Sílvio A.C. Camba

**Aquisição por não-membros** Assinatura anual para quatro números: Cr\$ 120,00 para o Brasil; US\$ 20.00 (via marítima) ou US\$ 25.00 (via aérea) para o Exterior. Números avulsos: Cr\$ 30,00 para o Brasil e US\$ 6.50 (via aérea) ou US\$ 5.00 (via marítima) para o Exterior. Cheques ou ordens de pagamento em nome da Sociedade Brasileira de Microbiologia, para o endereço do Editor.

**Acquisition by non-members** Annual subscription for four numbers: US\$ 20.00 (surface mail) or US\$ 25.00 (air mail). Single copies: US\$ 6.50 (air mail) or US\$ 5.00 (surface mail). Checks or money orders for Sociedade Brasileira de Microbiologia, addressed to the Editor's office.

### Sociedade Brasileira de Microbiologia

**Diretoria** Golbert A. Costa, Presidente. Cláudio A. Jürgensen, Vice Presidente. Flávio Alterthum, Secretário Geral. João S. Furtado, Tesoureiro.

**Conselho Científico** Amadeu Cury, Augusto E. Taunay, A. Monteiro Filho, Carlos da Silva Lacaz, Ciro A. Peluffo, Dácio de A. Christovão, Dirce Franco de Araujo, Eduardo O. Cisalpino, Golbert A. Costa, Homero S. Jobin, Jandira Planet do Amaral, João Xavier Viana, José Noronha Peres, José Oliveira de Almeida, Lúcio P. de Carvalho Lima, Luiz Siqueira Carneiro, Milton Fontes Magarão, Oswaldo G. de Lima, Otávio Barachini, Otto G. Bier, Paulo de Góes, Raymundo A.C. Moniz de Aragão, Seymour H. Hutner, Werner K. Maas.

**Delegados Regionais** ALAGOAS: Ayro Pontes Lima Bomfim (Maceió). AMAZONAS: Aurélia Lopes Castilho (Manaus). BAHIA: Carlos Breinha Chaves (Salvador). CEARÁ: Eldair dos Santos Sátiro (Fortaleza). ESPÍRITO SANTO: Henrique Tommasi Netto (Vitória). GÓIAS: Maria Aparecida Muniz (Goiânia). GUANABARA: Altair Antunes Zebral (Rio de Janeiro) e Milton de Uzeda (Rio de Janeiro). MARANHÃO: Salomão Fiquene (São Luís). MINAS GERAIS: Romain Rolland Golgher (Belo Horizonte). PARÁ: Zéa Constante Lins (Belém). PARAÍBA: Maria Marluce Melo Vasconcelos de Castro (João Pessoa). PARANÁ: Alceu Schwab (Curitiba) e Luiz Parelha Ruiz (Londrina). PERNAMBUCO: Diva Montenegro Melo de Azevedo (Recife) e Marcelo Magalhães (Recife). RIO GRANDE DO NORTE: Maria Raquel dos Santos (Natal). RIO GRANDE DO SUL: Sérgio Job Jobim (Porto Alegre), Newton Neves da Silva (Porto Alegre) e Tabajara Gaúcho da Costa (Santa Maria). RIO DE JANEIRO: Cláudio Armando Jürgensen (Niterói). SANTA CATARINA: Aquilles A. Cordova Santos (Florianópolis). SÃO PAULO: Deise Pasetto Falcao (Araraquara), Vicente Corrêa Miranda (Araraquara), Augusto Cesar Montelli (Botucatu), Izabel Yoko Ito (Ribeirão Preto), Antônio Walter Ferreira (São Paulo), Waldyr Giorgi (São Paulo) e Edécio Maluf (Sorocaba). SERGIPE: Raimundo Mendonça de Araujo (Aracaju).

**Sociedade Brasileira de Microbiologia**

***Sócios Patrocinadores***

**BIOLAB-MÉRIEUX — Produtos para Laboratórios Ltda.**

**B. Herzog — Comércio e Indústria S.A.**

**CELM — Companhia Equipadora de Laboratórios Modernos**

**Eli Lilly do Brasil Ltda.**

**Indústria Química e Farmacêutica Schering S.A.**

**Revista de Microbiologia**

**Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia**

**Volume 5      Janeiro-Março 1974      Número 1**

*Rev. Microbiol. (S. Paulo), 5(1)*

**CONTEÚDO – CONTENTS**

**Artigos originais**

Neutralizing antibodies against bovine viral diarrhea-mucosal disease (BVD) virus in cattle sera from São Paulo State, Brazil — Laurinda A. Soares & Octávio A. de Carvalho Pereira .....	1
Origem da membrana de clivagem e delimitação de ascospores no fungo pirenomiceto <i>Sordaria fimicola</i> [Origin of the cleavage membrane and ascospore delimitation in <i>Sordaria fimicola</i> ] — Maria Luiza B. Nogueira & João S. Furtado .....	7
Padrões bacteriológicos de alimentos portugueses [Portuguese standards for foods] — A.M.R. Ribeiro .....	17

**JEOL** DO BRASIL

JEOL DO BRASIL LTDA. Rua da Glória, 654 01510 São Paulo Telefone: 279-1032

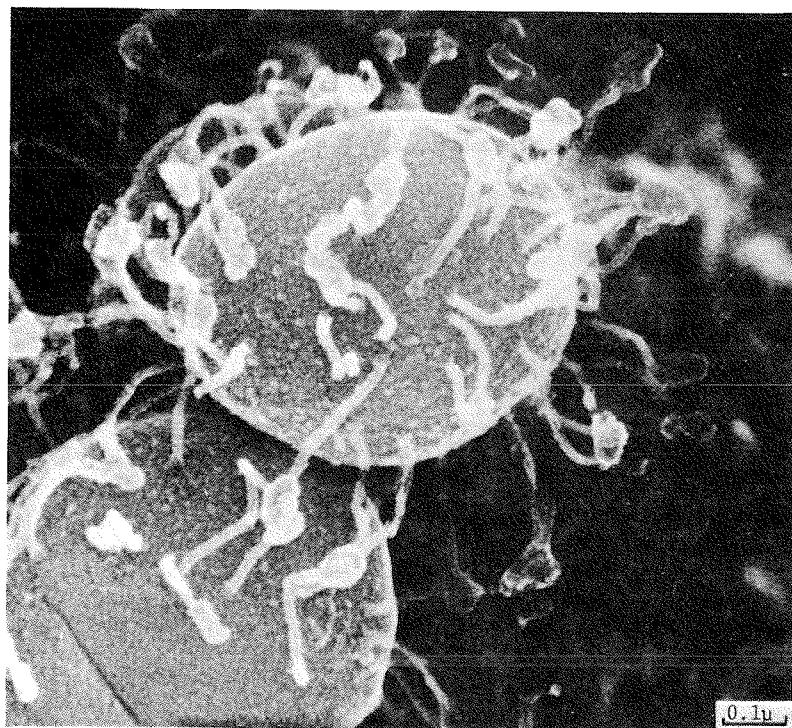


Imagen eletrônica secundária de fago P<sub>Φ</sub>55 adsorvido sobre *Staphylococcus*, obtida com JEM-100C, equipado com SEG e ASID.

## Novo lançamento da JEOL: microscópio de varredura de mesa

**JSM-P15**



Resolução:  
200 Å

Aumentos:

30X — 50.000X

Modo de varrimento:

forma e linha

Estágio de amostra:

tipo de gaveta

Dimensões do espécime:

10mm diâm. x 10mm alt.

Movimentos:

X, Y = 15mm

Tubo de imagem:

120mm x 90mm CRT

## Instruções aos autores

A Revista de Microbiologia publica trabalhos originais em todos os campos da microbiologia e da protozoologia. Revisões e atualizações serão publicadas a convite do conselho editorial.

Os manuscritos devem ser enviados em duplicata (original e uma cópia) para o Editor da Revista.

**NORMAS GERAIS** — Todo manuscrito submetido à Revista deve representar pesquisa original inédita e que não será publicada em outro órgão. Os trabalhos podem ser redigidos em português, espanhol ou inglês. Se aceitos pela Revista, não poderão ser reproduzidos, mesmo em partes, sem permissão oficial dos Editores.

A Revista segue, essencialmente, o "Style Manual for Biological Journals" (2<sup>a</sup> edição, AIBS, 1964). Os símbolos genéticos devem seguir, essencialmente, as recomendações de Demerec & col. (*Genetics*, 54: 61, 1966). Abreviações bioquímicas devem seguir, essencialmente, as regras da IUPAC-IUB (*J. Biol. Chem.*, 241: 527, 1966). Atividade enzimática deve ser expressa em termos de unidades internacionais (Enzyme Nomenclature, Elsevier Publ. Co., 1965). Para pesos e volumes, devem ser usados os prefixos nano (n) e pico (p), ao invés de milimicro (m $\mu$ ) e micromico (μ $\mu$ ). Comprimentos devem ser expressos em micrômetro (μm; 10<sup>-6</sup>m), ao invés de micro (μ); nanômetro (nm; 10<sup>-9</sup>m), ao invés de milimicro (m $\mu$ ); e Angstroms (A; 10<sup>-10</sup>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 DE MICRORGANISMOS** — A combinação binomial, nome do gênero seguido do da espécie, é adotada e a nomenclatura apresentada no "Bergery's Manual of Determinative Bacteriology" (7<sup>a</sup> ed., 1957) obedecida. Se o Autor divergir dessa nomenclatura, seu julgamento será respeitado, mas a classificação correspondente ao Manual de Bergery deverá ser mencionada a seguir, entre parênteses, à primeira vez em que o nome figurar no texto e no resumo. Quando um nome novo for proposto para um microrganismo, será solicitada a opinião de uma autoridade internacional em taxonomia.

**FORMA DO MANUSCRITO** — Os trabalhos devem ser datilografados em papel branco, comum, tamanho ofício, em espaço duplo ou triplo, deixando-se o mínimo de 3 cm de margens laterais, superior e inferior. Títulos de capítulos de primeira ordem devem ser centrados, incluídos essencialmente pela ordem: **Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos, Referências Bibliográficas**. Os de subcapítulos devem ser junto à margem esquerda.

A *página-título* deverá conter apenas e tão somente: (i) o título do artigo, centrado usando-se letras maiúsculas somente quando obrigatórias, (ii) o(s) nome(s) do(s) autor(es) com maiúsculas e minúsculas normalmente usadas e (iii) afiliação como nota de rodapé, indicada por asterisco.

O *resumo* não deverá ultrapassar 250 palavras. Os trabalhos redigidos em inglês devem ser acompanhados de um título e resumo em português; os redigidos em português e espanhol, de um título e resumo em inglês. O resumo na língua do trabalho e o título com resumo na outra língua devem ser datilografados em página separada do restante do texto.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** — No texto, as referências devem ser citadas por número. Os sobrenomes de dois autores devem ser separados por &; quando houver mais de dois autores, a separação é feita por ponto e vírgula e o último por &. Na secção **Referências Bibliográficas**, as citações devem ser por ordem alfabética de autor (ou da mesma combinação de autores) e, para um mesmo autor, em ordem cronológica, numeradas sequencialmente. Os artigos em periódicos devem ser citados na seguinte ordem: nome(s) do(s) autor(es) em maiúsculas, título do trabalho, nome do periódico (abreviado de acordo com o World Medical Periodicals), número do volume, número do fascículo (quando desejado; colocado entre parênteses), número da primeira e da última página do artigo, e ano da publicação.

Exemplo:

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

Quando puder ocorrer confusão com o título do periódico, o local da publicação deverá ser mencionado entre parênteses, após a abreviação. Exemplo: *Publ. Hlth Rep. (Wash.)*.

Citações de livros devem ter a seguinte ordem: autor(es), título, edição, local, editores e data. Exemplo:  
MILLER, S.E. — *A textbook of clinical pathology*. 6th ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1960.

Citações de "resumos", "dados não publicados", "comunicações pessoais" ou "no prelo" poderão ser adequadamente mencionadas no texto, mas não serão aceitas como referências bibliográficas.

**TABELAS** — Deverem ser numeradas em árabe e datilografadas em páginas separadas. Os dados devem ser arranjados de maneira que colunas de material idêntico sejam lidas perpendicular e não transversalmente. Cabeçalhos e legendas devem ser suficientemente claros e compreensíveis, sem necessidade de consulta ao texto. São permitidas notas expositivas de rodapé indicadas por asteriscos, mas não descrições pormenorizadas dos experimentos. Materiais e métodos utilizados para a obtenção dos resultados devem ser incluídos na secção correspondente.

**ILUSTRAÇÕES** — Cada uma das duas vias do manuscrito deverá ser acompanhada de um conjunto completo de ilustrações (preferivelmente como fotografias). Os gráficos e desenhos devem ser concluídos, não requerendo qualquer montagem ou rearranjo. Nenhuma parte do gráfico deverá ser datilografada, devendo ser usado um e o mesmo normógrafo. As fotografias de ilustrações a traço devem ser feitas em papel de alto contraste apropriado. É recomendável submeter gráficos e desenhos no dobro da impressão final da Revista, prevendo-se todos os elementos da figura para as escalas de redução. Fotografias com retícula devem ser feitas em papel brilhante, com contraste adequado para reprodução na escala 1:1, observados os espaços máximos disponíveis na Revista e seus submúltiplos, reservando-se espaço suficiente para a legenda. Sempre que houver escala de aumento ou redução, esta deverá ser superposta ou desenhada diretamente na fotografia ou figura. Ver instruções sobre legendas, notas de rodapé, etc. sob **TABELAS**. Proteja as ilustrações durante o trânsito, com uma folha de papelão.

**NOTAS BREVES** — Não devem exceder a 500 palavras e o respectivo resumo não mais do que 25. O(s) autor(es) deve(m) consultar um número da Revista para familiarização com a forma e o estilo.

**SEPARATAS** — Serão fornecidas, gratuitamente, 10 separatas por artigo. Para encomendas maiores, o(s) autor(es) deve(m) entrar em entendimento com o Editor, correndo as despesas por conta dos interessados.

# INTER LAB

Rua Dom Duarte Leopoldo, 707 — Telefone: 278-9703

Caixa postal 15 192 — Correio Cambuci

São Paulo SP

## Distribuidores autorizados para o Brasil de:

### DIFCO LABORATORIES (Estados Unidos)

Pioneira mundial em bacteriologia

aminoácidos; anticorpos fluorescentes;抗原; e antissoros bacterianos; carboidratos; corantes; discos para antibiogramas e para diferenciação de peptonas; endotoxinas; enriquecedores; enzimas; indicadores; hidrolisados; meios de cultura desidratados e preparados para ensaios microbiológicos, métodos padrões, tecidos e vírus; produtos bioquímicos; reativos soroalógicos e clínicos.

### DIFCO LABORATORIES (Inglaterra)

A mesma qualidade Difco em produtos especializados

- *produtos selecionados para microscopia óptica: bálsamo do Canadá, Carbowax, corantes (Giemsa, hematoxilina, May-Grunwald, Papanicolau e uma linha completa de corantes em pó e em solução), clarificadores, DPX, fixadores, indicadores, material para montagem e vedação de lâminas, mordentes, óleo para imersão, parafina histológica, Polywax e outros produtos;*
- *materiais fixadores e para montagem em microscopia eletrônica;*
- *produtos químicos diversos.*

### PROPPER INTERNATIONAL (Estados Unidos)

Precisão e qualidade garantidas

câmaras de Neubauer; lâminas e lamínulas; lancetas; pipetas para contagem de glóbulos brancos e vermelhos; pipetas de Sahli; termômetros químicos; torniquetes; tubos capilares com e sem heparina.

### LABTEST (Brasil)

Colorimetria avançada para análises químicas

ácido úrico; amilase; anticoagulantes; bilirrubina; cálcio; colesterol; cloretos; corantes para hematologia e eletroforese; creatinina; dehidrogenase láctica; ferro sérico; fosfatase ácida prostática; fosfatase alcalina; fósforo; glicose; lípidos totais; proteínas totais e albumina; timol; transaminases; triglicérides; uréia.

### IVA — INDUSTRIA VIDRIERA ARGENTINA (Argentina) Última qualidade a preços sem concorrência

vidro de borosilicato, trabalhado com esmero: balões, buretas, Erlcnmeyers, pipetas, provetas.

### ROLCO SRL — Qualidade a preço inigualável

agitadores; butirômetros; centrífugas clínicas e industriais; destiladores de água; microhematocritos.

## Neutralizing antibodies against bovine viral diarrhea-mucosal disease (BVD) virus in cattle sera from São Paulo State, Brazil

Laurinda A. Soares\* & Octávio A. de Carvalho Pereira\*\*

### **Summary**

Profuse diarrhea with serious animal damage and high mortality rate has been observed in cattle from São Paulo State, Brazil, in the last seven years. Based on the predominant symptoms of the disease, it has been clinically referred to as bovine viral diarrhea. Among 2,646 animals examined from 13 farms in the Municipality of Botucatu and vicinity, 465 (17.5%) were sick and 113 (24.3%) of the latter died. Virus isolation from clinical material from dead animals yielded negative results. Cytopathogenic agents were not isolated in bovine kidney cell cultures, nor was it possible to detect any noncytopathogenic strain by immunofluorescence. Search for neutralizing antibodies against the Oregon C24V strain was made in 31 serum samples from convalescent animals, 59 serum samples from clinically healthy adult animals and from ten pools of sera from calves. Serology revealed neutralizing antibodies in 38.7% of the sick animals, whose titers varied from 1 : 25 to 1 : 625. Healthy animals yielded titers 1 : 5 to 1 : 25, 3.4% being positive for the adults. Three out of the ten pools had antibodies. The results suggest that BVD-MD virus cannot be the main agent or the only pathogen responsible for the diarrhea outbreaks observed.

### **Resumo**

*Anticorpos neutralizantes contra o vírus da diarréia bovina-doença das mucosas (BVD-MD) no Estado de São Paulo, Brasil*

Nos últimos sete anos têm sido observados em bovinos do Estado de São Paulo, Brasil, surtos diarréicos com sérios distúrbios nos animais e alta taxa de mortalidade. Devido aos sintomas predominantes da doença, esta tem sido diagnosticada clinicamente como diarréia a vírus. Entre 2.646 animais examinados em 13 fazendas, no Município de Botucatu e vizinhanças, 465 (17,5%) adoeceram, dos quais 113 (24,3%) morreram. As tentativas para isolamento de vírus de materiais clínicos de animais mortos foram negativas. Não foram isolados agentes citopáticos em cultura de células de rim de bovino, nem foi possível detectar a presença de amostras não-citopáticas com o emprego de imunofluorescência. Pesquisa de anticorpos neutralizantes contra a amostra Oregon C24V foi feita com 31 amostras de soros de animais em convalescença, 59 amostras de soro de animais adultos clinicamente saudáveis e dez misturas de soros de vitelos. A sorologia evidenciou anticorpos neutralizantes em 38,7% nos animais doentes, cujos títulos variaram de 1 : 25 a 1 : 625. Animais saudáveis forneceram títulos de 1 : 5 a 1 : 25, com percentual de 3,4% positivo entre os adultos. Das dez misturas de soro de vitelos, três continham anticorpos. Os resultados sugerem que o vírus da diarréia bovina não pode ser o principal agente ou o único patógeno responsável pelos surtos diarréicos observados.

### **Introduction**

Bovine viral diarrhea-mucosal disease (BVD-MD) was first reported in 1946, when Olafson & col.<sup>16</sup> described a new highly contagious febrile disease of cattle. They isolated the agent, reproduced the disease experimentally and called it "virus diarrhea". The disease was a transmissible infection characterized by profuse diarrhea, with clinical signs of illness,

particularly ulceration of the mouth. Later on, a related disease reported by Pritchard & col.<sup>17</sup> was called "Indiana virus diarrhea". Ramsey & Chivers<sup>18</sup> described another similar disease, called "mucosal disease". Ever since numerous reports on similar diseases appeared throughout the world, as either bovine viral diarrhea or mucosal disease. The first publications gave rise to some confusion, due mainly to differences among the most predominant symptoms

\* Supported by "Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo", grant Médicas 70/966.

\*\* Escola Paulista de Medicina, Depto. de Microbiologia, Caixa Postal 01000 São Paulo SP.

and to conflicting data on mortality and morbidity rates. This led to the assumption that two different agents were involved, until several authors<sup>10,13</sup> proved the antigenic relationship between the agents of bovine viral diarrhea and mucosal disease.

Tissue culture studies with the virus were made soon after, but only in 1960 Gillespie & col.<sup>9</sup> isolated one cytopathogenic strain in bovine kidney cell culture (the Oregon C24V strain), that has been used as reference. This strain produces a cytopathogenic effect which consists of vacuolation of the cytoplasm, caryopycnosis and cellular degeneration. However, the existence of noncytopathogenic strains through the inoculation of tissue culture fluids in cattle was known long before. But only in 1964 was Fernelius<sup>7</sup> able to detect and titrate such strains by immunofluorescence. Sheffy & col.<sup>21</sup> demonstrated an antigenic relationship between the viruses of bovine viral diarrhea and hog cholera: pigs inoculated with the Oregon C24V strain were protected against a virulent strain of hog cholera virus. Cross-reaction with other viruses, however, has never been found: no antigenic relationship has ever been observed between bovine enteroviruses, parainfluenza-3, infectious bovine rhinotracheitis-infectious pustular vulvovaginitis (IBR-IPV), winter dysentery, bovine leucose, infectious ulcerative stomatitis, micotic stomatitis, blue tongue, bovine encephalitis and others<sup>12</sup>.

In Brazil, Correa & col.<sup>4,5</sup> reported outbreaks of diseases with symptoms resembling BVD-MD, but did not isolate the virus nor detect any neutralizing antibody. Such outbreaks occurring since 1966 showed the following main characteristics: diarrhea (the most common feature), ulcers in the oral mucosa, increased lacrimation in some animals, a slight rise of temperature and small hemorrhagic areas in the intestines. The animals quite ating and showed marked depression. About 20% of the animals died within 10 to 15 days. Treatment with antidiarrheics and chloromycetin gave no positive results. Based on clinical and hystopathological aspects, the authors concluded that it was bovine viral diarrhea-mucosal disease or a similar disease. Nevertheless, it would be necessary to isolate the virus and/or to detect specific neutralizing antibodies in significant rising levels to confirm the diagnosis.

The present investigation seeks to determine the involvement of the bovine viral diarrhea-mucosal disease virus in the progress of these outbreaks, through the search for neutralizing antibodies from both sick and healthy animals, and the attempt to isolate the virus from clinical material of dead animals, by inoculation of organ suspensions in bovine kidney cell cultures, and the use of immunofluorescence, to detect the presence of non-cytopathogenic strains.

## Material and Methods

### 1. Clinical material

**1.1. Virus isolation** — Virus isolation was attempted from the following clinical material from animals that died in six different farms during severe outbreaks of diarrhea: spleen, blood, mesenteric lymph nodes, feces and intestinal mucus. Samples arrived frozen and were kept in the laboratory at -20°C until cell cultures were available for virus inoculation.

**1.2. Serological tests** — Serum samples of animals from three different conditions were examined for specific antibodies. (a) Individual sera from 30 diseased animals. In a herd of 700 animals, 80 got sick with serious enteric and respiratory symptoms. From these, 30 individual sera were obtained. This outbreak extended over a period of a month, during which 35 animals died.

From another farm with similar problems, two serum samples were collected from one sick animal, the first sample in the beginning of the disease and the second two weeks later, shortly before the animal's death.

(b) Individual sera from 59 adult clinically healthy animals, obtained from a farm far away from the affected areas. There was no report of disease among these animals.

(c) Ten pools of sera from clinically healthy calves, obtained from a local slaughterhouse. Each pool consisted of sera from eight to ten calves one to two months old.

### 2. Technical methods

**2.1. Virus isolation** — Primary bovine kidney cell cultures were obtained by trypsinization of minced kidneys from calves. The cell suspensions were dispensed into test tubes, Leighton tubes or prescription bottles and incubated at 37°C for seven to ten days, when a confluent cell sheet was obtained. Monolayers were then inoculated with virus and suspected materials.

**2.2. Demonstration of cytopathic effects** — For detailed study of the pathologic alterations of the infected cells, monolayer cultures were grown on coverslips placed in Leighton tubes. A 10% organ suspension of the suspected materials was made with Hanks' BSS, treated with antibiotics, and inoculated into the cell cultures, 0.1 ml being used for each test tube. Six blind passages were carried out for each inoculum, and kept under observation during seven days, before the test was considered negative for cytopathogenic agents. For general observation

of infection in the monolayers, coverslips were removed from the Leighton tubes at regular intervals, fixed in methanol and stained in May-Grünwald Giemsa's.

**2.3. Demonstration of viral antigen by direct fluorescent antibody technique** — To demonstrate viral antigen, acetone-fixed air-dried monolayers were stained according to Fernelius<sup>7</sup> with the use of fluorescein-labeled gamma globulin anti-hog cholera virus. The strains München-1 and PAV-1 of hog cholera virus, maintained in the PK-15 cell line, were used as the antigen for the production of the immune sera<sup>15</sup>. For the preparation of the conjugate, the technique used by Danner & Bachmann<sup>6</sup> was adopted. Conjugate-stained monolayers were examined with a Carls Zeiss microscope equipped with fluorescent lamp HBO200w, UV-absorbing filter and blue-absorbing barrier filters.

**2.4. Neutralization tests** — The virus strain used was the Oregon C24V strain of the bovine viral diarrhea-mucosal disease virus<sup>9</sup>, passed serially in bovine kidney cell cultures twenty two times. The strain was inoculated in 100ml prescription bottles to yield sufficient amount of virus. The virus suspensions were pooled, centrifuged and the supernatant dispensed in 1.0ml aliquots and stored at -20°C. One aliquot was titrated by inoculating five test tubes with a confluent sheet of bovine kidney cells with 0.1ml of the virus, diluted from 10<sup>-1</sup> to 10<sup>-7</sup>. The TCID<sub>50</sub> was calculated according to Reed & Muench<sup>19</sup>. The titer was 10<sup>6.3</sup>.

For the neutralization tests, sera were thawed and inactivated at 56°C for 30 minutes prior to use. Dilutions from 1 : 5 to 1 : 625 were made with Hanks' BSS and each dilution mixed with equal volumes of a virus suspension containing 100 TCID<sub>50</sub>. The virus-serum mixtures were kept at 4°C for two hours when 0.2ml were inoculated into 2 to 5 cell culture tubes and incubated at 37°C. Two hours later 1ml of maintenance medium was added to each tube, which was then kept under observation for seven days<sup>3</sup>. Each neutralization test always included virus titration and uninoculated controls. It was valid only if 100 TCID<sub>50</sub> were present in 0.1ml and if the controls were in good conditions until the 7th day. The serum was considered positive when its titer was 1 : 5 or higher<sup>14,20</sup>.

## Results

Attempts to isolate cytopathogenic agents in primary bovine kidney cell cultures were unsuccessful. No detectable modification attributable to a virus could be observed. Controls inoculated with the

Oregon C24V strain of BVD-MD virus showed the characteristic cytopathogenic effect of the virus, i.e., cytoplasm vacuolization, caryopinosis and eventual cell degeneration. No viral antigen could ever be demonstrated by immunofluorescence. Monolayers inoculated with the Oregon C24V strain, used as positive controls, showed fluorescence in the cytoplasm, whereas the nucleus remained dark. Uninoculated cells, used as negative controls, showed no fluorescence.

In the neutralization tests for antibodies against BVD-MD virus a positivity of 38.7% was obtained from 31 sick animals, whose titers varied from 1 : 25 to 1 : 625. The majority of the positive sera had a 1 : 25 titer. Two paired serum samples collected from one sick animal, at the beginning of the disease and just prior to death, were negative. Only two out of 59 serum samples from healthy adult animals were positive, with 1 : 5 and 1 : 25 titers (Table 1).

Regarding the ten calf serum pools, three were positive, one with 1 : 5 titer and two with 1 : 25 titer.

Table 1

Neutralization test with sera from sick and healthy animals against the Oregon C24V strain of BVD-MD virus

Source of sera	Number of sera Positive/ Total	Percentage of positive sera	Sera titer			
			1 : 5	1 : 25	1 : 125	1 : 625
Sick animal	12/31	38.7	-	8	2	2
Healthy animal	2/59	3.4	1	1	-	-
Total	14/90	15.5	1	9	2	2

## Discussion

Serological results indicating the presence of antibodies against bovine viral diarrhea virus and the failure of virus isolation must be interpreted with caution<sup>22</sup>.

The analysis of Table I shows a low percentage of positivity in the total sera and that the value rises significantly (38.7%) in sera from sick animals, whereas it is much lower in healthy animals (3.4%). This suggests a better immune response in the former, probably due to a greater exposure to the viral antigen. However, since the sick animals were exsanguinated during the convalescent period, a more significant number of positive sera should be expected.

The occurrence of positive sera from calves and adult animals, whether healthy or sick, shows that the virus is probably widespread in the area. Vaccina-

tion procedures are not employed here, in any other State of Brazil, and no reference to cross-reaction with other bovine infections is known. Thus serological titers obtained can only be attributed to natural infection. The antibodies found in healthy animals demonstrates the occurrence of innapparent or subclinical infection, which is frequently found also in other parts of the world.

The presence of antibodies in pools of sera from clinically healthy calves shows that passive immunity probably exists. Malmquist<sup>14</sup> verified that passive immunity lasts from 6 to 14 months. Studying the antibody level in newborn animals, to which colostrum had been administered, he observed that the initial 1 : 2,048 titer decreased to 1 : 64 up to the 7th month and remained as such until the 14th month.

The low titers obtained in sera of sick animals could be explained on the basis of vidor's findings (personal communication, 1972), recently in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, where he isolated one strain of BVD-MD virus antigenically distinct from the Oregon C24V strain. He found neutralising antibodies against the Oregon C24V strain in 39% of bovine healthy animals, with titers varying from 1 : 8 to 1 : 256<sup>23</sup>. It is known that "in vitro" cross-neutralization with immune serum against homologous virus gives a neutralization index greater than with anti-serum against heterologous virus strains<sup>8,11,14</sup>.

The low serum titers obtained in this investigation could be explained if the virus strain involved could have some antigenic differences in relation to the Oregon C24V strain.

In spite of the typical disease symptoms, no infectious agent was ever found in this study. Similar results, however, were obtained by others<sup>1,2</sup> who studied animals with BVD-MD and found a high positive sera percentage without success in the attempts to isolate the virus.

Distinct infectious agents could be possibly involved in the outbreaks. It is known that mixed infections frequently occur, especially with para-influenza-3 and infectious bovine rhinotracheitis-infectious pustular vulvovaginitis viruses<sup>11,14,23</sup>.

The data obtained suggest that bovine viral diarrhea-mucosal disease virus, which seems to be widespread in the region, cannot be the main agent or the only pathogen causing the outbreaks of bovine diarrhea in São Paulo State.

#### Acknowledgements

We are thankful to Prof. Dr. Anton Mayr, Dean of the "Institut für Mikrobiologie un Infektionskrankheit der Tiere" of München University, Germany, who kindly supplied all virus strains used in this study.

#### References

- BURKI, F. — Viren des Digestionsapparates bei Rindern apud *Mh Vet.-Med.*, 21:148, 1966.
- CLASSICK, L. & FERNELIUS, A.L. — Bovine viral diarrhea virus: neutralizing antibodies in a calf obtained by cesarean section from a cow which was infected. *Amer. J. Vet. Res.*, 31: 393-5, 1970.
- COGGINS, L. — Standardization of the virus-neutralization test for bovine virus diarrhea. *Amer. J. Vet. Res.*, 25: 103-7, 1964.
- CORREA, W.M.; ZEZZA NETO, L.; BARROS, H.M. & GOTTSCHALK, A.F. — Nota clínico-patológica de uma enfermidade das mucosas em S. Paulo. *Arch. Inst. Biol.* (S. Paulo), 35: 141-51, 1968.
- CORREA, W.M.; GOTTSCHALK, A.F.; CORREA, C.N.M. & VASKE, T.R. — Observações na diarréia a vírus nos bovinos do Estado de S. Paulo. *Biológico*, 38: 145-7, 1972.
- DANNER, K. & BACHMANN, P.A. — Vermehrung und Ausbreitung von Schweinepest-Virus, Stamm München-1, in PK-15-Zellkulturen. *Zbl. Vet.-Med.*, Reihe B, 17: 353-62, 1970.
- FERNELIUS, A.L. — Noncytopathogenic bovine viral diarrhea viruses detected and titrated by immunofluorescence. *Canad. J. comp. Med.*, 28: 121-6, 1964.
- FERNELIUS, A.L.; LAMBERT, G. & BOOTH, G.D. — Bovine viral diarrhea virus — host cell interactions: serotypes and their relationship to biotypes by cross neutralization. *Amer. J. Vet. Res.*, 32: 229-36, 1971.
- GILLESPIE, J.H.; BAKER, J.A. & MCENTEE, K. — A cytopathogenic strain of virus diarrhea virus. *Cornell Vet.*, 50: 73-9, 1960.
- GILLESPIE, J.H.; COGGINS, L.; THOMPSON, J. & BAKER, J.A. — Comparison by neutralization tests of strains of virus isolated from virus diarrhea and mucosal disease. *Cornell Vet.*, 51: 155-9, 1961.
- GUNERI, S. — Vergleichende serologische Untersuchungen über Beziehungen zwischen verschiedenen Mucosal Disease (Virus-diarrhöe) — Virusstämme. München, 1968. p. 32. (Inaug. Diss. Tierärztl. Fak. München).
- KNIAZEFF, A.J. & PRITCHARD, W.R. — Antigenic relationships in the bovine viral diarrhea — mucosal disease complex. *Proc. U. S. live Stk. sanit. Ass.*, 64: 344-50, 1960.
- KNIAZEFF, A.J.; HUCK, R.A.; JARRET, W.F.M.; PRITCHARD, W.R., RAMSEY, F.K.; SCHIPPER, I.A.; STOBER, M. & LIESS, B. — Antigenic relationship of some bovine viral diarrhea — mucosal disease viruses from the US, Great Britain and West Germany. *Vet. Rec.*, 73: 768-9, 1961.
- MALMQUIST, W.A. — Bovine viral diarrhea — mucosal disease: etiology, pathogenesis and applied immunity. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 152: 763-8, 1968.

15. MENGELING, W.L.; GUTEKUNST, D.E.; FERNELIUS, A.L. & PIRTLE, E.C. — Demonstration of an antigenic relationship between hog cholera and bovine viral diarrhea viruses by immunofluorescence. *Canad. J. Comp. Med.*, 27: 162-4, 1963.
16. OLAFSON, P.; MACCALLUM, A.D. & FOX, F.H. — An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet.*, 36: 205-13, 1946.
17. PRITCHARD, W.R.; TAYLOR, D.B.; MOSES, H.E. & DOYLE, L.P. — A transmissible disease affecting the mucosae of cattle. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, 128: 1-5, 1956.
18. RAMSEY, F.K. & CHIVERS, W.H. — Mucosal disease of cattle. *N. Amer. Vet.*, 34:629-33, 1953.
19. REED, L.J. & MUENCH, H. — A simple method of estimating fifty per cent end points. *Amer. J. Hyg.*, 27: 493-7, 1958.
20. ROBSON, D.S.; GILLESPIE, J.H. & BAKER, J.A. — The neutralization test as an indication of immunity to virus diarrhea. *Cornell Vet.*, 50:503-9, 1960.
21. SHEFFY, B.E.; COGGINS, L. & BAKER, J.A. — Relationship between hog cholera and virus diarrhea of cattle. *Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.)*, 109: 349-52, 1962.
22. SOARES, L.A. — Ocorrência da diarréia bovina a vírus-doença das mucosas no Brasil: sua demonstração pelo encontro de anticorpos neutralizantes. M.S. Thesis, Escola Paulista de Medicina, 1973.
23. WIZIGMANN, G.; VIDOR, T. & RICCI, Z.M.T. — Investigações sorológicas sobre a ocorrência e incidência dos vírus da Parainfluenza-3, da rinotraqueite infecciosa e da diarréia a vírus-doença das mucosas dos bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. *Bol. Inst. Pesq. Vet. Desidério Finamor (Especial I)*: 52-58, 1972.



## Origem da membrana de clivagem e delimitação de ascosporos no fungo pirenomiceto *Sordaria fimicola*\*

Maria Luiza B. Nogueira\*\* & João S. Furtado\*\*\*

### **Resumo**

A delimitação dos oito ascosporos nos ascos do fungo pirenomiceto *Sordaria fimicola* (Rob.) Cesati et De Not. foi estudada sob o microscópio eletrônico, em material fixado seqüencialmente com gluteraldeído-ósmio ou com permanganato de potássio. Cada um dos núcleos fica circundado por membrana de clivagem composta de duas unidades de membrana, morfologicamente semelhantes à membrana plasmática do asco as quais parecem resultar da fusão de vesículas derivadas de estruturas com função de Golgi, no processo de transformação de citomembranas. A fusão dá origem a longas cisternas que continuam crescendo por adição de novas vesículas, até que, finalmente, forma-se um cilindro contínuo, disposto ao longo da parede do asco. A membrana de clivagem invagina para o interior do asco, nos intervalos entre cada par de núcleo, rompendo-se e recebendo a incorporação de novas vesículas. Ao final do processo, a membrana de clivagem se toca no centro, delimitando primórdios espóricos formados por um núcleo e citoplasma com volume indiscriminado de organelas.

### **Summary**

#### *Origin of the cleavage membrane and ascospore delimitation in Sordaria fimicola*

In perithecia fixed with sequential glutaraldehyde-osmium tetroxide or in potassium permanganate the cleavage membrane in *Sordaria fimicola* appears to be derived from fusion of vesicles originated from structures functioning as the Golgi complex in the processes of cytomembrane transformation. Long cisternae are formed by fusion of additional vesicles until a continuous membrane is completed. The cleavage membrane breaks during delimitation of the ascospores and incorporates additional vesicles until it is fully invaginated and delimits the ascospore primordia.

### **Introdução**

*Sordaria fimicola* (Rob.) Cesati et De Not. é um fungo cujos ascosporos são produzidos em pequenos peritécios em forma de moringa. A análise de um único peritécio permite identificar os diversos estágios de desenvolvimento das células que participam da reprodução sexuada. As que se envolvem em atividades vegetativas são haplóides, enquanto que as participantes na reprodução podem se encontrar em um dos seguintes estágios: *heterocariótico* (quando os núcleos haplóides persistem individualizados), *diploide* (quando os núcleos se fundem, constituindo a célula ascal); e em *diferenciação espórica* (asco propriamente dito), que pode se encontrar em qualquer estágio meiótico, até a formação dos oito ascosporos. Estes correspondem aos três tipos celulares que constituem o sistema ascógeno.

Durante o desenvolvimento do sistema ascógeno, os dois núcleos que compõem o heterocário dividem-se conjugadamente, em sincronismo quase perfeito. Forma-se um septo entre cada dois núcleos filhos, resultando três tipos de células: *basal* (uninucleada, haplóide), *intermediária* (heterocariótica, binucleada) e *terminal* (uninucleada, haplóide). A terminal se curva para trás, em gancho ("crozier"), e se funde com a basal, reconstituindo a condição heterocariótica. A célula ascal ou diploide deriva de cariogamia nas células intermediárias, após proliferação do sistema ascógeno.

Várias teorias procuraram explicar a formação dos ascosporos, antes do advento da microscopia eletrônica. De acordo com Wells<sup>62</sup>, Harper, em 1897, propôs que, após a divisão III, isto é a primeira divisão mitótica pós-meiótica, partiam raios astrais de cada um dos oito núcleos haplóides que se

\* Trabalho realizado com auxílio financeiro da FAPESP (processos 71/131) e CNPq (processo 8389/72).

\*\* Instituto Biológico, Caixa Postal 7119, 01000 São Paulo SP.

\*\*\* Instituto de Botânica, Caixa Postal 4005, 01000 São Paulo SP.

dispunham enfileirados no asco, de cuja fusão resultaria a separação do esporo do resto do citoplasma (epiplasma). Posteriormente, material de parede era depositado ao redor dos ascosporos. As outras hipóteses mais notáveis sobre a origem dos ascosporos encontram-se mencionadas no trabalho de Reeves<sup>53</sup>: Dangeard, em 1907, não observou raios astrais, mas descreveu uma bainha de material originado no corpo central de cada núcleo, a qual envolvia os esporos gradativamente; Faul, em 1905, supôs que os esporos fossem delimitados por um par de membranas; Jones, em 1926, observou que o plano de clivagem do citoplasma era iniciado por vacúolos estreitos, formados próximos à parede do asco; Mittman, em 1932, Andrus & Harter, em 1933 e 1937, Andrus, em 1936 e Chadefaud, em 1943 e 1960, observaram que os oito núcleos resultantes da divisão III ficavam contidos em uma vesícula ascal, de membrana bastante fina que, por constricções ao redor dos núcleos, delimitava os esporos.

As opiniões dos autores mencionados são bastante interessantes, quando analisadas em comparação com os dados derivados de estudos realizados com o microscópio eletrônico. Os primeiros trabalhos sobre a ultraestrutura da ascosporogênese foram feitos com leveduras<sup>15,16,29,30,50</sup>. Segundo Conti & Naylor<sup>16</sup>, a esporulação se inicia com a formação de membrana dupla, ao redor de cada núcleo. Não tendo sido estabelecida a origem da citada membrana, aqueles autores consideraram a possibilidade dela se originar do retículo endoplasmático ou de síntese "de novo". Posteriormente, material de parede se depositaria sobre a membrana que envolve os produtos da meiose. Para Hashimoto & col.<sup>30</sup>, os núcleos são circundados por membrana fina, possivelmente formada "in situ", a qual representará a membrana plasmática dos ascosporos, sobre a qual se desenvolve a parede. Em ambos os trabalhos mencionados<sup>16,30</sup>, o método de preparação usado envolveu fixação com permanganato de potássio, que não oferece condições para observação de processos de síntese e diferenciação celular, e emblocagem em butil-metacrilato, que apresenta o inconveniente de se retrair bastante durante a polimerização<sup>24</sup>.

Moore & McAlear<sup>48</sup> e Moore<sup>45</sup> não observaram membranas dupla ou simples envolvidas na formação dos ascosporos nos ascomicetos mais evoluídos, *Dasyscyphus* sp. e *Ascodesmis sphaerospora*, respectivamente. Os métodos empregados foram o de pré-fixação em permanganato de potássio, seguida de fixação ósmica e emblocagem em metacrilato. Marquardt<sup>39</sup> estudou a ascosporogênese em *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando a fixação em permanganato de potássio e inclusão em Vestopal, com o que observou a presença de membrana dupla, delimitando os ascosporos. Ceruti & col.<sup>14</sup> observaram a presença de

membrana (não definida estruturalmente) que, se dilatando, formava anel contínuo.

Numerosas contribuições, publicadas após 1953, descreveram a presença de dupla unidade de membrana envolvida na delimitação dos núcleos<sup>1-3,4,6,7,9,12,13,17,20-22,25,26,28,32-38,41,42,46,51,53-59,61-63,65,66</sup>. Entretanto, Plurad<sup>52</sup> afirmou que a membrana delimitante dos esporos em *Nematospora coryli* é constituída de dois pares de membranas duplas, atribuindo esta discrepância às próprias características do material estudado ou às técnicas de preparação adotadas.

As opiniões sobre a origem da membrana de clivagem podem ser divididas em várias hipóteses: (a) a partir da fusão de vesículas ou de cisternas do retículo endoplasmático<sup>6,9,35,53,54,63</sup>; (b) a partir da fusão de vesículas formadas por evaginações ("blebs") do envelope nuclear<sup>51,65</sup>; (c) a partir da fusão de vesículas derivadas de "blebs" do envelope nuclear que se associa ao retículo endoplasmático<sup>12,13,62</sup>; (d) a partir de sistemas membranosos intracitoplasmáticos, derivados de invaginação da membrana plasmática<sup>21,22</sup>; (e) a partir da invaginação da membrana plasmática do asco<sup>1,25,26,59</sup>; (f) formação "in situ"<sup>30</sup>; (g) origem não identificada, mas com transformações que antecedem sua função como membrana delimitante<sup>7,58</sup>.

Neste trabalho, serão apresentadas informações sobre a origem da membrana de clivagem e a formação de ascosporos no fungo *Sordaria fimicola*.

## Material e Métodos

Culturas de *S. fimicola* foram mantidas em CMDY ("cornmeal-dextrose agar") Difco, enriquecido com 1% de extrato de levedura Difco, à temperatura ambiente. Peritécios contendo ascos em diversos estágios de desenvolvimento, inclusive com ascosporos já formados, surgiram 5-7 dias após a inoculação, quando foram removidos um a um, com estilete, sob microscópio estereoscópico, e processados para microscopia eletrônica.

*Fixação seqüencial glutaraldeído-tetróxido de ósmio:* (a) fixação durante 60min à temperatura ambiente, em glutaraldeído 3% tamponado com cacodilato de sódio 0.1M, pH7.2-7.5; (b) lavagem com quatro trocas durante 24 horas, em solução de cacodilato de sódio 0.2M:sacarose 0.4M, em refrigerador; (c) transferência dos peritécios para lâmina escavada, onde foram quebrados em uma gota da solução de lavagem; (d) preparo de um filme de fibrina em outra lâmina escavada e encapsulagem das rosetas de ascos removidas dos peritécios, conforme técnica já descrita<sup>19,20</sup>; (e) pós-fixação em tetróxido de ósmio 1%, tamponado com a solução de lavagem mencionada, durante 60min, em refrigerador; (f) la-

vagem em água destilada; (g) desidratação em série etílica, com passagem final por acetona 100% ou por óxido de propileno, durante 30min; (h) emblocagem em Epon 812 ou Araldite 6005.

*Fixação em permanganato de potássio:* (a) fixação durante 60min, à temperatura ambiente, em solução aquosa de permanganato de potássio 2%, pH7.0; (b) lavagem dos peritécios em água destilada gelada, 10 vezes durante 24 horas; (c) desidratação, como já descrita; (d) emblocagem em Araldite 6005.

Cortes finos foram coletados sobre telas com filme suporte de Formvar e corados com acetato de uranila, seguido de tartarato de chumbo segundo Millonig, ou somente com tartarato de chumbo, ou somente com citrato de chumbo segundo Reynolds. O exame foi feito com os microscópios eletrônicos Philips EM300, Philips EM200 ou Zeiss EM9. Os aumentos mencionados nas eletromicrografias correspondem a valores aproximados.

#### Abreviaturas utilizadas nas figuras:

C	— cisternas
Epi	— epiplasma
Esp	— esporoplasma
g/O	— fixação seqüencial glutaraldeído-tetróxido de ósmio
KMnO <sub>4</sub>	— fixação com permanganato de potássio
M	— mitocôndrio
Mc	— membrana de clivagem
N	— núcleo
P	— parede do asco
R	— retículo endoplasmático
V	— vesícula
Vc	— vacúolo

#### Resultados

O processo de diferenciação da célula ascal é marcado pela alteração da forma da célula diplóide que se alonga, em dedo de luva, cujo núcleo passa a ocupar a região mais ou menos central. O envelope nuclear, na região voltada ao ápice celular, evagina intensamente e produz expansões designadas "blebs" (Figs. 1, 2). Concomitantemente, surge uma rede de retículo endoplasmático, localizada preferencialmente entre o núcleo diplóide e o ápice ascal (Fig. 3). Em determinados planos de corte, o retículo apresenta aspecto semelhante a cisternas achatadas, dispostas paralela ou concentricamente, tendo ou não extremidades expandidas (Figs. 4, 5).

Durante o processo de elongação ascal, surgem vesículas delimitadas por membrana unitária, cujo conteúdo, em material fixado com permanganato de potássio, parece ser removido (Fig. 4).



Fig. 1 — Corte longitudinal de asco com núcleo diplóide (N), em posição central, apresentando sinuosidades ("blebs") no envelope nuclear. Mitocôndrios (M) com regiões claras no centro da matriz mitocondrial. KMnO<sub>4</sub>, 15500X.

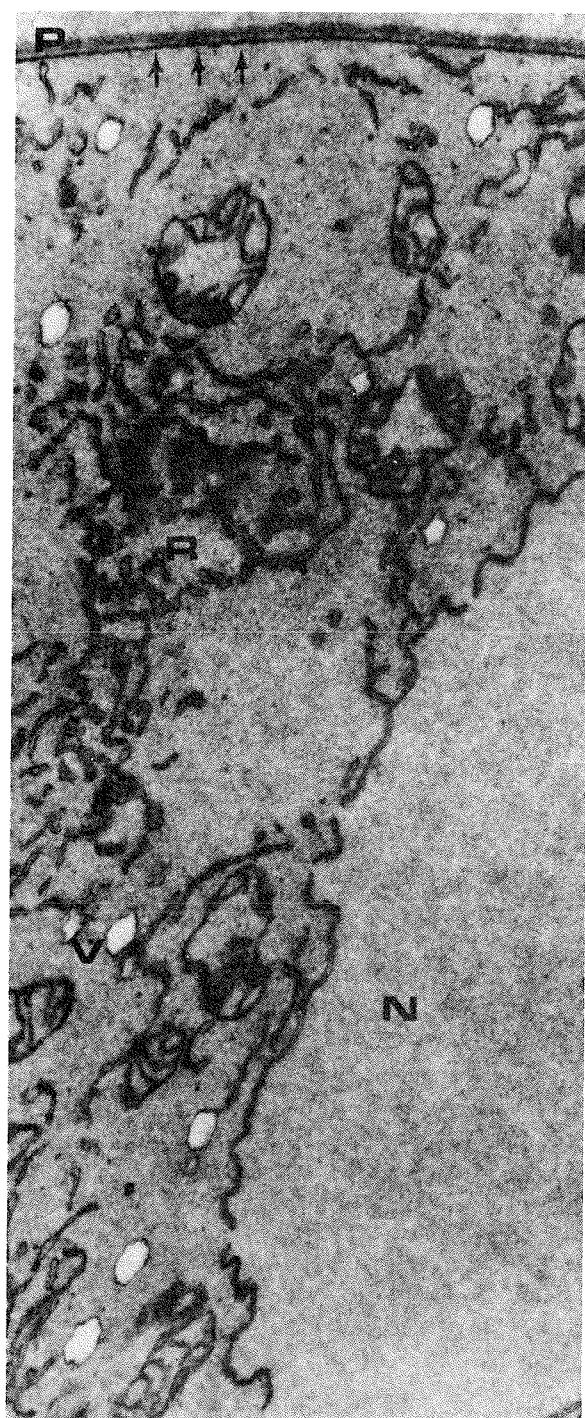


Fig. 2 — Processo de proliferação de citomembranas, evidenciando rede de retículo endoplasmático liso (R) próxima às sinuosidades do envelope nuclear. Vesículas (V), cujo conteúdo parece removido, contornadas por unidade de membrana. KMnO<sub>4</sub>. 20500X.

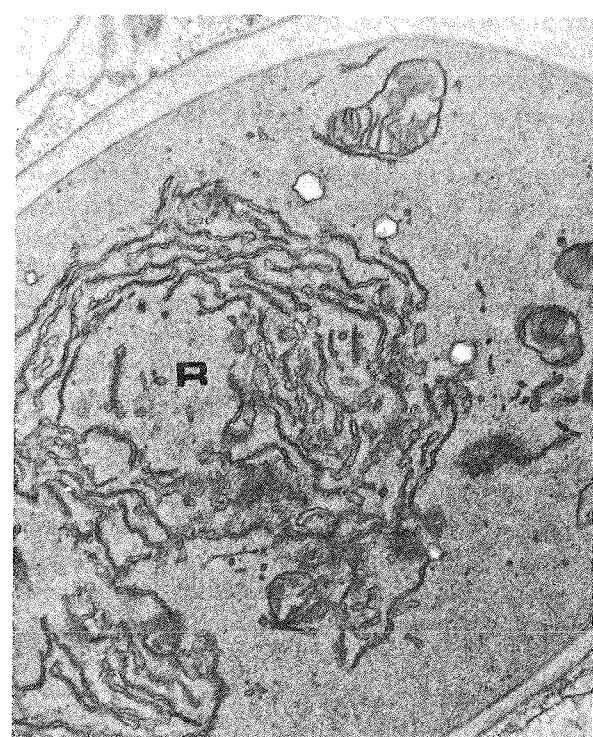


Fig. 3 — Corte oblíquo de asco, mostrando rede de retículo endoplasmático liso com cisternas dispostas paralelamente. Mitocôndrios com regiões claras na matriz mitocondrial e vesículas, contornadas por unidade de membrana, cujo conteúdo parece ter sido removido. KMnO<sub>4</sub>. 14000X.

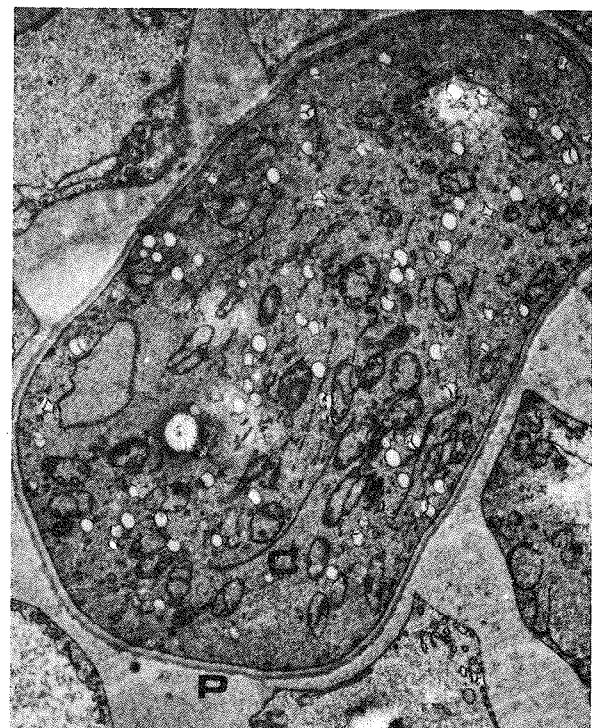


Fig. 4 — Corte oblíquo de asco, evidenciando longas cisternas (C). KMnO<sub>4</sub>. 5800X.

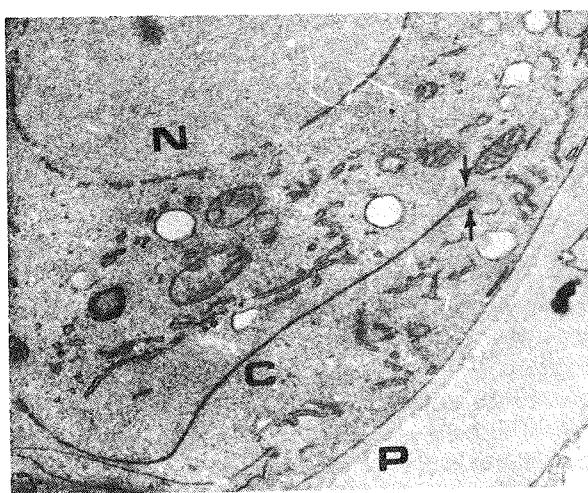


Fig. 5 — Detalhe de corte oblíquo de ascó, evidenciando longa cisterna (C) com dilatação (vesícula?) na extremidade. KMnO<sub>4</sub>. 17000X.

O desenvolvimento do ascó e a delimitação dos ascospores são processos rápidos, para os quais parecem contribuir, de maneira efetiva, a atividade de lomassomos (Fig. 6), a intensa proliferação de vesículas e a incorporação de membranas no plasmalema ascal, levando-se em conta as imagens de sinuosidade observadas (Fig. 6).

Diversas modificações ocorrem no citoplasma do ascó durante a meiose. Desenvolve-se um grande vacúolo basal; na região entre o núcleo e o ápice ascal, anteriormente ocupada pela rede de retículo endoplasmático, aparecem vacúolos de conteúdo fibrilar frouxo, os quais podem conter, inclusive, outras vesículas menores, delimitadas por membrana mais eletrodensa (Fig. 7), que parece derivar de dilatações ou fragmentação da rede reticular anteriormente existente; mitocôndrios, que antes apareciam predominantemente em secção circular, oval ou pouco alongada, passam a predominar em secção mais alongada ou em halteres; a parede do ascó, até então formada por camada fina, homogênea, tem sua espessura aumentada e passa a exibir duas regiões distintas de compactação (Fig. 8).

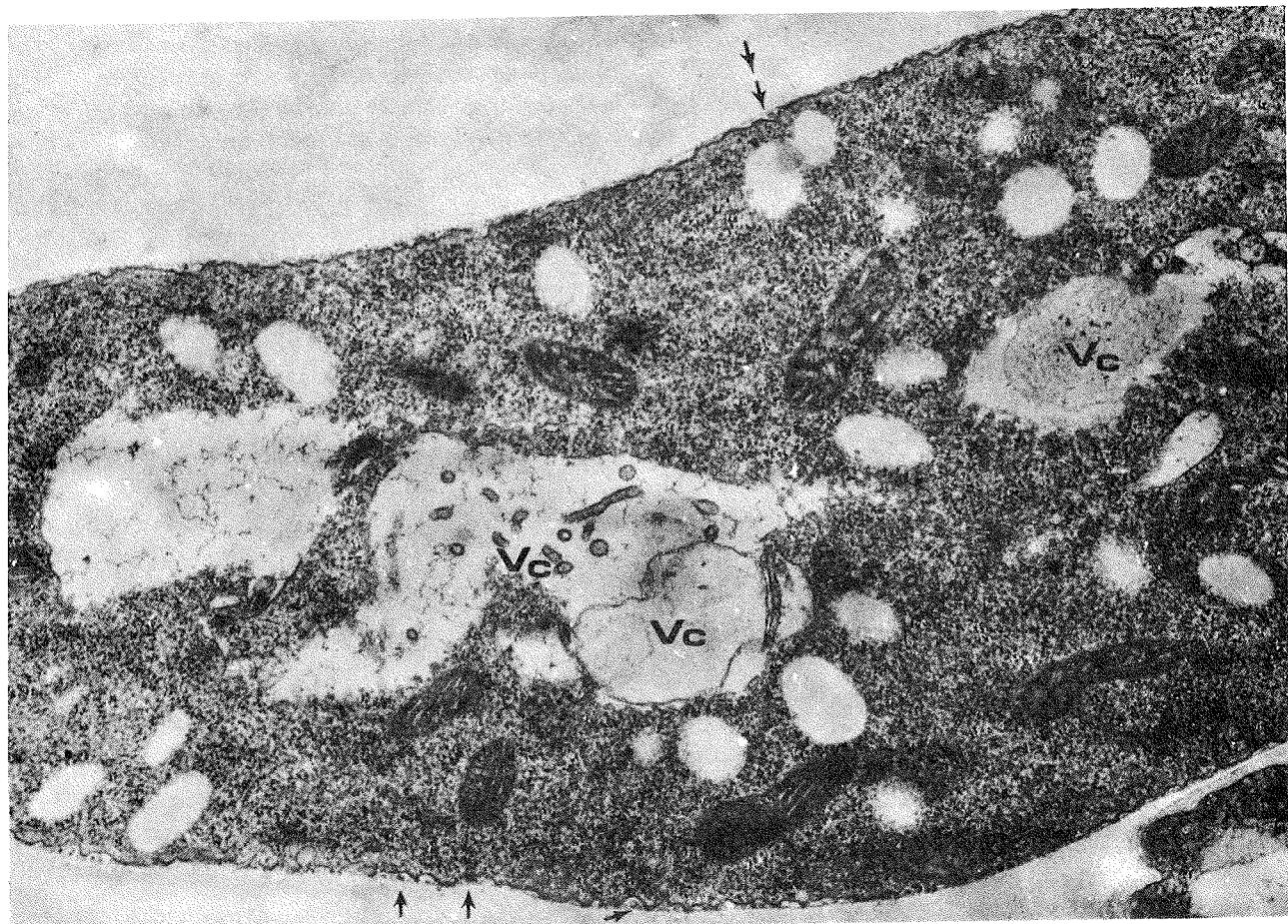


Fig. 6 — Corte longitudinal de ascó com vacúolos (Vc) de conteúdo fibrilar frouxo, contendo inúmeras vesículas. As setas indicam lomassomos. g/O. 19970X.

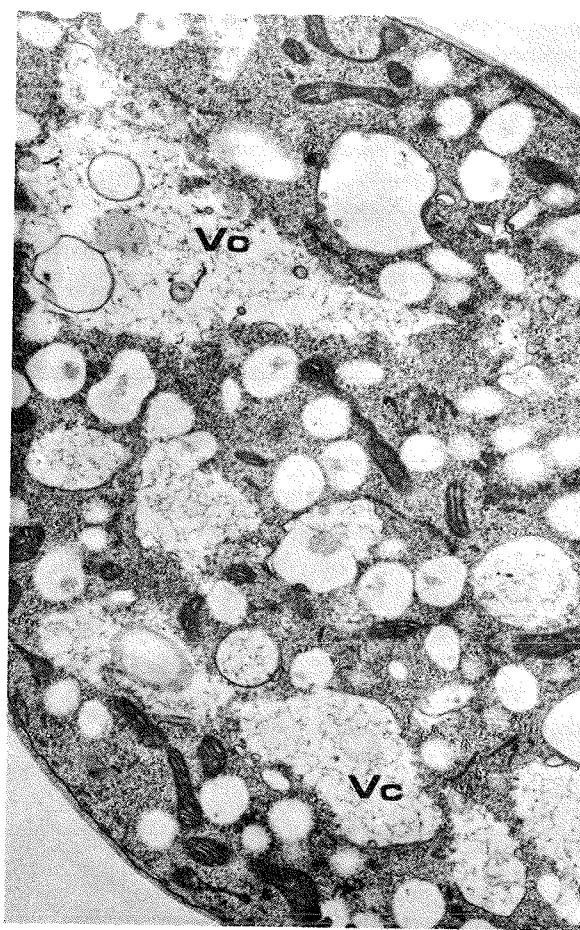


Fig. 7 — Corte longitudinal de asco meiótico, evidenciando vacúolos (Vc) de conteúdo fibrilar frouxo, situados entre o núcleo e o ápice, contendo inúmeras vesículas delimitadas por membranas eletrodensas. g/O. 11400X.

O início da delimitação dos ascosporos pode ser demarcado quando a membrana delimitante ou de clivagem começa a ser formada. Cisternas longas, existentes no citoplasma, se expandem por fusão com outras vesículas, à medida em que a meiose progride. Em estágios mais avançados, as cisternas se unem e formam um cilindro adjacente à membrana plasmática do asco (Figs. 8, 9). Nesta etapa, a meiose está concluída e os quatro núcleos haplóides já passaram pela primeira divisão mitótica. O asco fica com oito núcleos enfileirados, constituindo as tétradas ordenadas. A membrana de clivagem invagina, em direção ao centro do asco, nas regiões entre cada par de núcleo, arrastando citoplasma com organelas indiscriminadamente ao redor de cada núcleo (Fig. 9). Algumas imagens observadas sugerem que, durante o processo de invaginação, a membrana de clivagem se rompe e novas vesículas são adicionadas a ela (Fig. 9), continuando, desta forma, seu crescimento em direção ao centro do asco. Este é um aspecto que necessita ser estudado mais profundamente.

Finalmente, a membrana de clivagem atinge o centro do asco, toca com a outra invaginante, funde-se e o esporo está delimitado. De um lado fica o citoplasma ao redor dos produtos da meiose (esporoplasma) e do outro o citoplasma ascal, residual (epiplasma). Cisternas de retículo endoplasmático (Fig. 8) ou vesículas delimitadas por duas unidades de membrana (Fig. 10) são freqüentemente encontradas na fase de clivagem dos esporos.

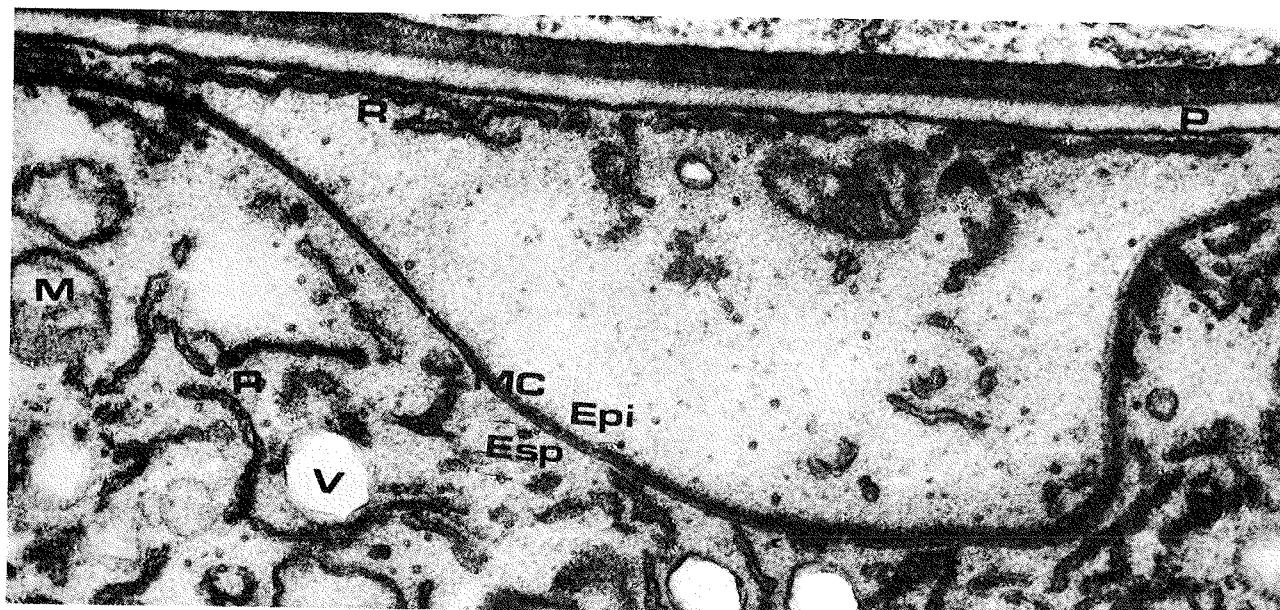


Fig. 8 — Detalhe da invaginação da membrana de clivagem (C), separando o esporoplasma (Esp) do epiplasma (Epi), com distinta distribuição de organelas. Notar perfis de retículo endoplasmático liso (R), adjacentes à membrana plasmática do asco (setas). KMnO<sub>4</sub>. 25600X.

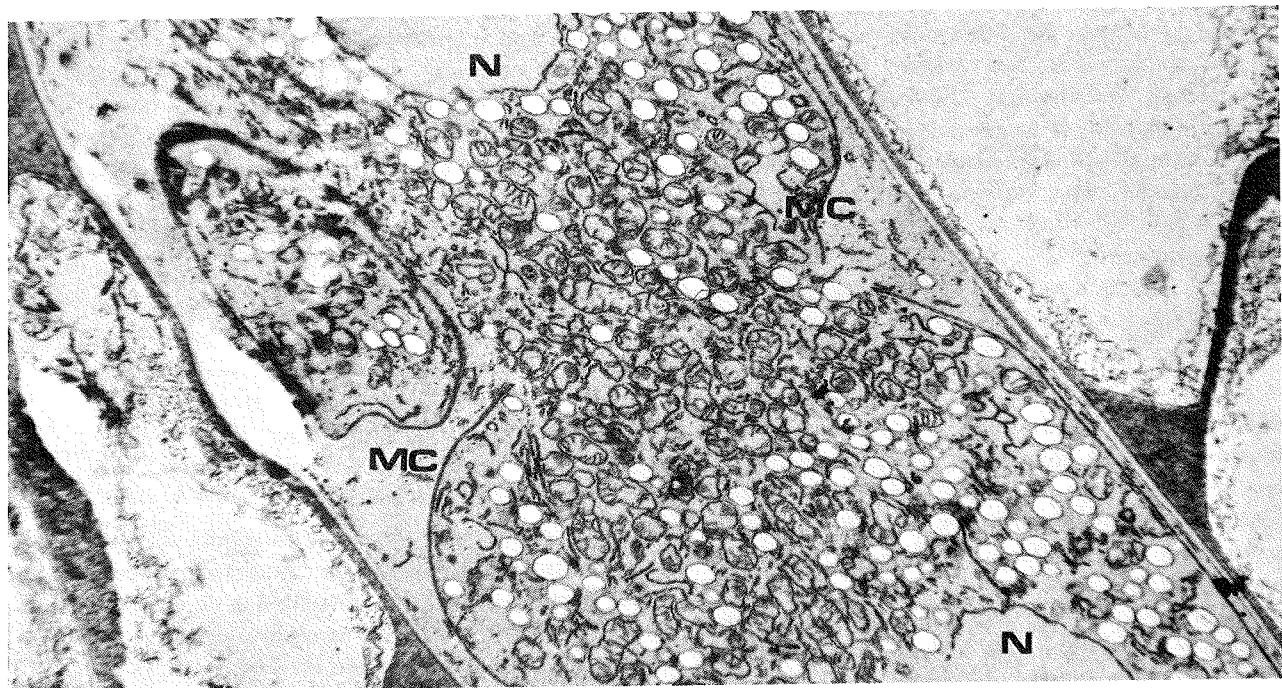


Fig. 9 — Detalhe de corte longitudinal de asco mostrando o processo de delimitação dos ascosporos. Membrana de clivagem (C) rompida durante a invaginação, arrastando consigo organelas e envolvendo os núcleos (N) individualmente. KMnO<sub>4</sub>. 8600X.

#### Discussão

O sistema de citomembranas em eucariotas é constituído de várias "famílias", com distintos padrões de organização e composição química<sup>7, 10, 23, 43, 58, 62</sup>. Membranas são formadas a partir de outras ou são organizadas "de novo", pela reunião de precursores lipídicos e proteicos, sob determinadas condições<sup>64</sup>.

Grove & col.<sup>27</sup> fornecem informações sobre as relações entre as distintas "famílias" durante as alterações ultra-estruturais relacionadas ao crescimento apical de fungos, envolvendo o envelope nuclear, retículo endoplasmático, dictiosomos, vesículas e plasmalema. Cisternas do retículo ou do envelope nuclear alinham-se adjacentemente à face formadora do dictiosomo. Enquanto as cisternas da face de maturação do dictiosomo apresentam estrutura semelhante à da membrana plasmática, as da face formadora são semelhantes ao retículo endoplasmático e ao envelope nuclear. A polarização de membranas, entre a face formadora e a de maturação, indica que a transformação de citomembranas ocorre no Golgi. Durante o crescimento apical de hifas vegetativas, vesículas formadas na face de maturação do dictiosomo, cuja membrana delimitante é morfológicamente semelhante à membrana plasmática, são capazes de se fundir, em fenômeno inverso ao da pinocitose.

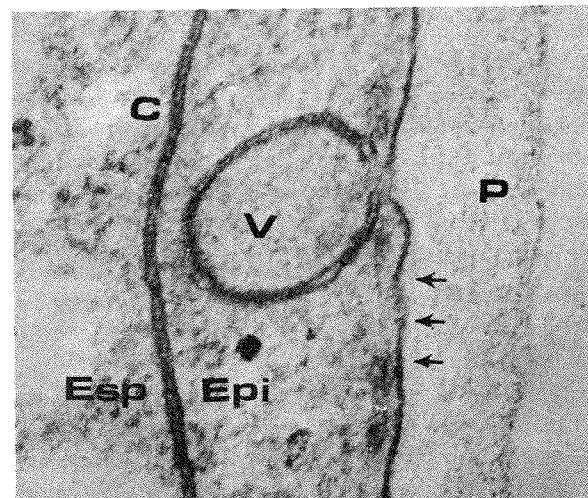


Fig. 10 — Detalhe da vesícula (V) delimitada por duas unidades de membrana, que parecem relacionadas com a membrana plasmática do asco (setas). Parede do asco (P) de estrutura homogênea, membrana de clivagem (C), epiplasma (Epi) e esporoplasma (Esp) conspícuos. g/O. 37200X.

Há vários exemplos de interrelacionamento entre as diversas famílias de citomembranas, desde o da simples aproximação, sem contato físico aparente (associações), à conspícuas continuidade estrutural. Os seguintes casos já foram documentados: (a) associação entre retículo endoplasmático e plasmalema<sup>44</sup>; (b) associação entre retículo e vesículas ou vacúolos<sup>5, 10, 11, 17, 18, 58</sup>; (c) associação entre retículo e envelope nuclear<sup>7, 12, 13, 17, 53, 62</sup>; (d) continuidade entre envelope nuclear e retículo<sup>17, 53, 64</sup>; (e) continuidade entre envelope nuclear e plasmalema<sup>47</sup>; (f) associação entre plasmalema e vesículas<sup>8, 23, 40, 43, 47, 60</sup>.

As associações entre as diversas "famílias" de citomembranas sugerem a existência de membranas intermediárias em composição química e estrutura, como foi observado por Grove & col.<sup>27</sup>, nos dictiosomas do fungo aquático *Pythium ultimum*. Nem todos os fungos apresentam dictiosomas em cisternas empilhadas, que caracterizam o aspecto morfológico mais comum do Golgi, mas quase todos os fungos exibem vesículas secretoras e crescimento superficial através de incorporação de vesículas à membrana plasmática, as quais parecem ser formadas diretamente de cisternas tubulares ou infladas que devem funcionar como elementos de transição no processo de transformação de citomembranas. As transformações necessárias para a produção de uma vesícula secretora ocorrem, às vezes, em uma única cisterna. Esta, portanto, parece ser a unidade funcional mínima do aparelho de Golgi nos fungos<sup>49</sup>.

O retículo endoplasmático é um sistema de membranas altamente diferenciado, associado à síntese de fosfolípides e proteínas. Age, portanto, como fonte de precursores de membrana. O aumento de retículo, sem evidência de transferência de segmentos de membrana para si, parece atestar sua capacidade de produzir membranas<sup>64</sup>. Schrantz<sup>58</sup> não encontrou dictiosomas típicos durante o estudo da ultra-estrutura da ascosporogênese em ascomicetos superiores e sugeriu que as funções do dictiosomo estariam assumidas por sáculos endoplasmáticos empilhados, que produzem vesículas secretoras. A este conjunto, foi proposto o termo "pseudo-Golgi". Durante o estágio diplóide, na ascogênese em *Ascobolus stercorearius*, há grande acúmulo de retículo liso, em rede, com comunicações com o rugoso, e disposto na parte distal sobre o núcleo, recobrindo-o; a rede se fragmenta durante o crescimento do asco, formando cisternas achatadas que, posteriormente, se tornam infladas<sup>62</sup>. Black & Gorman<sup>6</sup> verificaram que membranas empilhadas, encontradas durante a delimitação dos esporos, permanecem como tais até a maturação da estrutura de propagação.

*Sordaria fimicola* também apresenta retículo endoplasmático formando uma rede localizada predominantemente entre o núcleo diplóide e o ápiceascal.

Em determinados planos de corte, a estrutura é semelhante à de cisternas achatadas, dispostas paralela ou concentricamente, tendo ou não extremidades expandidas. A fixação glutaraldeído-ósmica revela que, na região anteriormente ocupada pela rede de retículo, durante a meiose, surgem vacúolos de conteúdo fibrilar frioso ou contendo outras vesículas menores, delimitadas por membrana mais eletrodensa.

Vários autores afirmam que a estrutura da membrana de clivagem é semelhante à da membrana plasmática do asco<sup>58, 62</sup>. Na presença de glutaraldeído 2%, durante duas horas, tanto a membrana de clivagem como a plasmalema são preservadas, ao contrário do que ocorre com o envelope nuclear, retículo endoplasmático e membranas dos mitocôndrios, que deixam uma zona clara em seus lugares<sup>58</sup>.

Wells<sup>62</sup> encontrou invaginações da membrana plasmática formando complexos de membranas concêntricas, mas considerou que a membrana de clivagem não se originaria daí, pelas seguintes razões: (a) as invaginações da plasmalema são mais eletrodensas do que a membrana de clivagem; (b) o intervalo entre as duas unidades de membrana que formam a membrana de clivagem é maior do que o espaço entre os dois folhetos da membrana plasmática invaginante.

Embora os componentes da membrana de clivagem sejam semelhantes à membrana plasmática, sua origem, a partir de invaginações da plasmalema, não deve ocorrer, como acreditam alguns. A membrana de clivagem, por outro lado, é distinta do retículo endoplasmático e do envelope nuclear, o que prejudica as hipóteses que relacionam estes componentes à gênese da membrana de clivagem.

Resta a hipótese de que, a exemplo do mecanismo de transformação de citomembranas, mediado pelo complexo de Golgi, membranas sofram modificações subestruturais e se tornem semelhantes à membrana plasmática. O aumento do retículo endoplasmático e de vesículas são fenômenos marcantes durante a ascosporogênese. Estes dois aspectos, mais a aparente sinuosidade da membrana plasmática na região apical do asco em *S. fimicola*; o acúmulo das vesículas também na região apical e o alinhamento de outras, parecendo dar origem a cisternas por subsequente fusão; a presença de vesículas que se juntam às cisternas; e a presença de estruturas que podem funcionar como Golgi sugerem que: a exemplo do que ocorre no processo de crescimento apical nas hifas, as citomembranas sofrem transformações durante a ascosporogênese. Conseqüentemente, as duas unidades de membrana que formam a membrana de clivagem derivam da modificação subestrutural da membrana de vesículas, expansão de cisternas, fusão e formação de "vesícula ascal", "cilindro", membrana delimitante ou membrana de clivagem.

## Referências Bibliográficas

1. BANDONI, R.J.; BISALPUTRA, A.A. & BISALPUTRA, T. — Ascospore development in *Hansenula anomala*. *Can. J. Bot.*, 45:361-366, 1967.
2. BECKETT, A.; BARTON, R. & WILSON, I. M. — Fine structure of wall and appendage formation in ascospores of *Podospora anserina*. *J. gen. Microbiol.*, 53:89-94, 1968.
3. BECKETT, A. & CRAWFORD, R. M. — Nuclear behaviour and ascospore delimitation in *Xylospheara polymorpha*. *J. gen. Microbiol.*, 63:269-280, 1970.
4. BECKETT, A.; ILLINGWORTH, R. F. & ROSE, A. H. — Ascospore wall development in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bact.*, 113:1054-1057, 1973.
5. BERJAK, P. — Lysosomal compartmentation: ultrastructural aspects of the origin, development, and function of vacuoles in root cells of *Lepidium sativum*. *Ann. Bot.*, 36:73-81, 1972.
6. BLACK, S. H. & GORMAN, C. — The cytology of *Hansenula*. III. Nuclear segregation and envelopment during ascosporogenesis in *Hansenula wingei*. *Arch. Mikrobiol.*, 79:231-248, 1971.
7. BRACKER, C. E. — Ultrastructure of fungi. A. *Rev. Phytopathol.*, 5:343-374, 1967.
8. BRACKER, C. E. — Cytoplasmic vesicles in germinating spores of *Gilbertella persicaria*. *Protoplasma*, 72:381-397, 1971.
9. BRACKER, C. E. & WILLIAMS, C. M. — Comparative ultrastructure of developing sporangia and ascii in fungi. In UYEDA, R., ed. Abstr. 6th. Int. Congr. Electron microscopy, Kyoto, Maruzen, v. 2, p. 307-308, 1966.
10. BRUSHABER, J. A. & JENKINS, S. F., Jr. — Lomasomes and vesicles in *Poria monticola*. *Can. J. Bot.*, 49:2075-2079, 1971.
11. BUVAT, R. — Relations entre l'ergastoplasme et l'appareil vascuolaire. *C. r. Ac. Paris: série D*, 245:350-352, 1957.
12. CARROLL, G. C. — The ultrastructure of ascospore delimitation in *Saccobolus kerverni*. *J. Cell Biol.*, 33: 218-224, 1967.
13. CARROLL, G. C. — A study of the fine structure of ascosporogenesis in *Saccobolus kerverni*. *Arch. Mikrobiol.*, 66:321-339, 1969.
14. CERUTI, A.; CONVERSO, L.; BELLANDO, M. & MARENCO, G. — Sull'ultrastruttura dei *Tuber*. *Caralologia*, 17:519-544, 1964.
15. CONTI, S. F. & NAYLOR, H. B. — Electron microscopy of ultrathin sections of *Schizosaccharomyces octosporus*. II. Morphological and cytological changes preceding ascospore formation. *J. Bact.*, 79:331-340, 1960a.
16. CONTI, S. F. & NAYLOR, H. B. — Electron microscopy of ultrathin sections of *Schizosaccharomyces octosporus*. III. Ascosporogenesis, ascospore structure, and germination. *J. Bact.*, 79:417-425, 1960b.
17. DELAY, C. — Étude de l'infrastructure de l'asque d'*Ascobolus immersus* Pers. pendant la maturation des spores. *Annl. Sci. nat. Paris: 12ème série*, 7:361-420, 1966.
18. FREY-WYSSLING, A.; GRIESHABER, E. & MUHLET-HALER, K. — Origin of spherosomes in plant cells. *J. Ultrastruct. Res.*, 8:506-516, 1963.
19. FURTADO, J. S. — The fibrin clot; a medium for supporting loose cells and delicate structures during processing for microscopy. *Stain Technol.*, 45:19-23, 1970.
20. FURTADO, J. S. & OLIVE, L. S. — Ultrastructure of ascospore development in *Sordaria fimicola*. *J. Elisha Mitchell scient. Soc.*, 86:131-138, 1970.
21. GIL, F. — Mesosomes; their role in the delimitation of the ascospore. *Mycopathol. Mycol. Appl.*, 49:243-247, 1973.
22. GIL INOJOSA, F. — Ultraestructura de la formación de ascosporas en tres géneros de Ascomycetes: *Ajellomyces dermatitidis*, *Arthroderma benhamiae*, *Schizosaccharomyces octosporus*. Trabajo especial para o grau de Licenciado em Biología apresentado a Universidad Central de Venezuela. Caracas. 30p., 33 ilust., 1970.
23. GIRBARDT, M. — Die Ultrastruktur der Apikalregion von Pilzhyphen. *Protoplasma*, 67:413-441, 1969.
24. GONZALES-SANTANDER, R. — Técnicas de microscopia eletrônica en biología. Madrid, Aguilar S.A. ed. XXXIX + 666p., 1969.
25. GREENHALGH, G. N. & EVANS, L. V. — The developing ascospore wall of *Hypoxyylon fragiforme*. *J. R. microsc. Soc.*, 88:545-556, 1968.
26. GREENHALGH, G. N. & GRIFFITHS, H. B. — The ascus vesicle. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 54:489-492, 1970.
27. GROVE, S. N.; BRACKER, C. E. & MORRE, D. J. — An ultrastructural basis for hyphal tip growth in *Pythium ultimum*. *Amer. J. Bot.*, 57:245-266, 1970.
28. GUTH, E.; HASHIMOTO, T. & CONTI, S. F. — Morphogenesis of ascospores in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bact.*, 109:869-880, 1972.
29. HASHIMOTO, T.; CONTI, S. F. & NAYLOR, H. B. — Fine structure of microorganisms. III. Electron microscopy of resting and germinating ascospores of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bact.*, 76:406-416, 1958.
30. HASHIMOTO, T.; GERARDT, P.; CONTI, S. F. & NAYLOR, H. B. — Studies on the fine structure of microorganisms. V. Morphogenesis of nuclear and membrane structure during ascospore formation in yeast. *J. biophys. biochem. Cytol.*, 7:305-317, 1960.
31. HAWKER, I. E. — Fine structure of fungi as revealed by electron microscopy. *Biol. Rev.*, 40:52-92, 1965.
32. ILLINGWORTH, R. F.; ROSE, A. H. & BECKETT, A. — Changes in the lipid composition and fine structure of *Saccharomyces cerevisiae* during ascus formation. *J. Bact.*, 11:373-386, 1973.
33. LUTLEY, M. & WILSON, I. M. — Development and fine structure of ascospores in the marine fungus *Ceriosporopsis halima*. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 58:393-402, 1972a.
34. LUTLEY, M. & WILSON, I. M. — Observations on the fine structure of ascospores of marine fungi: *Halosphaeria appendiculata*, *Torpedospora radiata* and *Corollospora maritima*. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 59:219-227, 1972b.
35. LYNN, R. R. & MAGEE, P. T. — Development of the spore wall during ascospore formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Biol.*, 44:688-692, 1970.

36. MADELIN, M. F. — The genesis of spores of higher fungi. In *The fungus spore*. London, Butterworth Press. p. 15-36, 1967.
37. MAINWARING, H. R. — The role of endoplasmic reticulum in ascomycete spore delimitation. *J. Cell Biol.*, 35:36A-87A, 1967.
38. MAINWARING, H. R. — The fine structure of ascospore wall formation in *Sordaria fimicola*. *Arch. Mikrobiol.*, 81:126-135, 1972.
39. MARQUARDT, H. — Elektronenoptische untersuchungen über die Ascosporenbildung bei *Saccharomyces cerevisiae* unter cytologischem und cytogenetischem Aspekt. *Arch. Mikrobiol.*, 46:308-320, 1963.
40. McCULLY, E. K. & BRACKER, C. E. — Apical vesicles in growing bud cells of heterobasidiomycetous yeasts. *J. Bact.*, 109:922-926, 1972.
41. MOENS, P. B. — Fine structure of ascospore development in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Can. J. Microbiol.*, 17:507-510, 1971.
42. MOENS, P. B. & RAPPORTE, E. — Spindles, spindle plaques, and meiosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Hansen). *J. Cell. Biol.*, 50:344-361, 1971.
43. MOLLENHAUER, H. H. & MORRÉ, D. J. — Golgi apparatus and plant secretion. *A. Rev. Pl. Physiol.*, 17:27-46, 1966.
44. MOOR, H. — Endoplasmic reticulum as the initiator of bud formation in yeast (*S. cerevisiae*). *Arch. Mikrobiol.*, 57:135-146, 1967.
45. MOORE, R. T. — Fine structure of Mycota. 1. Electron microscopy of the discomycete *Ascodesmis*. *Nova Hedwigia*, 5:263-278, 6 pl.
46. MOORE, R. T. — The ultrastructure of fungal cells. In AINSWORTH, G. C. & SUSSMAN, A. S., ed. *The fungi: an advanced treatise*. New York, Academic Press. v. 1, p. 95-118, 1965.
47. MOORE, R. T. & McALEAR, J. H. — Fine structure of Mycota. Reconstruction from skipped serial sections of the nuclear envelope and its continuity with the plasma membrane. *Expl. Cell Res.*, 24:588-592, 1961.
48. MOORE, R. T. & McALEAR, J. H. — Observations on ascospore initiation in the Discomycete *Dasyascyphus* sp. *J. gen. Microbiol.*, 28:211-213, 1962.
49. MORRÉ, D. J.; MOLLENHAUER, H. H. & BRACKER, C. E. — Origin and continuity of Golgi apparatus. In REINERT, J. & URSPRUNG, H., ed. *Origin and continuity of cell organelles*. Berlin, Springer-Verlag. v. 2, p. 82-126. (Results and problems in cell differentiation: a series of topical volumes in developmental biology), 1971.
50. MUNDKUR, B. — Electron microscopical studies of冻干酵母. III. Formation of the tetrad in *Saccharomyces*. *Expl. Cell Res.*, 25:24-40, 1961.
51. OSO, B. A. — Electron microscopy of ascus development in *Ascobolus*. *Ann. Bot.*, 33:205-209, 1969.
52. PLURAD, S. B. — Fine structure of ascosporegenesis in *Nematospora coryli* Peglion, a pathogenic yeast. *J. Bact.*, 109:927-929, 1972.
53. REEVES, F., Jr. — The fine structure of ascospore formation in *Pyronema domesticum*. *Mycologia*, 59:1018-1033, 1967.
54. RUDOLPH, E. D. & GIESY, R. M. — Electron microscope studies of lichen reproductive structures in *Physcia aipolia*. *Mycologia*, 58:786-796, 1966.
55. SCHRANTZ, J. P. — Contribution à l'étude de la formation de la paroi sporale chez *Pustularia cupularis* (L.) Fuck. *C. r. Acad. Sc. Paris: série D*, 262:1212-1215, 1966.
56. SCHRANTZ, J. P. — Présence d'un aster au cours des mitoses de l'asque et de la formation des ascospores chez l'Ascomycète *Pustularia cupularis* (L.) Fuck. *C. r. Acad. Sc. Paris: série D*, 264:1274-1277, 1967.
57. SCHRANTZ, J. P. — Etude cytologique, en microscopie optique et électronique de quelques Ascomycètes. II. La paroi. *Rev. Cytol. Biol. vég.*, 33:111-168, 1970.
58. SCHRANTZ, J. P. — Etude cytologique, en microscopie optique et électronique de quelques Ascomycètes. III. Le cytoplasme. *Rev. Cytol. Biol. vég.*, 34:1-48, 1971.
59. SYROP, M. J. & BECKETT, A. — The origin of ascospore-delimiting membranes in *Thaphrina deformans*. *Arch. Mikrobiol.*, 86:185-191, 1972.
60. TANAKA, K. & CHANG, S. T. — Cytoplasmic vesicles in the growing hyphae of the basidiomycete, *Volvariella volvacea*. *J. gen. appl. Microbiol.*, 18:165-179, 1972.
61. WELLS, K. — Light and electron microscopic studies of *Ascobolus stercorarius*. I. Nuclear divisions in the ascus. *Mycologia*, 62:761-790, 1970.
62. WELLS, K. — Light and electron microscopic studies of *Ascobolus stercorarius*. II. Ascus and ascospore ontogeny. *Univ. Calif. Publs Bot.*, 62:1-93, 1972.
63. WHALEY, W. G.; DAUWALDER, M. & KEPHART, J. E. — Assembly, continuity and exchanges in certain cytoplasmic membrane systems. In REINERT, J. & URSPRUNG, H. ed. *Origin and continuity of cell organelles*. Berlin, Springer-Verlag. v. 2, p. 1-45 (Results and problems in cell differentiation: a series of topical volumes in developmental biology), 1971.
64. WILSENACH, R. & KESSEL, M. — The role of lamosomes in wall formation in *Penicillium vermiculatum*. *J. gen. Microbiol.*, 40:401-404, 1965.
65. YOO, B. Y.; CALLEJA, G. B. & JOHNSON, B. F. — Ultrastructural changes of the fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) during ascospore formation. *Arch. Mikrobiol.*, 91:1-10, 1973.
66. ZICKLER, D. — Division spindle and centrosomal plaques during mitosis and meiosis in some Ascomycetes. *Chromosoma*, 30:287-304, 1970.

## Padrões bacteriológicos de alimentos portugueses\*

A.M.R. Ribeiro

### **Resumo**

Revisão dos padrões bacteriológicos portugueses para alimentos, propostos pela Sociedade Portuguesa Veterinária de Higiene Alimentar. Instruções para coleta de amostras e de métodos de amostragem para os diferentes tipos de alimentos, de acordo com o sistema de empacotamento empregado e referências aos métodos de análise bacteriológica recomendados para alimentos. Proposição de padrões para alimentos brutos e processados, tanto de origem vegetal como animal.\*\*

### **Summary**

#### *Portuguese standards for foods*

Revision of the Portuguese bacteriological standards for foods as proposed by the Sociedade Portuguesa Veterinária de Higiene Alimentar. Instructions for sample collection and sampling methods for different kind of foods, according to the packaging system employed and references to recommended methods for bacteriological analysis of foods. Proposed standards for raw and processed foods both of plant and animal origin.\*\*

### **Introdução**

Embora a necessidade de fixar normas bacteriológicas de qualidade para os alimentos fosse imposta por razões do domínio da saúde pública, a indústria compreendeu rapidamente que estas normas tinham um reflexo favorável sobre a produção e que, juntamente com a aplicação de programas de "food plant sanitation" essas normas desempenhavam um papel primordial no aumento de produtividade e mesmo na promoção de vendas.

Há, todavia, numerosas dificuldades a vencer a começar nos métodos e técnicas de análise; espera-se do labor dos peritos da F.A.O. e O.M.S. da Comissão do Codex Alimentarius que um dia todos os laboratórios do Mundo possam trabalhar do mesmo modo, produzindo, portanto, resultados comparáveis. Mas, dentro de cada País ou grupos de países, levantam-se outras dificuldades relacionadas com o grau de desenvolvimento, os hábitos da população e o clima. Assim, as normas bacteriológicas a propor devem ser realistas e ter em conta os condicionalismos que afetam cada produto num determinado país; de outro modo, não serão aplicáveis e desacreditam-se.

Estas normas, inicialmente experimentais, devem ser, em primeiro lugar, aplicadas a um número reduzido de alimentos, considerados como os mais importantes, e fixarão níveis de qualidade bacteriológica que possam ser atingidos pela maioria dos produtores válidos. Assim, o plano de aplicação deve ser pré-estabelecido e cuidadosamente regulado; se se tomarem estes cuidados, a operação será um sucesso que se estenderá a outros produtos e conduzirá a produção a níveis de qualidade progressivamente mais elevados.

As normas bacteriológicas de alimentos interessam, portanto, os consumidores e as associações de consumidores, os serviços de saúde pública e a indústria e o comércio de alimentos. O interesse deste assunto justifica assim que se continue a trabalhar para que um dia os produtos alimentares trocados entre todos os países do mundo obedeçam às mesmas normas bacteriológicas fixadas por uma autoridade internacional. Isto será a cúpula, talvez ainda longínqua, do trabalho começado na primeira metade do Século, na senda de Pasteur, pelos investigadores pioneiros da bacteriologia de alimentos a quem prestamos homenagem.

\* Propostos pela Sociedade Portuguesa Veterinária de Higiene Alimentar e coligidos pelo autor do presente trabalho, da Escola Superior de Medicina Veterinária, Lisboa, Portugal.

\*\* Preparado por Mauro F.F. Leitão.

A presente contribuição é o resultado de um trabalho de análise do que tem sido publicado sobre esta matéria, adaptado às condições do País pelos veterinários portugueses higienistas de alimentos. Foi ainda largamente informada pelos resultados de análises bacteriológicas de alimentos efetuados nestes últimos 19 anos. Para a maior parte dos gêneros alimentícios, as normas são ainda experimentais, para orientar a produção; a sua aplicação com força de Lei será feita por fases. Estas normas são ainda um útil instrumento de trabalho a utilizar sem rigidez pelos inspetores de alimentos, na interpretação dos boletins de análise fornecidos pelos laboratórios a que recorrem.

### Métodos

#### Amostragem

Adoptou-se um procedimento proposto como Norma Portuguesa (1) para certos produtos e que supõe a adoção das definições de:

*Unidade* — Quantidade de alimentos contida num recipiente.

*Lote* — Unidade ou conjunto de unidades da mesma natureza e com aspecto uniforme.

*Partida* — Lote ou conjunto de lotes, pelos quais é responsável uma mesma entidade.

*Amostra* — Unidade ou fração de unidade, representando as propriedades e a composição do lote.

Se a partida é constituída por uma unidade ou por várias unidades consideradas idênticas, será identificada com um lote.

Se a partida é constituída por unidades diferentes ou que se suspeita serem diferentes na qualidade, origem, aspecto ou natureza dos recipientes, deverá ser dividida em vários lotes, agrupando unidades com as mesmas características.

Cada lote será objeto de uma recolha de três amostras de 100g.

Tabela 1

Amostragem de unidades em recipientes não estanques ou de capacidade superior a  $1\text{dm}^3$

Número de unidades que constituem o lote	Número de unidades a separar para amostragem
1	1
2 a 5	2
6 a 60	3
61 a 80	4
81 a 100	5
> 100	5 + n

n = 1 para cada centena ou fração de centena a mais

Se o lote é constituído por unidades contidas em recipientes não estanques ou de capacidade superior a  $1\text{dm}^3$ , separa-se ao acaso o número de unidades indicadas na Tabela 1.

Cada unidade será homogeneizada, quando necessário, com um agitador, no recipiente respectivo. Colhe-se, de cada uma, com cuidados de assepsia e com os instrumentos adequados para cada produto, a respectiva parte alíquota de 300g, que se distribui em partes iguais por três recipientes estanques, rolhados.

Se o lote for constituído por unidades contidas em recipientes estanques e de capacidade não superior a  $1\text{dm}^3$ , separa-se, ao acaso, o número de unidades indicadas na Tabela 2.

Tabela 2

Amostragem de unidades em recipientes estanques de capacidade não superior à  $1\text{dm}^3$

Número de unidades que constituem o lote	Número de unidades a separar para amostragem
1	1
2	2
3 a 100	3
101 a 1000	6
1001 a 10 000	12
> 10 000	12 + n

n = 1 para cada dezena de milhar ou fração de dezena de milhar a mais.

Se o número de unidades separadas é de três, estas constituirão diretamente as amostras. Se não é, proceder como nos casos anteriores.

Se o conteúdo total das unidades separadas é inferior a 300g, cada amostra terá um peso inferior a 100g mas que seja igual a um terço do conteúdo disponível.

As provas de incubação de conservas e semi-conservas devem ser realizadas apenas nos recipientes intactos e devem incidir sobre a totalidade das unidades separadas do lote menos uma e, pelo menos, sobre três. As amostras para ulterior análise serão colhidas dos recipientes não abertos que suportaram estas provas.

Todo o material que contacte com o produto a analisar deve estar estéril. Quando os gêneros alimentícios não forem microbiologicamente estáveis (é o caso dos produtos frescos e rapidamente perecíveis e das águas), as amostras devem ser refrigeradas para serem mantidas em condições que impeçam o desenvolvimento microbiano sem obstar a viabilidade das células, até ao momento da análise, a qual será efetuada no prazo mais curto possível. Em certos casos (água livre) apesar da refrigeração, a análise

se não poderá ser realizada mais tarde que 24 horas após a coleta. A segunda e a terceira amostras destes gêneros serão guardadas nestas condições para servirem, se necessário, para análises de recurso.

Quando a coleta não é feita pelas autoridades legais para efeito de eventual procedimento judicial, não é indispensável a tomada de três amostras.

### Técnicas de Análise

Salvo para as provas de esterilidade, para a pesquisa de *Salmonella*, de toxina botulínica e para os produtos líquidos, as tomadas para análise, de massa nunca inferior a 30g, são homogeneizadas em soluto fisiológico com triptona a 1% em aparelho Waring Blender.

Escolhem-se as determinações mais adaptadas a cada gênero alimentício ou grupo de gêneros. São do conhecimento geral dos bacteriologistas de alimentos, e o seu valor tem sido confirmado apenas com uma exceção, com respeito a *Streptococcus* do grupo D, considerados testemunhos muito discutíveis de contaminação fecal.

As técnicas seguidas são largamente inspiradas pelo ensino do C.E.R.B.A. (Centre d'Enseignement et Recherches de Bactériologie Alimentaire) do Instituto Pasteur de Lille. Estão agrupadas numa publi-

cação provisória para uso dos laboratórios portugueses<sup>2</sup>, sendo também utilizadas técnicas descritas por Mossel & col.<sup>3</sup>. Para a contagem e caracterização de *Staphylococcus* coagulase-positiva sempre se utiliza o meio de Baird-Parker<sup>4</sup>. Vários repositórios de métodos em uso nos Estados Unidos<sup>5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13</sup> devem ser consultados.

Para a pesquisa de bactérias patogênicas e de toxinas, seguem-se as técnicas recomendadas por Buttiaux & col.<sup>14</sup> e, no que se refere a *Vibrio parahaemolyticus*, a de Sakazaki<sup>15</sup>.

### Apreciação dos Resultados

As normas propostas constam das Tabelas 1 a 16. Para efeito do controle de produção e, numa fase inicial, deve considerar-se satisfatória a situação quando três de cinco amostras do mesmo produto, colhidas em tempos diferentes, estejam conforme as normas estabelecidas e as restantes duas não contenham microrganismos patogênicos e toxinas, e as determinações de bactérias não patogênicas não ultrapassem, na média, os valores fixados de mais de um ciclo logarítmico, tolerando-se ainda que dois destes valores excedam a norma em dois ciclos logarítmicos.

### Referências Bibliográficas

1. Inspecção-Geral dos Produtos Agrícolas Industriais — Norma Provisória NP 402, Leite-Colheita de amostras Ed. Repartição de Normalização, Lisboa, Portugal, 1966.
2. RIBEIRO, A.M.R.; ÁGUAS, J.P.M. & QUINTA, MARIA L. — Técnicas de Análise Microbiológica de Alimentos. Ed. Instituto Nacional de Investigação Industrial, Lisboa, Portugal, 1967.
3. MOSSEL, D.A.A.; BECHET, J. & LAMBION, R. — La Prévention des Infections et des Toxi-infections Alimentaires. Ed. Coopérative d'Édition pour les Industries Alimentaires, Bruxelles, Bélgica, 1962.
4. BAIRD-PARK, A.C. — The use of sulphamezathine for inhibiting *Proteus spp* on Baird-Parker Isolation Medium for *Staphylococcus aureus* — J. Applied Bacteriology 27, 78, 1964.
5. American Bottlers of Carbonated Beverages — Suggested bacteriological test methods for granulated and liquid sugar (and tentative standards). American Bottlers of Carbonated Beverages, Washington, D.C., E.U.A., 1952-53.
6. American Dry Milk Institute, Inc. — The grading of dry whole milk and sanitary and quality standards. Bull. 913 (rev.), E.U.A., 1955.
7. American Dry Milk Institute, Inc. — The grading of nonfat dry milk solids and sanitary and quality standards. Bull. 911 (rev.), E.U.A.; 1954.
8. American Public Health Association — Recommended methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association, New York, E.U.A., 1958.
9. American Public Health Association — Standard methods for the examination of dairy products, 11 th ed. American Public Health Association, New York, E.U.A., 1960.
10. American Public Health Association — Standard methods for the examination of water and wastewater, 11 th ed. American Public Health Association, New York, E.U.A., 1960.
11. American Public Health Association — Recommended procedures for the bacteriological examination of sea water and shellfish. 3rd ed. American Public Health Association, New York, E.U.A., 1962.
12. Association of Official Agricultural Chemists. Official (and tentative) methods of analysis. Various editions. Association of Official Agricultural Chemists, Washington, D.C., E.U.A.
13. U.S. Public Health Service — Training course manual-food microbiology. Robert A. Taft Sanitary Engineering Center, Cincinnati, Ohio, E.U.A., 1964.
14. BUTTIAUX, R.; BEERENS, H. & TACQUET, A. — Manuel de Techniques Bactériologiques. Ed. Flammarion, Paris, França, 1969.
15. SAKAZAKI, R. — Vibrio parahaemolyticus. Ed. Fujino e Fukumi, Toquio, Japão, 1967.

## Padrões bacteriológicos de alimentos portugueses — 1

	Águas	Refrigerantes	Sumos e polpas de frutos
Microrganismos mesófilos por ml	$10^2$ (a, b)	$10^2$	$10^3$ (c)
Microrganismos psicrotróficos por ml	—	—	$10^4$
Bolores e leveduras por ml	—	—	10
Esporos de clostrídeos sulfito-redutores ( $44^\circ\text{C}$ ) ausentes em	20ml (d)	20ml	—
Bactérias coliformes ausentes em	100ml	10ml	0,1ml
<i>Escherichia coli</i> ausente em	100ml	100ml	1ml
<i>Streptococcus</i> do grupo D ausentes em	10ml	20ml	0,1ml
<i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva ausentes em	—	—	10ml
<i>Salmonella</i> ausentes em	—	—	100ml
Pesquisa de outras bactérias patogênicas e de toxinas	Negativa (d)	Negativa (e)	Negativa (e)
Provas de incubação (9 dias a $55^\circ\text{C}$ e 20 dias a $30^\circ\text{C}$ )	—	—	Negativas (f)
Provas de esterilidade	—	—	Negativas (f)
Exame microscópico — (esfregaço de 0,01ml em $1\text{cm}^2$ , objetiva 100)	—	—	Menos que 20 microrganismos em 40 campos
Exame microscópico, técnica de Howard, % de campos positivos	—	—	Menos que 40

- (a) — Não aplicável a águas de mesa e minerais.  
 (b) — Em águas destinadas a fins tecnológicos alimentares, 10ml.  
 (c) — Apenas aplicável a sumos de frutos não esterilizados, habitualmente concentrados e congelados.  
 (d) — Em águas destinadas a fins tecnológicos alimentares, ausentes em 100ml.  
 (e) — Apenas pesquisado em casos especiais.  
 (f) — Apenas aplicável a sumos de frutos esterilizados.  
 (g) — Apenas aplicável a concentrado de tomate.

## Padrões bacteriológicos de alimentos portugueses — 2

	Leite crú para leite pasteurizado especial	Leite pasteurizado especial	Natas pasteurizadas
Microrganismos mesófilos por ml	$5 \times 10^4$	$5 \times 10^3$	$3 \times 10^4$
Microrganismos termo-resistentes por ml	$10^3$	—	—
Esporos de <i>Clostridium</i> método de Weinzirl ausentes em	15ml	—	—
Bactérias coliformes ausentes em	0,001ml	1ml	1ml
Pesquisa de bactérias patogênicas e de toxinas	Negativa (a)	Negativa (a)	Negativa (a)
Contagem microscópica de bactérias, método de Breed (0,01ml espalhado em $1\text{cm}^2$ , objetiva 100)	Não mais que 10 em 10 campos	Não mais que 10 por 10 campos	Não mais que 10 por 10 campos
Tempo de redutase	Mais que 5 horas e 30 minutos		

(a) — Só se pesquisa em casos especiais.

## Padrões bacteriológicos de alimentos portugueses — 3

	Leite para consumo direto (crú)	Leite crú para leite pasteurizado corrente	Leite pasteurizado corrente
Microrganismos mesófilos por ml	$1,5 \times 10^6$	$2 \times 10^6$	$3 \times 10^4$
Microrganismos termo-resistentes por ml	—	$10^4$	—
Esporos de <i>Clostridium</i> método de Weinzirl ausentes em	—	5ml	—
Bactérias coliformes ausentes em	0,00001ml	0,00001ml	1ml
Pesquisa de bactérias patogênicas e de toxinas	Negativa (a)	Negativa (a)	Negativa (a)
Contagem microscópica de bactérias, método de Breed (0,01ml espalhado em $1\text{cm}^2$ , objetiva 100)	Menos que 100 em 10 campos	Menos que 100 em 10 campos	Menos que 100 em 10 campos
Tempo de redutase	Mais que 2 horas e 30 minutos	Mais que 2 horas e 30 minutos	Mais que 2 horas e 30 minutos

(a) — Só se pesquisa em casos especiais.

## Padrões bacteriológicos de alimentos portugueses — 4

	Gelados	Iogurte	Queijo pasteurizado fresco
Microrganismos mesófilos por ml	$10^5$	—	—
Microrganismos psicrotróficos por ml	$10^6$	—	—
Bolores e leveduras por ml	500 (a)	$10^2$ (a)	$10^3$ (a)
Bactérias coliformes ausentes em	0,01ml	1ml	0,1ml
<i>Escherichia coli</i> ausente em	1ml	1ml	—
<i>Staphylococcus coagulase-positiva</i> ausentes em	0,1ml	—	—
<i>Salmonella</i> ausentes em	25ml	—	—
Pesquisa de flora ativa	—	Positiva	—
Pesquisa de bactérias patogênicas e de toxinas	Negativa (b)	Negativa (b)	Negativa (b)
Exame microscópico — (objetiva 100) ( <i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> )	—	Mais de 15 cadeias de cada por campo	—
Exame microscópico, método de Breed (0,01ml espalhados em $1\text{cm}^2$ , objetiva 100)	Menos que 15 em 10 campos	—	—

(a) — Não mais de 10% de bolores.

(b) — Apenas se pesquisa em casos especiais.

## Padrões bacteriológicos de alimentos portugueses — 5

	Queijo curado	Queijo pasteurizado fundido	Manteiga pasteurizada
Microrganismos mesófilos por grama	—	$10^3$	—
Bolores e leveduras por grama	—	10 (a)	100 (a)
Esporos de <i>Clostridium</i> método de Weinzirl ausentes em	—	1g	—
Esporos de clostrídeos sulfito-redutores ( $44^\circ\text{C}$ ) ausentes em	0,1 g	1g	0,1 g
Microrganismos lipolíticos por grama	—	—	200
Microrganismos proteolíticos por grama	—	—	50
Bactérias coliformes ausentes em	1g	1g	1g
<i>Staphylococcus coagulase-positiva</i> ausentes em	2g	2g	2g
<i>Salmonella</i> ausentes em	25g	25g	25g
Pesquisa de outras bactérias patogênicas e de toxinas	Negativa (b)	Negativa (b)	Negativa (b)
Provas de incubação (9 dias a $55^\circ\text{C}$ e 20 dias a $30^\circ\text{C}$ )	—	Negativas (c)	Negativas (c)

(a) — Não mais de 10% de bolores.

(b) — Apenas se pesquisa em casos especiais.

(c) — Apenas aplicável a embalagens herméticas.

## Padrões bacteriológicos de alimentos portugueses — 6

	Margarina	Ovos inteiros (na casca)	Ovos partidos (gema e clara)
Microrganismos mesófilos por grama	$10^2$	$10^3$	$10^5$
Bolores e leveduras por grama	10 (a)	$10^3$	$10^2$
Microrganismos ovolíticos por grama	—	$10^2$	$10^3$
Microrganismos lipolíticos por grama	10	—	—
Esporos de clostrídeos sulfito-redutores ( $44^\circ\text{C}$ ) ausentes em	1g	—	—
Bactérias coliformes ausentes em	1g	0,1g	0,1g
<i>Escherichia coli</i> ausente em	10g	1g	1g
<i>Streptococcus</i> do grupo D ausentes em	1g	0,01g	0,01g
<i>Staphylococcus coagulase-positiva</i> ausentes em	2g	2g	2g
<i>Salmonella</i> ausentes em	25g	50g	100g
Pesquisa de outras bactérias patogênicas e de toxinas	Negativa (b)	Negativa (b)	Negativa (b)

(a) — Não mais de 10% de bolores.

(b) — Só se pesquisa em casos especiais.

## Padrões bacteriológicos de alimentos portugueses — 7

	Pescado cru (a)	Pescado cozido	Pescado preservado pronto a comer
Microrganismos mesófilos por grama	$10^5$	$10^4$	$10^4$
Microrganismos psicrotróficos por grama	$10^6$	$10^5$	$10^5$
Bolores e leveduras por grama	$10^3$	$10^3$	$10^4$
Bactérias coliformes ausentes em	0,01g	0,1g	0,1g
<i>Escherichia coli</i> ausente em	0,1g	1g	1g
<i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva ausentes em	0,01g	0,1g	1g
<i>Salmonella</i> ausentes em	25g	25g	25g
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ausente em	5g	10g	5g
Pesquisa de outros microrganismos patogênicos e de toxinas	Negativa (b)	Negativa (b)	Negativa

(a) — Amostra colhida em músculos profundos, sem contacto com vísceras, não comportando pele.  
 (b) — Apenas se pesquisa em casos especiais.

## Padrões bacteriológicos de alimentos portugueses — 8

	Carnes frescas em carcaça (a)	Carnes em peças de talho (a)	Carnes pré-embaladas e picadas
Microrganismos mesófilos por grama	$10^4$	$10^5$	$10^6$
Microrganismos psicrotróficos por grama	$10^5$	$10^6$	$10^6$
Esporos de clostrídeos sulfito-redutores ( $44^\circ\text{C}$ ) ausentes em	0,1g	0,1g	0,1g
Bactérias coliformes ausentes em	0,01g	0,01g	0,001g
<i>Escherichia coli</i> ausente em	0,1g	0,1g	0,01g
<i>Streptococcus</i> do grupo D ausentes em	0,001g	0,001g	0,0001g
<i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva ausentes em	0,01g	0,01g	0,01g
<i>Salmonella</i> ausentes em	25g	25g	25g
Pesquisa de outros microrganismos patogênicos e de toxinas	Negativa (b)	Negativa (b)	Negativa (b)

(a) — Salvo indicação em contrário, a coleta é feita na profundidade das massas tissulares.  
 (b) — Só se pesquisa em casos especiais.

## Padrões bacteriológicos de alimentos portugueses — 9

	Enchidos crus, não curados	Carnes e enchidos curados a frio	Carnes e enchidos tratados pelo calor (fumados ou cozidos)	Salsicharia cortada embaladas no vácuo
Microrganismos mesófilos por grama	$10^6$ (a)	—	$10^5$	$10^6$ (b)
Microrganismos psicrotróficos por grama	—	—	—	$10^6$ (b)
Esporos de clostrídeos sulfito-redutores ( $44^\circ\text{C}$ ) ausentes em	0,01g	0,01g	0,01g	0,1g
Bactérias coliformes ausentes em	0,001g	0,001g	0,01g	0,01g
<i>Escherichia coli</i> ausente em	0,01g	0,1g	1g	0,1g
<i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva ausentes em	0,01g	0,01g	2g	2g
<i>Streptococcus</i> do grupo D ausentes em	—	—	0,001g	0,0001g (a)
<i>Salmonella</i> ausentes em	25g	25g	25g	25g
Pesquisa de outros microrganismos patogênicos e de toxinas	Negativa (c)	Negativa (c)	Negativa (c)	Negativa (c)

(a) — Não aplicável a salsichas fermentadas.  
 (b) — Apenas aplicável a produtos processados a quente.  
 (c) — Só se pesquisa em casos especiais.

## Padrões bacteriológicos de alimentos portugueses — 10

	Fruto frescos	Legumes	Pickles pasteurizados
Microrganismos mesófilos por grama	$10^4$	$10^5$	$10^4$
Microrganismos psicrotróficos por grama	$10^5$	$10^6$	—
Microrganismos pectinolíticos ausentes em	—	—	1g
Bolores e leveduras por grama	$10^3$	$10^4$	$10^2$
Esporos de <i>Clostridium</i> ausentes em	—	—	1g
Esporos de clostrídeos sulfito-redutores ( $44^\circ\text{C}$ ) ausentes em	—	—	1g
<i>Escherichia coli</i> ausente em	1g	0,1	—
<i>Streptococcus</i> do grupo D ausentes em	—	—	0,1g
<i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva ausentes em	2g	2g	2g
<i>Salmonella</i> ausentes em	25g	25g	25g
Pesquisa de outros microrganismos patogênicos e de toxinas	Negativa (a)	Negativa (a)	Negativa (a)
Provas de incubação (9 dias a $55^\circ\text{C}$ e 20 dias a $30^\circ\text{C}$ )	—	—	Negativas (b)

(a) — Só se pesquisa em casos especiais.

(b) — Apenas aplicável a produtos enlatados ou em boiões de vidro com cápsulas estanques.

## Padrões bacteriológicos de alimentos portugueses — 11

	Condimentos desidratados	Extratos de condimentos e aromatas
Microrganismos mesófilos por grama	$10^4$ (a)	10
Esporos de bactérias aeróbias por grama	$10^4$ (a)	1
Bolores e leveduras por grama	$10^3$ (a)	1
Esporos de clostrídeos sulfito-redutores ( $44^\circ\text{C}$ ) ausentes em	0,1g	2g
<i>Clostridium nigrificans</i> ausente em	2g	2g
<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i> ausente em	2g	2g
Bactérias coliformes ausentes em	0,1g	1g
<i>Escherichia coli</i> ausente em	1g	5g
<i>Streptococcus</i> do grupo D ausentes em	0,1g	1g
<i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva ausentes em	2g	2g
<i>Salmonella</i> ausentes em	50g	50g
Pesquisa de outras bactérias patogênicas e de toxinas	Negativa (b)	Negativa (b)

(a) — Não aplicável a produtos esterilizados em que se tolera o máximo de 5/g.

(b) — Pesquisar apenas em casos especiais.

## Padrões bacteriológicos de alimentos portugueses — 12

	Açúcar e féculas	Sal higienizado	Aditivos e sal refinado
Microrganismos mesófilos por 10 gramas	200 (a)	50 (b)	10
Microrganismos termo-resistentes termófilos por 10 gramas	125 (b)	5 (b)	5
Esporos de bactérias agentes do "flat-sour" por 10 gramas	50 (b)	—	—
Bolores e leveduras por 10 gramas	10 (a)	20 (c)	20
Pesquisa de esporos de <i>Clostridium nigrificans</i> em 5 tubos semeados com 10 gramas	Negativa	—	—
Pesquisa de esporos de <i>Clostridium thermosacharolyticum</i> em 5 tubos semeados com 10 gramas	Negativa	—	—
Esporos de clostrídeos sulfito-redutores ( $44^\circ\text{C}$ ) ausentes em	1g	2g	—
Esporos de <i>Bacillus</i> gasógenos ausentes em	—	—	10g (b)
Esporos de <i>Clostridium</i> ausentes em	—	—	10g (b)
Bactérias agentes do vermelho ausentes em	—	2g	10g (d)
Bolores agentes do empoadado ausentes em	—	2g	10g (d)
<i>Escherichia coli</i> ausente em	1g	—	—
<i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva ausentes em	—	2g	—
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ausente em	10g (d)	—	—
Pesquisa de outras bactérias patogênicas e de toxinas	Negativa (e)	Negativa (e)	Negativa (e)

continuação da tabela anterior

- (a) — Para as indústrias de bebidas e refrigerantes; nos restantes casos, toleram-se  $10^3$ /g de bactérias e  $10^2$ /g de fungos.
- (b) — Apenas para as indústrias de conservas. Nos restantes casos, toleram-se  $10^3$ /g. Os valores referem-se à média de 5 amostras em nenhuma das quais se toleram mais de 150 termófilos e 75 "Flat Sour".
- (c) — Apenas para as indústrias de conservas e de lacticínios. Nos restantes casos, toleram-se  $10^2$ /g.
- (d) — Apenas se aplica ao açúcar.
- (e) — Só se pesquisa em casos especiais.

Padrões bacteriológicos de alimentos portugueses — 13

	Pratos cozinhados congelados	Alimentos prontos a comer não cozidos	Alimentos prontos a comer cozidos
Microrganismos mesófilos por grama	$10^5$ (a)	$10^5$	$10^4$
Microrganismos psicrotróficos por grama	$10^6$ (a)	$10^6$	$10^5$
Esporos de bactérias aeróbias por grama	$10^4$	—	$10^4$
Bolores e leveduras por grama	$10^4$	$10^4$	$10^3$
Esporos de clostrídeos sulfito-redutores ( $44^\circ\text{C}$ ) ausentes em	0,1g	0,01g	0,1g
Bactérias coliformes ausentes em	0,01g	0,01g	0,1g
<i>Escherichia coli</i> ausente em	0,1g	0,1g	1g
<i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva ausentes em	0,01g	0,01g	0,1g
<i>Streptococcus</i> do grupo D ausentes em	—	0,001g	0,01g
<i>Salmonella</i> ausentes em	25g	25g	25g
Pesquisa de outros microrganismos patogênicos e de toxinas	Negativa (b)	Negativa (b)	Negativa (b)

(a) — Apenas aplicável a produtos cozidos.

(b) — Pesquisar apenas em casos especiais.

Padrões bacteriológicos de alimentos portugueses — 14

	Conservas (alimentos esterilizados)	Semi-conservas	Carnes e pescado salgados
Microrganismos mesófilos por grama	—	$10^3$ (a)	$10^5$
Microrganismos psicrotróficos por grama	—	$10^4$ (a)	—
Bolores e leveduras por grama	—	100 (b)	$10^5$
Esporos de <i>Bacillus</i> gasógenos ausentes em	—	1g (c)	—
Esporos de clostrídeos sulfito-redutores ( $44^\circ\text{C}$ ) ausentes em	—	0,1g	0,01g
Bactérias coliformes ausentes em	—	1g	—
Bactérias agentes do "vermelho" ausentes em	—	—	0,001g
Bolores agentes do "empoado" ausentes em	—	—	0,001g
<i>Streptococcus</i> do grupo D ausentes em	—	0,1g	—
<i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva ausentes em	—	2g	2g
<i>Salmonella</i> ausentes em	—	25g	25g
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ausente em	—	10g (d)	—
Pesquisa de outras bactérias patogênicas e de toxinas	Negativa (e)	Negativa (e)	Negativa (e)
Provas de incubação	—	Negativas (f)	—
Provas de incubação (9 dias a $55^\circ\text{C}$ e 30 dias a $30^\circ\text{C}$ )	Negativas	—	—
Provas de esterilidade	Negativas (g)	Negativas (g)	—
Exame microscópico (esfregaço por impressão, objetiva 100)	Menos que 20 bactérias por 10 campos (h)	Menos que 40 bactérias por 10 campos (h)	—

(a) — Apenas aplicável a produtos tratados pelo calor e a leites condensados.

(b) — Apenas aplicável a leites condensados.

(c) — Apenas aplicável a fiambre e a carnes curadas enlatadas.

(d) — Apenas aplicável a produtos da pesca.

(e) — Só se pesquisa em casos especiais.

(f) — No caso de semi-conservados 3 dias a  $30^\circ\text{C}$  ou 2 dias a  $40^\circ\text{C}$ .

(g) — Toleram-se até 10 esporos por grama de Bacillaceae não patogênicas e não toxigenas.

(h) — Não aplicável a produtos fermentados.

## Padrões bacteriológicos de alimentos portugueses — 15

	Gêneros alimentícios pré-cozidos desidratados	Extratos de carnes e similares	Molhos (maionese, etc.)
Microrganismos mesófilos por grama	$10^3$	$10^4$	$10^4$
Esporos de bactérias aeróbias por grama	$10^3$	$10^3$	—
Bolores e leveduras por grama	10	$10^2$	10
Microrganismos lipolíticos ausentes em	—	—	1g
Esporos de clostrídeos sulfito-redutores ( $44^\circ\text{C}$ ) ausentes em	1g	0,1g	1g
Esporos de <i>Clostridium</i> ausentes em	—	—	1g
Bactérias coliformes ausentes em	0,1g	1g	0,1g
<i>Escherichia coli</i> ausente em	1g	—	1g
<i>Streptococcus</i> do grupo D ausentes em	0,1g	1g	0,01g
<i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva ausentes em	2g	2g	2g
<i>Salmonella</i> ausentes em	50g	25g	25g
Pesquisa de outros microrganismos patogênicos e de toxinas	Negativa (a)	Negativa (a)	Negativa (a)
Provas de incubação (9 dias a $55^\circ\text{C}$ e 20 dias a $30^\circ\text{C}$ )	—	Negativas (b)	Negativas (b)
Exame microscópico (esfregaço de 0,001g em $1\text{cm}^2$ , objetiva 100)	—	Menos que 20 bactérias em 10 campos.	Negativas (b)

(a) — Só se pesquisa em casos especiais.

(b) — Apenas aplicável a produtos enlatados, em boiões ou em bisnagas com cápsulas estanques.

## Padrões bacteriológicos de alimentos portugueses — 16

	Doces, concentrados de frutos e frutas secas	Gêneros alimentícios secos (humidade < 10%)	Gelatina alimentar
Microrganismos mesófilos por grama	$10^3$	$10^5$ (a)	$10^4$
Bolores e leveduras por grama	$10^2$ (a)	$10^3$	—
Esporos de <i>Bacillus</i> gasógenos ausentes em	1g (b)	—	1g
Esporos de bactérias aeróbias por grama	—	$10^4$	—
Esporos de <i>Clostridium</i> método de Weinzirl ausentes em	—	1g (b)	—
Esporos de <i>Clostridium</i> método de Rosenow ausentes em	—	—	1g
Esporos de clostrídeos sulfito-redutores ( $44^\circ\text{C}$ ) ausentes em	—	0,01g	1g
Bactérias coliformes ausentes em	—	0,1g (a)	0,1g
<i>Escherichia coli</i> ausente em	1g	1g	1g
<i>Streptococcus</i> do grupo D ausentes em	—	0,001g	0,1g
<i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva ausentes em	2g	2g	2g
<i>Salmonella</i> ausentes em	25g	25g	50g
<i>Clostridium nigrificans</i> ausente em	—	—	2g
<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i> ausente em	—	—	2g
Pesquisa de outras bactérias patogênicas e de toxinas	Negativa (c)	Negativa (c)	Negativa (c)
Provas de incubação (9 dias a $55^\circ\text{C}$ e 20 dias a $30^\circ\text{C}$ )	Negativas	—	—
Provas de esterilidade	Negativas (b)	—	—
Contagem microscópica de bolores, método de Howard			
percentagem de campos com fungos	Menos de 40% (d)	—	—

(a) — Não aplicável a frutas secas.

(b) — Apenas aplicável a produtos enlatados ou em boiões ou bisnagas com cápsulas estanques.

(c) — Apenas se pesquisa em casos especiais.

(d) — Aplicável a concentrados de tomate.

