

Volume 5 Número 2 Abr. - Jun. 1974

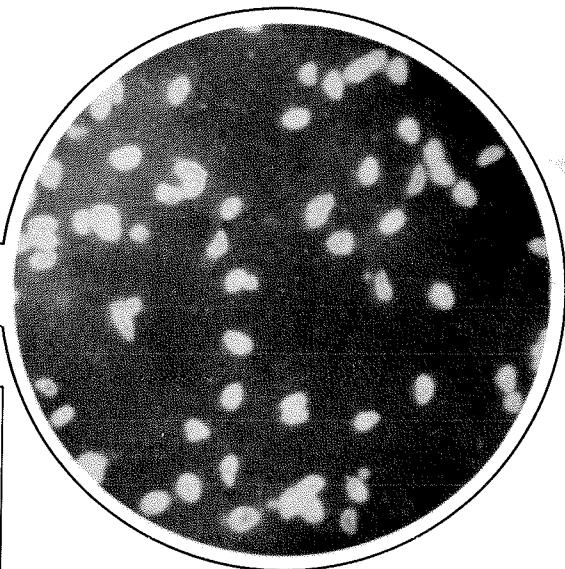
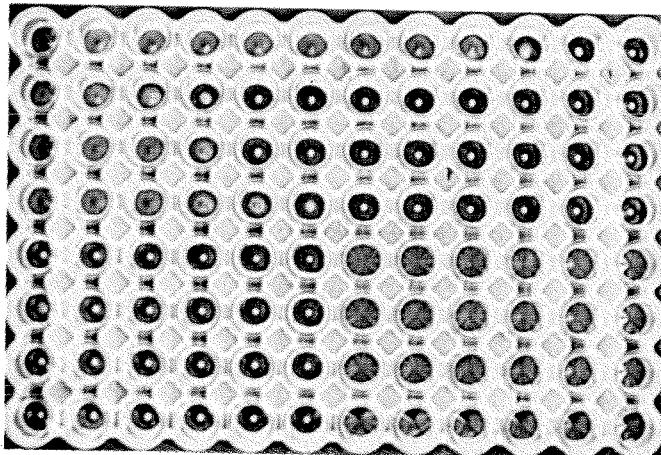
Revista de Microbiologia

Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo - Brasil

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo - Brasil

Da imunofluorescência

à aglutinação direta



Após a promoção do primeiro reagente para imunofluorescência, B-D MÉRIEUX inova hoje com um antígeno para aglutinação direta. Este novo método permite, pela sua simplicidade, uma despistagem mais ampla da afeção, e, associado à imunofluorescência, conduz a um diagnóstico mais completo e seguro, pelas informações complementares sobre a evolução da doença.

B-D MÉRIEUX

é o primeiro no diagnóstico da TOXOPLASMOSE

IMUNOFLUORESCÊNCIA

- Antígeno Toxoplasmico liofilizado
- Soro positivo de controle
- Tampão P B S
- Globulina anti-humana marcada pela fluoresceína
- Lâminas p/imunofluorescência

AGLUTINAÇÃO DIRETA

- Suspensão de Toxoplasmas
- Soro positivo de controle
- Tampão B A B S
- Placa descartável p/microtitulação
- Micropipeta

Documentação científica completa sob pedido



BIOLAB-MÉRIEUX-PRODUTOS PARA LABORATÓRIOS LTDA.

RUA DO RESENDE, 96-A - GR. 201 e 202 - TELS. 221-4089/242-0050 - ZC-06 20000 RIO DE JANEIRO GB
AVENIDA CASPER LÍBERO, 58 - GRUPO 1603 - TELEFONE 32-3655 0 1033 SÃO PAULO SP
AVENIDA W-3 - EDIFÍCIO JOSÉ SEVERO - SL. 5 - TELEFONE 24-5711 70000 BRASÍLIA DF
RUA VIGÁRIO JOSÉ INÁCIO, 399/902 - TELEFONE 25-5677 90000 PORTO ALEGRE RS
AV. AMARAL PEIXOTO, 207-ED. ALBERT SABIN-GR. 706-TELEFONE 722-0411 24000 NITERÓI RJ
PRAÇA DO DERBY 201 - TELEFONE 22-4755 50000 RECIFE PE



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, Horácio S. Jobim, 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 Castorillo (Manaus). BAHIA: Carlos Brenha 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 Luiz). MINAS GERAIS: Romain Rolland Golgher (Belo Horizonte). PARÁ: Zé 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 Falcão (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 Abril-Junho 1974 Número 2
Rev. Microbiol. (S. Paulo), 5(2)

CONTEÚDO – CONTENTS

Artigos originais

Características culturais, bioquímicas, sorológicas e virulência de amostras de <i>Salmonella typhimurium</i> fermentadoras de lactose [<i>Cultural, biochemical and serological behavior of lactose fermenting strains of Salmonella typhimurium and its virulence</i>] — Paulo Camelo de Andrade Almeida & Luiz Rachid Trabulsi	27
Identification of leptospires isolated from the mouse <i>Mus musculus brevirostris</i> in the State of Rio de Janeiro, Brazil — Fernando Cordeiro & Irene Silva	37
Atividade microbiológica de solos radiativos [<i>Microbiological activity of radioactive soils</i>] — Luiz Fernando de T.L. Linhares & Adam Drozdowicz	43

JEOL DO BRASIL

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

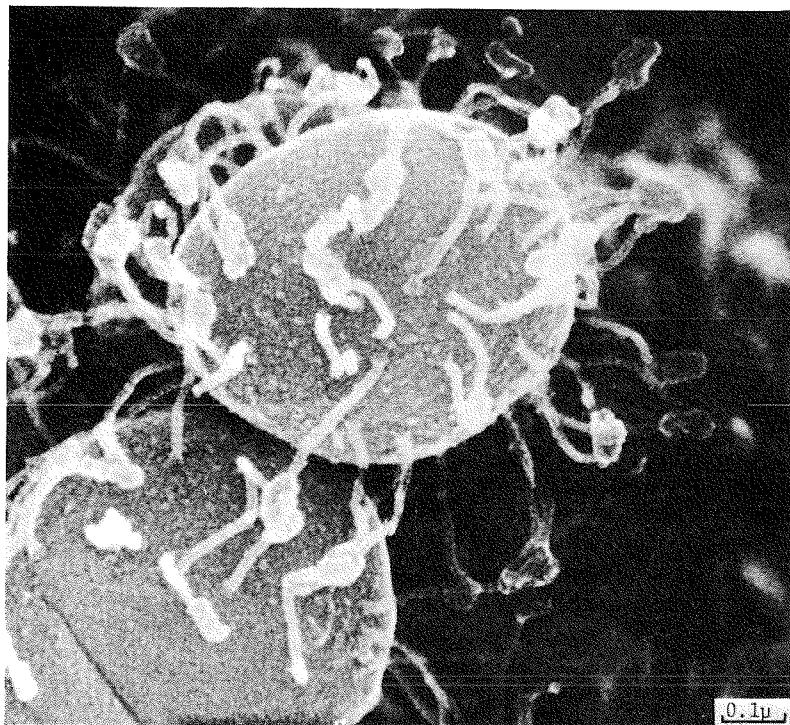


Imagen eletrônica secundária de fago PΦ55 adsorvido sobre *Staphylococcus*, obtida com JEM-100C, equipado com SEG e ASID.

Novo lançamento da JEOL: microscópio de varredura de mesa

JSM-P15



Resolução:
200Å
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^a 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 ($\mu\mu$). Comprimentos devem ser expressos em micrômetro (μm ; $10^{-6} m$), ao invés de micro (μ); nanômetro (nm ; $10^{-9} m$), ao invés de milimicro ($m\mu$); e Angstroms (\AA ; $10^{-10} m$). Partes por milhão (ppm) devem ser expressas como microgramos por mililitros ($\mu g/ml$) ou microlitros por litro ($\mu \text{litros/litro}$). 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 "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (7^a ed., 1957) obedecida. Se o Autor divergir dessa nomenclatura, seu julgamento será respeitado, mas a classificação correspondente ao Manual de Bergey 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.

Resumos, Discussões, Agradecimentos, Notas e Encartes devem ser inseridos na parte final do artigo.

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.

REFERÉNCIAS 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 seção **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:

Citações de livros devem ter a seguinte ordem: autor(s), título, edição, local, editor.

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 — Devem 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 explanativas 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) consultar um número da revista para informar valores.

INTERLAB

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; antígenos 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 sorológicos 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.

**Características culturais, bioquímicas, sorológicas e virulência
de amostras de *Salmonella typhimurium* fermentadoras de lactose***

Paulo Camelo de Andrade Almeida & Luiz Rachid Trabulsi**

Resumo

Foram estudadas as características culturais, bioquímicas, sorológicas e a virulência de amostras de *Salmonella typhimurium*, capazes de fermentar a lactose, isoladas em São Paulo, em 1972 e 1973. Dos meios de isolamento investigados, o meio de eozina-azul de metileno foi o menos inibitório, vindo, por ordem de capacidade de inibição, os meios de agar verde brilhante, agar sulfito de bismuto, MacConkey, xilose-lisina-desoxicócolato, *Salmonella-Shigella* agar e "Hektoen Enteric Agar". As colônias, nos meios mencionados, foram semelhantes às das enterobactérias fermentadoras da lactose e ou produtores de H₂S. Algumas diferenças foram notadas com relação às colônias de *E. coli* nos meios de agar eozina-azul de metileno, MacConkey e verde brilhante. Bioquimicamente, todas as amostras apresentaram comportamento homogêneo e típico do gênero *Salmonella*, com exceção de duas características: acidificação dos meios contendo lactose e ausência de enegrecimento do tríplice açúcar com ferro. A presença de gás sulfídrico foi revelada uniformemente nos meios de Rugai, lisina com ferro e SIM. Experimentos realizados sugerem que a não revelação de H₂S no tríplice açúcar com ferro é devida à não formação de sulfeto de ferro ou à sua dissolução. Antigenicamente, todas as amostras comportaram-se como *Salmonella typhimurium* var. *Copenhagen*. A virulência da *Salmonella* em questão foi menor do que a classicamente aceita para *Salmonella typhimurium*.

Summary

Cultural, biochemical and serological behavior of lactose fermenting strains of Salmonella typhimurium and its virulence

The cultural, biochemical and sorological characteristics of *Salmonella typhimurium* strains able to ferment lactose isolated in São Paulo, in 1972 and 1973 were determined. Eozin-methylene blue agar was the least inhibitory medium followed by brilliant green, bismuth sulfide, MacConkey, xylose-lisine-deoxycholate, SS, and Hektoen Enteric agars. Colonies resembled those of other lactose fermenting Enterobacteriaceae or H₂S producers. Some differences were noticed with regard to colonies of *E. coli* grown on enzyme-methylene blue agar, MacConkey and brilliant green agars. Biochemically, all strains revealed a homogeneous behavior of *Salmonella*, except by the acidification of lactose containing media and the lack of darkening of the triple sugar iron agar. The presence of H₂S was uniformly revealed in Rugai, lisine-iron and SIM media. The absence of the H₂S production with the triple sugar iron medium was related either to non formation of iron sulfide or its dissolution. Antigenically, all strains behaved as *Salmonella typhimurium* var. *Copenhagen*. The virulence of such a *Salmonella* was lesser than what is classically accepted for *Salmonella typhimurium*.

A família *Enterobacteriaceae* compreende vários gêneros que se distinguem, entre si, por características fisiológicas e antigênicas. Uma das características fisiológicas, a fermentação da lactose, tem sido utilizada há muito tempo, como ponto divisor, distinguindo bactérias lactose positivas de lactose negativas.

As salmonelas, bactérias reconhecidamente patógenas, são consideradas como não fermentadoras de lactose. No entanto, algumas variações neste caráter já foram descritas.

EDWARDS & EWING⁴ consideram ocasionais cepas de *Salmonella* que fermentam lactose, encontran-

do esta característica em 0,8% das amostras estudadas.

Seligmann & Saphra¹², em 1946, isolaram do líquido céfalo raquidiano de uma criança de 6 meses, que apresentava espina bifida e que morrera vitimada de meningite, uma bactéria fermentadora de lactose que apresentava esquema antigênico de *Salmonella newington*. No isolamento desta bactéria, encontraram algumas colônias lactose negativas que, no entanto, mostraram-se sorologicamente idênticas às colônias lactose positivas.

Falkow & Baron⁵, em 1962, isolaram uma amos-

* Este trabalho representa parte da tese de mestrado realizada pelo primeiro autor no correr do ano de 1973.

** Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Escola Paulista de Medicina, São Paulo, SP, Brasil.

tra de *Salmonella typhi* fermentadora de lactose e conseguiram transferir este caráter para *Escherichia coli* e *Salmonella abony*.

Bulmash & col.², em 1965, fizeram referência a uma amostra de *Salmonella tenessee* fermentadora de lactose, isolada de fezes e estudaram seu comportamento quanto à produção de H₂S, nos meios usuais, e à fermentação da lactose.

Gonzalez⁶, em 1966, publicou um estudo sobre uma amostra de *Salmonella tenessee* capaz de fermentar lactose e sacarose, responsável por septicemia fatal, decorrente de infecção uterina.

Kunz & Ewing⁸, em 1965, publicaram estudo sobre uma amostra *Salmonella typhi* lactose positiva, isolada do sangue e da urina de um lavador de vidaria de laboratório, que se apresentara com febre tifóide. Esta salmonela havia sido obtida artificialmente em laboratório, a partir de uma amostra de *Salmonella typhi* típica, que havia recebido um episoma de uma outra amostra de *Salmonella typhi* lactose positiva, isolada da natureza.

Easterling & col.³, em 1969, estudaram sete amostras de *Salmonella* fermentadoras de lactose, sendo quatro delas identificadas como *Salmonella tenessee*, uma como *Salmonella anatum*, uma como *Salmonella typhimurium* e a última como *Salmonella senftenberg*, conseguindo transferir a característica de fermentação de lactose a partir de seis das sete amostras estudadas.

Pessoa⁹, no Brasil, a partir de 1971, isolou várias amostras lactose positivas de *Salmonella typhimurium*, variedade *Copenhagen*, de sangue, líquido céfalo raquidiano, fezes, urina e secreções purulentas, particularmente de crianças, verificando que, entre 412 amostras de *Salmonella typhimurium* isoladas, 220 (53,4%) eram fermentadoras de lactose. Mais recentemente, um de nós (LRT) verificou que, entre 205 amostras de *Salmonella* isoladas de diferentes materiais clínicos, em 1973, 116 (56,6%) eram fermentadoras de lactose. Todas as amostras fermentadoras de lactose foram classificadas como *Salmonella typhimurium*.

A grande freqüência de amostras de *Salmonella typhimurium* fermentadoras de lactose em nosso meio e a dificuldade de distingui-las de outras entrobactérias fermentadoras de lactose, estimularam a realização do presente trabalho. Além da necessidade de caracterizá-las adequadamente, para fins de isolamento e identificação, pareceu-nos importante conhecer algumas de suas propriedades que apresentam implicações clínicas e epidemiológicas.

Material e Métodos

Amostras — As amostras foram isoladas no laboratório de bacteriologia do Instituto de Gastroenterolo-

gia de São Paulo, no correr do ano de 1973, com exceção de algumas isoladas em 1972. A maioria das amostras era procedente de fezes de crianças com enterite, mas o conjunto incluía amostras provenientes de urina, sangue, líquor e outros espécimes clínicos. Com poucas exceções, os espécimes clínicos pertenceram a pacientes internados em três hospitais de São Paulo. As amostras empregadas encontram-se relacionadas na Tabela 1.

Características culturais — A capacidade de crescimento e as características das colônias foram estudadas em meios de agar eosina azul de metileno, agar *Salmonella-Shigella*, agar verde brilhante, "Hektoen Enteric Agar", agar de MacConkey, agar sulfito de bismuto e agar xilose-lisina-desoxicólico. Com exceção do último meio, por nós preparado, os demais foram adquiridos prontos, de marca Difco ou Oxoid.

Características bioquímicas — Foram investigadas em tríplice açúcar com ferro; lisina com ferro; meio de Rugai e meio SIM. Além disto, foram feitas as seguintes provas individuais: fermentação da glicose, lactose, sacarose, maltose, manitol, dulcitol, salicina, ramnose, rafinose galactose, trealose, cellobiose, adonitol, inositol, arabinose, glicerol e xilose; produção de indol e H₂S, provas de VM e VP, utilização do citrato (Simmons e Christensen), acetato e malonato, de aminação de fenilalanina, hidrólise de uréia, de carboxilação da lisina, arginina e ornitina, hidrólise da gelatina, motilidade e utilização dos ácidos orgânicos de Kauffmann.

Todas as provas foram realizadas de acordo com as recomendações de Edwards & Ewing⁴, com exceção das de Rugai¹¹.

Características sorológicas — A análise antigênica foi realizada de acordo com as recomendações de Edwards & Ewing⁴, bem como o preparo dos antígenos e soros.

Virulência — A virulência para camundongos foi avaliada pelo método de Reed & Muench¹⁰.

Resultados

Capacidade de crescimento nos meios de isolamento

As amostras 001 a 030 foram incubadas em caldo infusão de cérebro e coração por uma noite e visualmente ajustadas ao tubo 1 da escala de Mac Farland, com solução salina 0,85%. A partir destas suspensões, foram realizadas diluições à razão de 10 até 10⁻⁸. As diluições 10⁻⁷ e 10⁻⁸ foram utilizadas, inoculando-se 0,1 ml nos meios de isolamento e em agar nutritivo, em duplicita, e in-

Tabela 1

Amostras de *Salmonella typhimurium* fermentadoras de lactose estudadas no presente trabalho.

número	catalogação*	número	catalogação*	número	catalogação*
001	1/IG-2243	035	43/IG-2880	069	101/IG-4175
002	4/IG-2352	036	44/IG-2920	070	85/IG-4908
003	5/IG-2261	037	45/Ped-54	071	84/IG-53
004	7/IG-2353	038	46/Ped-41	072	99/IG-5159
005	8/IG-2386	039	47/IG-704	073	81/IG-4910
006	9/IG-2089	040	48/IG-46	074	80/IG-4820
007	10/IG-2091	041	49/IG-75	075	122/IG-5613
008	11/IG-2090	042	50/IG-27	076	88/IG-36
009	12/IG-2151	043	51/IG-37	077	105/IG-5106
010	13/IG-2158	044	52/IG-63	078	102/IG-5162
011	14/IG-2159	045	53/IG-74	079	78/IG-1840
012	17/IG-2171	046	54/IG-25	080	75/IG-1794
013	19/IG-2174	047	55/IG-13	081	118/IG-5384
014	20/IG-2203	048	56/IG-83	082	94/IG-57
015	21/IG-1882	049	57/IG-X	083	91/IG-4241
016	23/IG-1937	050	58/IG-47	084	87/IG-4819
017	24/IG-1918	051	59/IG-74	085	82/IG-4264
018	25/IG-1917	052	60/IG-801	086	93/IG-4972
019	26/IG-1892	053	61/IG-70	087	77/IG-2098
020	27/IG-1891	054	62/IG-605	088	95/IG-5020
021	28/IG-2033	055	63/IG-24	089	92/IG-4071
022	29/IG-1985	056	64/IG-94	090	89/IG-24
023	30/IG-1984	057	65/IG-20	091	100/IG-5080
024	31/IG-2146	058	66/IG-1111	092	96/IG-4906
025	32/IG-1941	059	67/IG-1110	093	103/IG-5112
026	33/IG-2050	060	68/IG-78	094	74/IG-1811
027	34/IG-2463	061	69/IG-79	095	76/IG-1969
028	35/IG-2452	062	70/IG-85	096	86/IG-4240
029	36/IG-2464	063	71/IG-86	097	73/IG-1908
030	37/IG-2527	064	83/IG-33	098	115/IG-5161
031	38/IG-2451	065	90/IG-3017	099	119/IG-5519
032	39/IG-2689	066	98/IG-4205	100	120/IG-5651
033	40/IG-2666	067	72/IG-4898	101	117/IG-5324
034	41/IG-2783	068	104/IG-5041	102	123/IG-5683

* Catalogação: número Bacterioteca/local e número de origem.

IG = Instituto de Gastroenterologia de São Paulo

Ped = Clínica Pediátrica do Hospital São Paulo.

cubadas a 37°C por 24 horas. Após incubação, foi feita contagem de colônias por contador eletrônico. O crescimento obtido no agar nutritivo foi considerado 100%.

O crescimento quantitativo das amostras de *Salmonella typhimurium* fermentadoras de lactose variou de um meio para outro. A média dos resultados das 30 amostras estudadas encontra-se na Tabela 2. Entre os sete meios utilizados, o que apresentou menor inibição foi o agar eozina-azul de metileno; a maior inibição foi observada no "Hektoen Enteric Agar".

Características das colônias nos meios de isolamento

As colônias, crescidas nos meios de isolamento para o experimento anterior, foram estudadas quanto à morfologia e comparadas à de outras entrobactérias crescidas sob as mesmas condições.

De um modo geral, as amostras de *Salmonella typhimurium* apresentaram as características de bactérias fermentadoras de lactose. No entanto, nos meios agar eosina-azul de metileno, MacConkey e verde brilhante, apresentaram-se com bordo irregular, diferenciando-se das de *Escherichia coli*, que se apresentaram circulares, com bordos lisos. No meio "Hektoen Enteric Agar", diferenciaram-se das de *Escherichia coli* pela presença de pigmento preto no centro da colônia, resultante da produção de H₂S. Neste particular, foram semelhantes às colônias de amostras de *Citrobacter* e *Arizona* fermentadoras de lactose.

À exceção do agar sulfito de bismuto, que não contém lactose, todos os meios evidenciaram o aparecimento de colônias lactose negativas, chamadas aqui segregantes lac⁻, que apresentaram grande variabilidade no percentual de aparecimento, sem reproduzibilidade de resultados. Estas colônias apre-

Tabela 2

Percentual de número de colônias de amostras de *Salmonella typhimurium* fermentadoras de lactose nos meios de isolamento, em relação ao crescimento em agar nutritivo.

Meio	Percentual $\bar{x} \pm s$ ⁽¹⁾
Agar eosina-azul de metileno	91,6 ± 2,8
Agar verde brilhante	87,4 ± 3,2
Agar sulfito de bismuto	76,9 ± 3,2
Agar de MacConkey	70,3 ± 3,5
Agar xilose-lisina-desoxicolato	57,0 ± 4,6
Agar <i>Salmonella-Shigella</i>	47,5 ± 4,5
Hektoen Enteric Agar	38,4 ± 2,3

(1) \bar{x} = média

s = desvio padrão

sentavam-se, em agar de MacConkey e agar verde brilhante, maiores do que as lac⁺ das quais se originaram. O resumo das principais características morfológicas está apresentado na Tabela 3.

Comportamento bioquímico

Meios de triagem — As 102 amostras foram inoculadas, a partir de caldo infusão de cérebro e coração, nos meios tríplice açúcar com ferro, lisina com ferro, Rugai e SIM, incubadas por 24 horas a 37°C e verificado o seu comportamento. À exceção do tríplice açúcar com ferro, todos os outros meios evidenciaram produção de H₂S, pela presença de pigmento preto.

No entanto, tiras de papel de filtro, impregnadas com acetato de chumbo e colocadas na boca dos tubos de tríplice açúcar com ferro, evidenciaram a presença do sulfeto de hidrogênio durante a incubação.

Os resultados obtidos com os meios de triagem estão apresentados na Tabela 4.

Meios de identificação — Todas as 102 amostras foram inoculadas nos meios de cultura para provas bioquímicas, a partir do crescimento em caldo

Tabela 4

Comportamento das amostras de *Salmonella typhimurium* fermentadoras de lactose em meios de triagem

Meio	Resultado
Tríplice açúcar com ferro	base superfície H ₂ S gás
Lisina com ferro	base superfície H ₂ S gás
Rugai	base superfície H ₂ S gás indol (tampão)
SIM	movimento H ₂ S

infusão de cérebro e coração, para verificação de fermentação de açúcares e álcoois, fermentação de ácidos orgânicos, utilização de citrato e acetato, ataque à uréia, fenilalanina, lisina, arginina e ornitina, mobilidade e produção de indol, acetona e H₂S. Paralelamente, foram utilizados segregantes lac⁻ das amostras 001 a 010 e estudados seu comportamento bioquímico.

Nenhuma amostra produziu indol, fenilalanina deaminase, urease ou gelatinase, nem utilizou malonato de sódio. Todas utilizaram citrato como fonte de carbono, na presença ou ausência de outra fonte. O acetato foi utilizado como única fonte de carbono. Todas as amostras produziram a lisina e ornitina decarboxilases e arginina dihidrolase. Das 102 amostras estudadas, 98 apresentaram motilidade. A glicose foi fermentada com produção de gás por todas as amostras. A lactose, maltose, manitol, dulcitol, ramnose, galactose, trealose, ara-

Tabela 3

Morfologia das colônias de amostras de *Salmonella typhimurium* fermentadoras de lactose nos diversos meios de isolamento.

Meio	tamanho	cor	aspecto	segregação
Agar eosina-azul de metileno	1mm	preta com brilho metálico	bordos irregulares	presente
Agar <i>Salmonella-Shigella</i>	1mm	vermelha	bordos lisos	presente
Agar verde brilhante	1-2mm	amarela	bordos irregulares	presente
Hektoen Enteric Agar	1mm	amarela com centro preto	bordos lisos	presente
Agar xilose-lisina-desoxicolato	2mm	branca com halo laranja	bordos lisos com papila central	presente
Agar sulfito de bismuto	1mm	marrom ou cinza com halo marrom	bordos lisos com papila central	presente
Agar de MacConkey	1mm	vermelha	bordos irregulares	presente

Tabela 5

Reações bioquímicas de amostras de *Salmonella typhimurium* fermentadoras de lactose

Prova	Resultado	% +	% (+)	% -
Indol	-	0	...	100,0
Vermelho de metila	+	100,0	0	0
Voges Proskauer	-	0	...	100,0
Citrato: Simmons	+	100,0	0	0
Christensen	+	100,0	0	0
Acetato de sódio	+ ou (+)	82,4	17,0	0
H ₂ S	+	100,0	0	0
Fenil alanina deaminase	-	0	...	100,0
Urease	-	0	0	100,0
Motilidade	+	97,0	0	3,0
Lisina decarboxilase	+	100,0	0	0
Arginina dihidrolase	+ ou (+)	88,2	11,8	0
Ornitina decarboxilase	+	99,0	1,0	0
Gelatinase	-	0	0	100,0
Malonato de sódio	-	0	0	100,0
Ácidos orgânicos: citrato	+	100,0	0	0
tartarato	+	92,2	...	7,8
mucato	+	97,0	...	3,0
Glicose: ácido gás	+	100,0	0	0
Lactose	+	100,0	0	0
Sacarose	-	0	0	100,0
Maltose	+	100,0	0	0
Manitol	+	100,0	0	0
Dulcitol	+	100,0	0	0
Salicina	-	0	0	100,0
Ramnose	+	100,0	0	0
Rafinose	-	0	0	100,0
Galactose	+	100,0	0	0
Trealose	+	97,0	3,0	0
Cellobiose	(+)	0	98,0	2,0
Adonitol	-	0	0	100,0
Inositol	+ ou -	80,4	0	19,6
Arabinose	+	100,0	0	0
Glicerol	(+)	17,7	79,3	3,0
Xilose	+	100,0	0	0

+ = reação positiva

(+) = reação tardia

- = reação negativa

f = reação fraca

... = não há dados (reação tardia não verificada)

binose e xilose foram fermentados. Algumas amostras deixaram de fermentar o inositol. A cellobiose foi fermentada entre 5 e 15 dias de incubação e o glicerol entre 2 e 5 dias, apresentando o último, reação fraca. A sacarose, salicina, rafinose e adonitol não foram fermentados. Os ácidos orgânicos, citrato e tartarato foram utilizados. O mucato foi utilizado por 97% das amostras.

Todas as amostras evidenciaram reação de vermelho de metila positiva e reação de Voges Proskauer negativa. Todas produziram H₂S, embora este não tivesse sido evidenciado pelo tríplice açúcar com ferro.

O comportamento bioquímico das segregantes lac⁻ diferiu das amostras lac⁺ apenas quanto a fermentação da lactose. Com estas segregantes, o H₂S

foi evidenciado no tríplice açúcar com ferro.

A síntese do comportamento bioquímico está apresentada na Tabela 5.

Correlação entre acidez e produção de H₂S — Foram utilizadas 20 amostras (001 a 020), inoculadas em 10 meios de tríplice açúcar com ferro, que diferiram do meio original apenas pela concentração de lactose. Foi verificado, na grande maioria das amostras, que apenas nos meios que continham 0,3% ou menos de lactose houve aparecimento de precipitado preto, concomitantemente à alcalinização da superfície do meio. Raras amostras produziram pequena quantidade de H₂S em concentrações maiores de lactose.

O resultado está sintetizado no gráfico 1.

Composição antigênica — Para este estudo, foram feitos soros com a amostra 046 e com uma amostra de *Salmonella typhimurium* lactose negativa, retirada da bacterioteca da Disciplina de Microbiologia da Escola Paulista de Medicina, em São Paulo, tida como padrão. Foram utilizados, também, soro somático do grupo B e flagelares i e 1,2, da soro-teca da Disciplina de Microbiologia e um soro específico anti-5, preparado por adsorção.

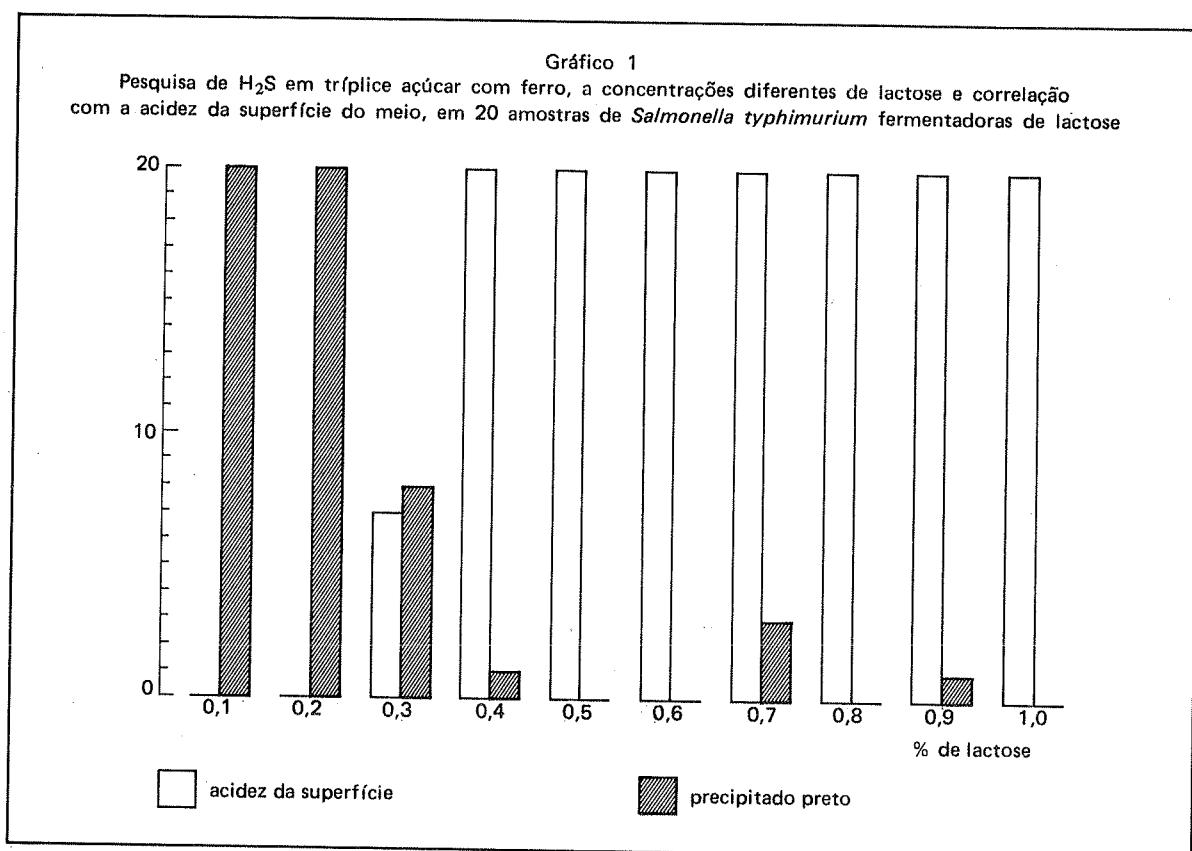
Todas as amostras estudadas aglutinaram com o soro somático do grupo B; 34 amostras aglutinaram inicialmente com os soros flagelares i e 1,2. As demais aglutinaram inicialmente com apenas um deles, aglutinando com o outro após reversão de fase, exceto as amostras 034, 079 e 008, que se apresentaram imóveis, tendo esta última aglutinado com o soro flagelar i, enquanto que as outras apenas apresentaram aglutinação somática. O soro somático específico anti-5 não aglutinou nenhuma das amostras estudadas.

Os soros preparados com a amostra padrão de *Salmonella typhimurium* e com a amostra 046 apresentaram aglutinação com título mais baixo na reação cruzada, exceto o soro anti-*Salmonella typhimurium*, do coelho nº 2 que aglutinou a título mais elevado com a amostra 046 (Tabela 6).

Tabela 6

Titulação dos soros preparados a partir da amostra padrão de *Salmonella typhimurium* e da amostra 046

Soro	Amostra 046	<i>S. typhimurium</i>
anti <i>S. typhimurium</i>		
coelho 1	1/40	1/80
coelho 2	1/640	1/320
anti amostra 046		
coelho 3	1/160	1/80
coelho 4	1/160	1/80
anti-5	0	1/3



O soro anti-*Salmonella typhimurium*, quando adsorvido com a amostra 046, aglutinou apenas a *Salmonella typhimurium*. O soro preparado com a amostra 046, quando adsorvido com *Salmonella typhimurium*, não aglutinou nenhuma das amostras em estudo.

A composição antigênica das amostras estudadas está apresentada na Tabela 7.

Tabela 7
Composição antigênica das amostras de *Salmonella typhimurium* fermentadoras de lactose.

Amostras estudadas	Aglutinação positiva com anti-soro			
	Somático		Flagelar	
	Grupo B	5	i	1,2
102	102	0	100	99

Avaliação da virulência – Foram estudadas as amostras 010 e 069 na determinação da DL₅₀, tendo a amostra 010 apresentado uma DL₅₀ de 121.000 bactérias e a amostra 069 uma DL₅₀ de 27.030 bactérias. Por falta de condições materiais, excluímos a determinação em uma amostra lac⁻ controle. Os resultados são apresentados nas Tabelas 8 e 9.

Discussão

Devido à grande freqüência de amostras de *Salmonella typhimurium* fermentadoras de lactose, os laboratórios de Patologia Clínica de São Paulo devem ter, em seu esquema de trabalho, a metodologia necessária ao isolamento e identificação destas bactérias.

A não adoção desta conduta deixaria muitos casos de infecção intestinal e extraintestinal, particularmente em crianças, sem diagnóstico etiológico corretamente estabelecido. Entre 984 amostras de *Salmonella*, isoladas ou recebidas para identificação no Instituto Adolfo Lutz, de São Paulo, no período de maio de 1971 a abril de 1972, PESSOA⁹ verificou que 313 (31,8%) eram de *Salmonella typhimurium* fermentadora de lactose.

De maneira semelhante, um de nós (LRT) encontrou 116 amostras da mesma bactéria entre 205 salmonelas isoladas no Instituto de Gastroenterologia de São Paulo, durante o ano de 1973. Tanto em uma casuística como em outra, os espécimes clínicos foram provenientes de diferentes hospitais de São Paulo ou mesmo do interior do Estado de São Paulo. Este fato sugere que esta variante de *Salmonella typhimurium* é extremamente disseminada em nosso meio, sendo provável que já ocorra, ou passe a ocorrer, em outros Estados do Brasil.

Tabela 8

Determinação da DL₅₀ da amostra 010 de *Salmonella typhimurium*
fermentadora de lactose

Dose log ₁₀	Mortos	Sobreviventes	Acumulado		Total	Percentual	
			Mortos	Sobreviventes		Mortos	Sobreviventes
5,8325	5	0	7	0	7	100,0	0
4,8325	1	4	2	4	6	33,3	66,7
3,8325	0	5	1	9	10	10,0	90,0
2,8325	1	4	1	13	14	7,2	92,8
1,8325	0	5	0	18	18	0	100,0

$$DL_{50} = \left(\frac{50 - 33,3}{100 - 33,3} \right) + 4,8325 = 5,0829$$

= 121.100 bactérias

Tabela 9

Determinação da DL₅₀ da amostra 069 de *Salmonella typhimurium*
fermentadora de lactose

Dose log ₁₀	Mortos	Sobreviventes	Acumulado		Total	Percentual	
			Mortos	Sobreviventes		Mortos	Sobreviventes
6,5575	5	0	12	0	12	100,0	0
5,5575	2	3	7	3	10	70,0	30,0
4,5575	4	1	5	4	9	55,6	44,4
3,5575	1	4	1	8	9	11,1	88,9
2,5575	0	5	0	13	13	0	100,0

$$DL_{50} = \left(\frac{50 - 11,1}{55,6 - 11,1} \right) + 3,5575 = 4,4317$$

= 27.030 bactérias

Por esta razão, a conduta recomendada para São Paulo deve ser adotada, pelo menos tentativamente, por laboratórios de Patologia Clínica de outros Estados do Brasil e, eventualmente, de outros países.

Do mesmo modo, em estudos ecológicos sobre *Salmonella*, deve-se ter em mente também a possibilidade de ocorrência desta variante ou mesmo de outros tipos sorológicos capazes de fermentar a lactose.

Dos meios de isolamento atualmente utilizados no diagnóstico de infecções intestinais por enterobactérias patógenas, o que se mostrou menos inibitória para a *Salmonella typhimurium* fermentadora de lactose foi o agar eosina-azul de metileno, vindo em seguida, por ordem de impediência, o agar verde brilhante, agar sulfito de bismuto, MacConkey, xilose-lisina-desoxicolato, *Salmonella-Shigella* e "Hektoen Enteric Agar".

Sob o ponto de vista econômico e prático, o maior problema com relação ao reconhecimento da *Salmonella typhimurium* fermentadora de lactose, no momento, é a necessidade de se transferir para meios de identificação preliminar, número relativamente grande de colônias lactose positivas, geralmente pre-

sentes em todas as placas semeadas com fezes e, freqüentemente, com outros materiais.

Embora algumas diferenças tenham sido encontradas entre colônias de *Escherichia coli* e de *Salmonella typhimurium* fermentadora de lactose, em vários dos meios investigados, elas não foram suficientemente adequadas para permitir distinção precisa; quando o foram, o meio foi muito inibitório. A exceção mais importante diz respeito ao meio de Wilson & Blair (agar sulfito de bismuto), relativamente pouco inibitório, no qual as salmonelas podem ser distinguidas, com segurança, de *Escherichia coli*. Diante disto, é recomendável incluir este meio no diagnóstico das infecções intestinais, sendo necessário, no entanto, que o meio seja comparado a outros quanto à eficácia, em condições naturais de rotina de diagnóstico. É possível que seu emprego possa dispensar o de outros para o isolamento de *Salmonella*. Além disso, teria a vantagem de permitir suspeitar-se da presença de outras enterobactérias que fermentam a lactose, como as do gênero *Arizona*.

Enquanto não se introduzir novos meios de isolamento, torna-se necessário transferir para meios de

identificação preliminar, ou de identificar, de outra maneira, as colônias lactose positivas encontradas em todos os meios, quer tenham centro escuro ou não. As únicas exceções seriam as colônias características de *Klebsiella* e *Enterobacter*.

O tríplice açúcar com ferro não deve ser usado como meio de identificação preliminar, isoladamente, por ser totalmente acidificado pela *Salmonella typhimurium* fermentadora de lactose, não indicando ainda, a produção de H₂S, o que, aliás, já foi verificado por Pessoa⁹. Ao contrário, tanto o meio de Rugai como o de lisina com ferro mostraram-se excelentes. A escolha de um ou outro é questão de preferência. O meio SIM tem indicação mais limitada, podendo ser usado também em combinação com provas que revelem outras propriedades das enterobactérias.

Os resultados das provas bioquímicas confirmam e ampliam as observações de Pessoa⁹, demonstrando comportamento homogêneo das 102 amostras investigadas, o que sugere, aliás, que todas pertencem a um só biotipo. As pequenas variações encontradas em algumas provas, como as dos ácidos orgânicos de Kauffman, ou mesmo na fermentação do inositol e glicerol, não permitiriam a distinção segura de biotipos diferentes. Por outro lado, o espectro da reação bioquímica é característico do gênero *Salmonella*, exceção feita, evidentemente, da fermentação da lactose.

O não aparecimento da cor escura no tríplice açúcar com ferro, que corresponderia à formação de H₂S, é decorrente da composição do meio, pois a presença do gás foi revelada nos meios SIM, peptona com ferro e na própria fita com acetato de chumbo, colocada na boca do tríplice açúcar com ferro.

Esta última reação exclui inibição das enzimas responsáveis pela formação da substância. Os resultados do experimento, em que se varia a concentração de lactose, sugerem que o não enegrecimento do tríplice açúcar com ferro foi decorrência da dissolução do sulfeto de ferro formado ou de sua não formação. Resultados semelhantes foram obtidos por Veron & Gasser¹³ e por Bulmash & Fulton¹, que estudaram outras enterobactérias fermentadoras de lactose.

O estudo da composição antigênica demonstrou ausência do antígeno 5 nas 102 amostras. As provas quantitativas de aglutinação e as de adsorção cruzada permitem concluir que estamos frente à *Salmonella typhimurium* variante *Copenhagen*. Ficou evidente, também, que podem ocorrer variantes monofásicas, isto é, apresentando somente o antígeno flagelar i. As amostras estudadas por Pessoa⁹ fo-

ram também classificadas como variantes *Copenhagen* de *Salmonella typhimurium*.

Quanto à virulência, as duas amostras investigadas apresentaram, para o camundongo, o caráter bem menos acentuado do que é aceito para *Salmonella typhimurium* em geral¹⁵. Estudos realizados por Pelloso (comunicação pessoal), com amostras epidêmicas de *Salmonella typhimurium*, revelaram menor virulência para o camundongo do que observado para as amostras não epidêmicas Watanabe¹⁴ verificou que a presença de um fator R, em uma amostra de *Salmonella typhimurium*, tornava-a menos virulenta para o mesmo animal. Entretanto, nossos resultados devem ser encarados com reserva, em virtude de não ter sido feito controle com amostras lactose negativas. A causa da redução da virulência é assunto a ser investigado.

Considerando em conjunto, os resultados dos estudos realizados e outros a serem publicados separadamente (sensibilidade a drogas e fagotipagem), dificilmente poderíamos fugir à conclusão de que todas as amostras de *Salmonella typhimurium* fermentadoras de lactose pertencem a uma única variedade que passou a predominar em nosso meio, causando uma epidemia extensa, com implicações práticas importantes.

Não bastasse os numerosos casos de infecção, muitos deles certamente passando ainda despercebidos, devido às características peculiares da salmonela, tem-se ainda que considerar as dificuldades terapêuticas, impostas por sua insensibilidade à maioria dos quimioterápicos em uso, e a maneira pela qual se poderia debelar esta epidemia. Apresentam também grande interesse as razões que levaram esta salmonela a ocupar lugar tão destacado em nossa patologia infecciosa. Estudos em andamento na Disciplina de Microbiologia indicam que a *Salmonella typhimurium* em causa é portadora de elementos extracromossômicos, responsáveis pela resistência a várias drogas e pelo caráter lac, bem como de mutações que a tornaram resistente a outras drogas. Deste modo, pode-se afirmar que, nesta salmonela, houve uma somação de caracteres cromossômicos e extracromossômicos que não só a tornaram atípica, mas também resistente à quase totalidade dos antimicrobianos de uso terapêutico no momento.

Tão extraordinariamente dotada, seria fácil antever sua seleção, uma vez que é capaz de resistir às forças que eliminariam germes semelhantes. Assim, é muito provável que a predominância desta salmonela, em nosso meio, com suas características atípicas e com os malefícios que tem causado, nada mais seja do que outra consequência do uso intenso e desregrado de antibióticos.

Referências Bibliográficas

1. BULMASH, J.M. & FULTON, MacD. — Discrepant tests for hydrogen sulfide — *J. Bacteriol.* 88:1813, 1964.
2. BULMASH, J.M.; FULTON, MacD., & JIRON, J. — Lactose and sulfide reactions in an aberrant *Salmonella* strain — *J. Bacteriol.* 89:259, 1965.
3. EASTERLING, S.B.; JOHNSON, E.M.; WOHLHERTER, J.A. & BARONS, L.S. — Nature of lactose-fermenting *Salmonella* strains obtained from clinical sources. *J. Bacteriol.* 100:35-41, 1969.
4. EDWARDS, P.R. & EWING, W.H. — *Identification of Enterobacteriaceae*, 3 ed. Burgess Publishing Company, Minneapolis, 1972.
5. FALKOW, S. & BARON, L.S. — Episomic element in a strain of *Salmonella typhosa*. *J. Bacteriol.* 84:581-9, 1962.
6. GONZALEZ, A.B. — Lactose-fermenting *Salmonella*. *J. Bacteriol.* 91:1661-2, 1966.
7. KING, S. & METZGER, W.I. — A new plating medium for the isolation of enteric pathogens. *Appl. Microbiol.* 16:577-8, 1968.
8. KUNZ, L.J. & EWING, W.H. — Laboratory infection with a lactose fermenting strain of *Salmonella typhi*. *J. Bacteriol.* 89:1629, 1965.
9. PESSOA, G.V.A. — Sobre a ocorrência de uma variante de *Salmonella typhimurium* fermentadora de lactose. Tese de doutoramento apresentada ao Departamento de Medicina Tropical e Dermatologia da Universidade de São Paulo, 1972.
10. REED, L.J. & MUEENCH, H. — A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Amer. J. Hyg.* 27:493-7, 1938.
11. RUGAI, E. & ARAUJO, A. — Meio de cultura para identificação presuntiva de bacilos intestinais Gram negativos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.* — 28:79-83, 1968.
12. SELIGMANN, E. & SAPHRA, I. — A coliform bacterium with the complete antigen of *Salmonella newington*. *J. Immunol.* 54:275-82, 1946.
13. VERON, M. & GASSE, F. — Sur la détection de l'hydrogène sulfure produit par certains entérobactériacees dans les milieux dits de diagnostic rapide. *Ann. Inst. Pasteur.* 105:524-34, 1963.
14. WATANABE, T. — Transferable drug resistance: the nature of the problem. — *A Ciba Foundation Symposium: Bacterial Episomes and Plasmids*. J. & A. Churchill Ltd., London, 1969, p. 81-101.
15. WILSON, G.S. & MILES, A.A. — *Topley and Wilson's principles of bacteriology and immunity*, 5 ed. Edward Arnold Ltd., London, 1964.

**Identification of leptospires isolated from the mouse
Mus musculus brevirostris in the State of Rio de Janeiro, Brazil**

Fernando Cordeiro* & Irene Silva**

Summary

Identification by the cross-absorption technique of 15 strains of *Leptospira* isolated from the mouse *Mus musculus brevirostris*, from Itaguaí, State of Rio de Janeiro, Brazil: nine belonged to *ballum* serotype and six to *tropica* serotype. The importance of the mouse in the epidemiology of the leptospirosis in animals and humans is discussed.

Resumo

Identificação de leptospiras isoladas do camundongo Mus musculus brevirostris no Estado do Rio de Janeiro

Identificação, pela técnica de absorção cruzada, de 15 cepas de *Leptospira* isoladas do camundongo *Mus musculus brevirostris* no Município de Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro. Nove pertencem ao sorotipo *ballum* e seis ao sorotipo *tropica*. É discutido o papel do camundongo na epidemiologia das leptospiroses animais e humanas.

Introduction

In a previous paper⁶ the results on 116 mice suspected of leptospire carriers were presented. Mice were caught on the field, from three different places of Seropédica District, Itaguaí Municipality, State of Rio de Janeiro, Brazil. Afterwards, 35 mice were caught from other places of the Municipality and in other areas of the State and adjacent regions which yielded 16 more strains.

The identification of isolated strains is revealed and the epidemiological aspects of the host are commented.

Material and methods

Origin of the material — Most of the mice used were trapped alive on the field but 14 were caught in the Biology Building of the "Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro", attracted by meals supplied to the animals used for zoological studies. All strains

were obtained from mice caught in Itaguaí Municipality, State of Rio de Janeiro: 60 from hosts in the field and two from mice in the Biology Building.

The Municipality of Itaguaí is located in the so-called "Baixada Fluminense". The places where mice were captured are of an average altitude of 30m, annual medium temperature of 23°C, annual rainfall of 1304mm and relative air humidity of 75%***. Most of the area is composed of low vegetation and natural pastures.

Out of those 62 strains of *Leptospira* isolated from 151 specimens of *Mus musculus brevirostris*, 19 (in Fletcher's semi-solid medium) were sent to the Leptospirosis Reference Laboratory of the "Instituto Superiore di Sanità", Rome, Italy, for identification. The details on these 19 strains are described in Table 1.

Serology — The preliminary identification of strains was made by the cross agglutination screening test, using immune sera representative of all known sero-groups (Table 2).

* EMBRAPA, km 47, Rio de Janeiro, GB, ZC 26. Fellow of the "Conselho Nacional de Pesquisas".

** Fundação Gonçalo Moniz, Salvador, Bahia. Fellow of the "Instituto Superiore di Sanità", in the Microbiology Laboratory (WHO/FAO Leptospira Reference Laboratory), Viale Regina Elena, 299, Roma, Italy.

*** Data from "Posto Agro-meteorológico, Seção de Climatologia Agrícola, EMBRAPA, Km 47, via Campo Grande, Rio de Janeiro, GB, Brasil.

Table 1

Strains of *Leptospira* isolated from mice *Mus musculus brevirostris*
in Itaguaí Municipality, State of Rio de Janeiro, Brazil

Strain N.	Origin of the material				Preliminari Classification Serogroup
	Animal Reg. N.	Capture place	Isolated from:	Isolation date	
Mm-2b	43	Field*	kidney	June, 25(69)	pomona
Mm-2b	43	"	kidney	June, 25(69)	ballum
Mm-3	36	"	kidney	May, 13(69)	ballum
Mm-4	155	"	blood	September, 01(69)	pomona
Mm-5	156	"	kidney	September, 25(69)	ballum
Mm-6	161	"	kidney	October, 25(69)	pomona
Mm-13	222	"	kidney	October, 23(69)	ballum
Mm-15	230	"	blood	November, 10(69)	pomona
Mm-18	250	"	kidney	October, 23(69)	ballum
Mm-20	254	"	urine	October, 28(69)	pomona
Mm-22	256	"	liver	October, 28(69)	pomona
Mm-38	311	"	blood	November, 17(69)	ballum
Mm-49	586	"	kidney	July, 09(70)	pomona
Mm-50	587	"	kidney	July, 04(70)	pomona
Mm-51	616	Pumping House	kidney	July, 15(70)	pomona
Mm-53	622	Field	kidney	July, 15(70)	pomona
Mm-57	655	Radional Biology	kidney	September, 04(70)	ballum
Mm-60	664	Buildg. Biology	kidney	August, 27(70)	ballum
Mm-62	683	Buildg. Biology	liver	October, 02(70)	ballum

* Several identification places in Seropédica District.

Table 2

Leptospira serotypes used in cross-agglutination screening tests

Serogroup	Serotype	Reference strain
Icterohaemorrhagiae	icterohaemorrhagiae	RGA
Javanica	javanica	Veldrat Batavia 46
Celledoni	celledoni	Celledoni
Canicola	canicola	Hond Utrecht IV
Ballum	ballum	Mus 127
	castellonis	Castellón 3
	arboreae	Arborea
Pyrogenes	pyrogenes	Salinem
Cynopteri	cynopteri	3522 C
Autumnalis	autumnalis	Akiyami A
Australis	australis	Ballico
Pomona	pomona	Pomona
	kennewicki	LT 1026
	monjakov	Monjakov DVB
	mosdok	5621
	tropica	CZ 299 U
	proechimys	LT 796
	cornelli	CB
Grippotyphosa	grippotyphosa	Moskva V
Hebdomadis	hebdomadis	Hebdomadis
Bataviae	bataviae	Van Tienen
Tarassovi	tarassovi	Perepelicin
Panama	panama	CZ 214 K
Shermani	shermani	LT 821

Table 3

Cross-absorption tests: results between the strains under study and the reference strains of the serotypes of *pomona* serogroup.

Test N.	Antisera	Absorbed with strain pomona	Monjákov DVB	Tested with strain										
				5621	CZ 299 U	LT 1026	LT 796	CB	Mm-2a	Mm-4	Mm-15	Mm-22	Mm-50	Mm-51
1 2	pomona Mm-2a	Mm-2a pomona	10* 1	- -	- -	- -	- -	- -	0 10	1 20	0 20	0 20	1 20	0 20
3 4	DVB Mm-2a	Mm-2a DVB	- -	10 1	- -	- -	- -	- -	0 10	0 20	0 20	0 10	0 20	0 20
5 6	5621 Mm-2a	Mm-2a 5621	- -	- -	10 1	- -	- -	- -	0 10	0 20	0 20	0 20	0 20	0 20
7 8	CZ 299 U Mm-2a	Mm-2a CZ 299 U	- -	- -	- -	5 0	- -	- -	0 2,5	0 1,25	0 5	0 2,5	0 2,5	0 2,5
9 10	LT 1026 Mm-2a	Mm-2a LT 1026	- -	- -	- -	- 1	- -	- -	1 10	1 10	1 10	1 10	1 10	1 10
11 12	LT 796 Mm-2a	Mm-2a LT 796	- -	- -	- -	- -	- -	40 1	- -	0 10	0 20	0 20	0 10	0 20
13 14	CB Mm-2a	Mm-2a CB	- -	- -	- -	- -	- -	- -	10 1	0 10	0 10	0 20	1 10	0 10

* The results are reported as percentages of the pre-absorption titres of the immune sera against the homologous strains, considered = 100.

The first strain studied (*Mm-2*), according to the preliminary tests, proved to be a mixed culture. Due to this, the purification technique described by Babudieri¹ was used for all strains. This procedure yielded two strains *Mm-2*, named *Mm-2a* and *Mm-2b*, belonging to distinct serotypes with which immune sera were prepared by successive inoculations in rabbits. Pure cultures of all strains were tested with the antisera *Mm-2a* and *Mm-2b*.

Final identification was made with 15 of the 19 isolated strains described in Table 1, since strains *Mm-6*, *Mm-20*, *Mm-49* and *Mm-53* were found to be contaminated.

Determination of serotype was made according to the methodology recommended by the World Health Organizations^{12,18}: cross-agglutinins absorption tests were performed between the 15 strains and the several serotypes of the groups *pomona* and *ballum*, with tests repeated from two to five times, especially when the serum residual titre after absorption was 10% to the homologous strain.

Results and Discussion

In a preliminary identification, strain *Mm-2* revealed to be a mixture of two serotypes belonging to groups *pomona* and *ballum*. Purified strains were named *Mm-2a* and *Mm-2b*, respectively.

Remaining strains tested with the antisera *Mm-2a* and *Mm-2b*, purposely prepared, agglutinated 100%, giving origin to two lots, one related to serogroup *pomona* and other to serogroup *ballum* (Table 1).

Results from the cross-agglutinin absorption tests,

between 15 remaining strains and the antisera of *Mm-2a*, *Mm-2b* and several serotypes strains of groups *pomona* and *ballum*, are set forth on Tables 3 and 4. Results are reported as percentages of the pre-absorption titres of the immunesera against the homologous strains, which are considered to be equal to 100.

Strains were considered as belonging to different serotypes when maintaining, after cross-absorption of agglutinins, at least in one direction, one titre equal or superior to 10% of the titre prior to the absorption to the same strain. It was concluded that strains *Mm-2a*, *Mm-4*, *Mm-15*, *Mm-22*, *Mm-50* and *Mm-51* were the same as strain *CZ 299 U* of the serotype *tropica*, since the absorption was completed in both directions (Table 3, tests n. 7 and 8). According to the same identification principle, strains *Mm-2b*, *Mm-3*, *Mm-5*, *Mm-13*, *Mm-18*, *Mm-38*, *Mm-57*, *Mm-60* and *Mm-62*, on the basis of absorption tests (Table 4, tests n. 5 and 6), were similar to strain *Mus 127* of the serotype *ballum*. In this case, the strains studied would belong either to the serotype *arborea* or to *ballum*; however, it was adopted the criteria described by Babudieri² that the strain should be placed in the serotype to which it shows more antigenic affinity. Strains *Mm-6*, *Mm-20*, *Mm-49* and *Mm-53* could not be definitely identified. However, they had preliminarily behaved as belonging to the serogroup *pomona*, the reason why they were considered identical to those identified as *tropica*.

The results showed that the mouse *Mus musculus brevirostris* is an important reservoir of leptospires, particularly of the serotype *ballum* and *tropica*, in

Table 4

Cross-absorption tests: results between the strains under study and the reference strains of the serotypes of *ballum* serogroup

Test N.	Antisera	Absorbed with strain	Tested with strain											
			Arborea	Castellón 3	Mus 127	Mm-2b	Mm-3	Mm-5	Mm-13	Mm-18	Mm-38	Mm-57	Mm-60	Mm-62
1 2	Arborea Mm-2b	Mm-2b Arborea	0* 1	- -	- -	0 2,5	1 2,5	0 2,5	1 1,25	1 2,5	1 0,625	1 2,5	1 1	1 2,5
3 4	Castellón 3 Mm-2b	Mm-2b Castellón 3	- -	40 0	- -	0 2,5	0 0,625	0 0,625	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0,625
5 6	Mus 127 Mm-2b	Mm-2b Mus 127	- -	- -	0 0,625	0 1,25	0 1,25	0 1,25	0 1,25	0 0,625	0 1,25	0 1,25	0 1,25	0 1,25

* The results are reported as percentages of the pre-absorption titres of the immune sera against the homologous strains, considered = 100.

the Municipality of Itaguaí, State of Rio de Janeiro, Brazil. Considering that the animal is encountered all over the Brazilian territory, even in the less habitable lackwoods¹⁴, besides practising commensalism and nidifying in the field, store-rooms and even in the houses, the mouse can play an important role in the epidemiologic chain of leptospires dissemination, to both domestic and wild animals, and to the man.

Antibodies against the serotype *ballum* have been observed in Brazil, in bovine and swine species¹⁷, and even in the man⁸. The same serotype was isolated from another wild rodent, *Akodon arvicoloides*, in São Paulo¹⁵.

The serotype *tropica* had not been isolated yet in Brazil, nor had antibodies been observed against it. However, the serotype *pomona*, belonging to the same serogroup, was isolated from bovine⁹ and

swine¹⁶. Antibodies against *pomona* have been frequently observed in bovines, swines and equines, and in the man^{3, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 17}.

An interesting case refers to a human patient with leptospirosis, in Belo Horizonte, State of Minas Gerais, whose serum agglutinated in high titres the strain *Mm-2*, included in the antigens battery⁴. The patient, we believe, may have infected himself with urine from mouse.

Acknowledgements

We owe the valuable guidance of this work to the late Professor Breno Babudieri, former Chief of the Leptospirosis Reference Laboratory (WHO), of the "Instituto Superiore di Sanità", Rome, Italy.

References

1. BABUDIERI, B. — A new technique for the purification of newly isolated *Leptospira* strains. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 39: 939-940, 1968.
2. BABUDIERI, B. — Proposed standardization of the agglutination-adsorption test for *Leptospira*. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 44: 795-810, 1971.
3. BARBOSA, M. — Aglutininas e lisinas anti-leptospira em soros de bovinos, eqüinos e suínos em Minas Gerais. *Arqs. Esc. Vet., Belo Horizonte*, 14: 1-26, 1962.
4. OLIVEIRA, M.O. & CORDEIRO, F. — Leptospirose humana causada por sorotipo ainda não identificado (Cepa Mm-2), em Belo Horizonte, Minas Gerais. Resumo apresentado no VIII Congr. Soc. Bras. Med. Trop., Belo Horizonte, 1972.
5. CASTRO, A.F.P.; SANTA ROSA, C.A. & CALDAS, A.D. — Isolamento de *L. canicola* de suínos abatidos em matadouro. *Arq. Inst. biol., São Paulo*, 29: 193-197, 1962.
6. CORDEIRO, F. — Leptospiros isoladas do camundongo *Mus musculus brevirostris* no Estado do Rio de Janeiro. *Pesq. Agropec. bras.*, 5: 461-464, 1970.
7. CORDEIRO, F. — Aglutininas anti-leptospira em soros de bovinos do Estado do Rio de Janeiro. Tese. Esc. Vet. U.F.M.G., Belo Horizonte, mimeograf. 58 p., 1973.
8. CORRÊA, M.O.A. — Leptospirose em São Paulo. *Revta. Inst. Adolfo Lutz, São Paulo*, 29/30:29-37, 1969/70.
9. FREITAS, D.C.; VEIGA, J.S.; LACERDA, JR., P.M.G. & LACERDA, J.P. — Identificação da leptospirose bovina no Brasil. *Revta. Fac. Med. vet. São Paulo*, 6: 81-84, 1957.
10. GUIDA, V.O. & BARROS, W.M. — Pesquisa de aglutininas e lisinas anti-leptospira em soros de bovinos aparentemente normais, sacrificados em matadouro. *Biológico, São Paulo*, 24: 26-27, 1958.
11. GUIDA, V.O.; CINTRA, M.L.; SANTA ROSA, C.A.; CALDAS, A.D.; CORREA, M.O.A. & NATALE, V. — Leptospirose suína provocada pela *L. canicola* em São Paulo. *Arq. Inst. biol., São Paulo*, 26: 49-54, 1959.
12. JOINT WHO/FAO Expert Committee on Zoonoses. *Wld. Hlth. Org., Tech. Rep. Ser.* n. 169, 1959.
13. LACERDA JR., P.M.G.; FREITAS, D.C. & LACERDA, J.P.G. — Notas sobre leptospirose bovina. *Arq. Inst. biol., São Paulo*, 27: 87-91, 1960.

14. MOOJEN, J. — Os roedores do Brasil. Inst. Nac. do Livro, Bibl. cient. bras. série A, II, 214 p., 1952.
15. SANTA ROSA, C.A. — Leptospirose em animais silvestres. Isolamento de um novo sorotípo, *Brasiliensis*, no sorogrupo *Bataviae*. Tese Fac. Ciências Med. Biol., Botucatu, São Paulo. mimeograf. 55p. 1970.
16. SANTA ROSA, C.A.; CASTRO, A.F.P. & TROISE, C. — Isolamento de *Leptospira pomona* de suínos em São Paulo.
17. SANTA ROSA, C.A.; CASTRO, A.F.P.; SILVA, A.S. & TERUYA, J.N. — Nove anos de leptospirose no Instituto Biológico de São Paulo. Revta. Inst. Adolfo Lutz, São Paulo, 29/30: 19-27, 1969/70.
18. WORLD HEALTH ORGANIZATION — Current problems in leptospirosis research. Report of a WHO expert group. Wld Hlth Org., Techn. Rep. Ser. n. 380, 1967.

Atividade microbiológica de solos radiativos

Luiz Fernando de T. L. Linhares & Adam Drozdowicz*

Resumo

No Morro do Ferro, Planalto de Poços de Caldas (MG), onde existe uma grande jazida de tório, encontram-se solos que apresentam uns dos maiores índices de radiatividade natural do mundo, tendo sido registrados níveis de radiação de até 3,2 mr/hr. Foram examinados três lotes de um mesmo tipo de solo, com mesma cobertura vegetal, apresentando pequenas diferenças quanto aos graus de radiatividade. Como indicadores gerais da atividade biológica deste solo, foram escolhidos: número de microrganismos, atividade celulolítica, liberação de CO₂ e as atividades da sacarose, urease e desidrogenase. Os resultados obtidos com os parâmetros usados ficaram, num sentido bastante amplo, dentro das faixas descritas por outros autores para diferentes solos "normais", não se tendo evidenciado a presença de anormalidades, exceto para a atividade desidrogenásica, que se mostrou bem acima das faixas de atividade encontradas em solos "normais". Os diferentes graus de radiatividade afetaram de modo irregular os vários indicadores estudados, exceto a atividade desidrogenásica que se mostrou igual nos três lotes examinados. O trabalho tem caráter apenas descritivo, em virtude de não terem sido encontrados, para controle, solos do mesmo tipo e com mesma cobertura vegetal, porém não radiativos.

Summary

Microbiological activity of radioactive soils

At the Morro do Ferro, on Poços de Caldas Plateau, Minas Gerais State, in southern Brazil, there is a thorium deposit. The soils above the deposit have some of the highest natural radioactivity in the world (up to 3.2 mr/hr). Three plots belonging to the same type of soil and with the same vegetation cover but with slightly different levels of radioactivity were examined. Measurements of the biological activity of the soil included the general number of microorganisms, cellulolysis in field conditions, evolution of CO₂, sacharase, urease and dehydrogenase. Results were, in a broad sense, within the ranges observed by other authors in various "normal" soils. Only the dehydrogenase activity was much higher in all plots than in "normal" soils. Effect of radioactivity on parameters other than dehydrogenase were of a random nature. A suitable non-radioactive soil was not available to compare and to clarify the results observed.

Introdução

Há numerosos trabalhos sobre o efeito de altas doses de radiação ionizante em vários grupos de organismos, mas pouco se sabe acerca dos efeitos biológicos causados, quando sob a ação de exposição crônica, natural, de baixas doses de radiação. Muitos trabalhos foram realizados para estudar os efeitos da irradiação artificial do solo, com doses elevadas, sobre a composição da população microbiana e atividade biológica do solo e suas características físico-químicas^{2, 3, 4, 7, 11, 18}. Todavia, parece haver apenas uma informação sobre o efeito

da exposição crônica, natural, de baixas doses de radiação, no estudo sobre microbiologia, em depósitos de lama radiativa natural⁹.

Durante nossos estudos sobre a microbiologia dos solos do Brasil, foram examinadas amostras que apresentam um dos maiores níveis de radiatividade natural já registrados no mundo¹⁷. Informações sobre os estudos realizados nessa área foram apresentadas por equipes do Instituto de Biofísica da UFRJ^{12, 13} e do Instituto de Física da PUC^{15, 16}. Pesquisas sobre a flora e fauna da região foram feitas por Emmerich & Becker⁵, do Museu Nacional, e por Takahashi¹⁷, que se limitou à flora.

* Instituto de Microbiologia, UFRJ, Centro de Ciências da Saúde, Bloco I, 20.000, Rio de Janeiro, GB, Brasil.

Com o objetivo de fornecer informações sobre a atividade biológica desses solos, foi caracterizada sua fração biológica através da medida de alguns parâmetros gerais, freqüentemente usados em estudos deste tipo.

Material e Métodos

Solo examinado — As amostras são procedentes do Morro do Ferro, representado por uma montanha íngreme de 300 m de altura, localizado em uma região de intrusivos vulcânicos não explosivos, próxima à cidade de Poços de Caldas, MG.

As regiões radiativas, onde existe a talvez maior jazida de tório conhecida, ocupam 0,35 quilômetros quadrados¹⁵, estando os níveis de radiatividade, em uma larga área da montanha, acima de 1,5 mr/hr, com dois pontos apresentando mais de 3 mr/hr¹⁶. A radiatividade é quase inteiramente devida ao tório e sua família radiativa, nos depósitos de terras raras¹⁹. Para encontrar solos com alto teor de radiatividade, dentro da área, onde, de acordo com as medidas feitas com cintilômetros portáteis, foram registrados níveis dentro de uma faixa superior a 1,5 mr/hr¹⁶, foi utilizado, devido à não disponibilidade no campo, de aparelhagem adequada, o contador portátil Gammametre GMT-3T. Tal aparelho, de unidades arbitrárias, é usado em prospecção de metais uraníferos, onde 4,5 unidades correspondem a 1 choque por segundo.

A vegetação do Morro do Ferro é de pastagem montanhosa característica, não cultivada, composta principalmente por gramíneas de baixa qualidade e raros arbustos dispersos^{16, 19}.

Ainda não foi feita a classificação dos solos existentes, parecendo, contudo, a uma observação visual, pertencerem aos Bruno-Ácidos. Análises físico-químicas¹⁶, revelaram serem solos pobres e ácidos, com baixa capacidade de troca iônica, ricos em Fe e bastante pedregosos.

Coleta de amostras — Foram escolhidos três lotes designados R₁, R₂ e R₃, medindo 2,5 X 3,0 m cada, com diferentes graus de radiatividade, separados 3-4 m entre si, na mesma inclinação do terreno, com as mesmas características pedológicas e mesma cobertura vegetal. O aparelho registrou, colocado sobre o solo, respectivamente 2.300 unidades para o lote R₁, 1.700 unidades para o R₂ e 1.000 unidades para o R₃. Tais medidas foram obtidas após remoção da vegetação e da camada superficial do solo (1-2 cm), representando, as leituras, as médias de três a quatro pontos dentro de cada lote. As amostras de solo foram retiradas do horizonte A (12-15 cm), de pontos escolhidos ao acaso, posteriormente homogenizadas para cada lote.

Manutenção das amostras — Os solos de cada lote foram colocados separadamente em sacos plásticos, rotulados e mantidos fechados durante o transporte, durante o período de três dias. Verificou-se então, novamente, a radiatividade dos solos mantidos nos sacos, tendo sido registradas 1.500 unidades para R₁, 1.100 unidades para R₂ e 800 unidades para R₃, que se manteve inalterada com o tempo. Os solos foram colocados em vasos de cerâmica e pesados, mantendo-se seus pesos constantes por adição de água a dias alternados, a fim de conservar o conteúdo original de umidade. Os vasos foram alinhados em prateleiras com cobertura, em área ajardinada.

Em todas as determinações realizadas sob condições controladas de laboratório, os solos foram previamente tamisados em malhas de 1 mm.

Material utilizado — Foram usadas substâncias químicas de fabricação Merck, Fischer, Sigma e NBC, todas pró-análise. O papel de filtro utilizado foi o Whatman 1. O agar dos meios sólidos foi o Bacto-Agar da Difco.

Número geral de microrganismos — A avaliação do número geral de bactérias e fungos foi feita segundo o método de diluição em placa. Os meios usados para a contagem dos microrganismos foram o de Casinato-Agar (pH 7.0) para bactérias e o de Martin (pH 5.8) para fungos¹⁴. As diluições usadas foram 10⁻⁵ para bactérias e 10⁻⁴ para fungos, sendo as leituras feitas após períodos de incubação de 48 horas a 30°C, representando os resultados a média de 5 réplicas.

Atividade celulolítica em condições de campo — Foi utilizada a técnica gravimétrica, que permite determinar o grau de decomposição de discos de papel de filtro, de peso previamente conhecido e enterrados no solo, protegidos por tela de nylon¹⁰.

Os discos foram enterrados nos mesmos lotes de onde haviam sido retiradas as amostras, em valas com cerca de 12 cm de profundidade, recobertas pelo solo, de modo a manter estreito contato com o mesmo. Para cada lote, foram feitas leituras após períodos de incubação de 50 a 100 dias no solo, com cinco réplicas para cada leitura.

Atividades enzimáticas — Atividade desidrogenásica, feita segundo a técnica de Casida & cols,¹ consiste em medir a redução do cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) a trifenilformazana (TPF), sendo o resultado expresso em mg de TPF/g de solo.

Atividade catalásica, feita pela técnica permanganometrítica de Katzenelson & Jerszowa, citada por Kulinska⁸, onde se utiliza, como indicador da atividade, o volume de KMnO₄ 0,1N/g solo seco, gas-

to nas titulações da H_2O_2 residual.

Atividade ureásica, medida segundo a técnica de Hoffmann & Schmidt modificada (com adição de MgO 10%)⁸, onde a uréia decomposta no solo libera amônia, que, com ácido bórico, forma borato de amônia, titulado contra HCl 0,1 N. Os resultados são apresentados como a quantidade de N-NH₃ produzida por ação da enzima/g de solo seco.

Atividade sacarásica, obtida pelo método iodométrico de Hoffman & Seegerer⁶, onde a quantidade de açúcares redutores produzida é avaliada pelo volume de tiosulfato de sódio 0,1 N, gasto na titulação.

Liberação de CO₂ do solo — Foi utilizada a técnica de Isermeyer, citada por Kulinska⁸, onde o conteúdo de CO₂ fixado por carbonatação é calculado de modo indireto, pela titulação do Ba(OH)₂ residual contra HCl 0,1 N. Durante os 66 dias do experimento, o solo foi mantido no escuro, à temperatura ambiente com grau de umidade correspondente a 50% de sua capacidade de retenção de água. A primeira leitura foi feita após 3 dias de incubação e as demais com sete dias de intervalo. Cada resultado, expresso por um ponto na curva, representa a somatória dos precedentes.

Resultados e Discussão

Os números de microrganismos, nos solos examinados, são apresentados na Tabela 1. A Tabela 2 mostra os resultados da atividade celulolítica "in situ". Os índices das atividades enzimáticas são mostrados na Tabela 3. No Gráfico 1, pode ser observado o conteúdo de CO₂ liberado dos solos examinados, durante o período de 66 dias. O Gráfico 2, resume os parâmetros de atividade biológica do solo que foram empregados, permitindo possam ser comparados entre si.

Apesar de apresentarem os mais altos níveis de radiatividade natural do mundo, os solos radiativos

não exercem efeito visível nos ecotipos da flora e fauna na região examinada. Tal é compreensível, tendo em vista os resultados de Emmerich & Becker⁵, que constataram que a radiatividade desses solos representa menos de um décimo da dose anual mínima, necessária para causar efeito mensurável no crescimento de *Pinus rigida*, considerada uma das espécies mais radiosensíveis conhecidas.

Umas das razões que mais motivou o presente trabalho foi verificar se o nível de radiatividade, incapaz de causar mudanças facilmente observáveis em organismos superiores, poderia provocar modificações na população microbiana sob sua ação.

Tabela 1
Número de bactérias e fungos

Solo	Nº de bactérias ($\times 10^5$)/g solo seco	Nº de fungos ($\times 10^4$)/g solo seco
R ₁	86	75
R ₂	43	36
R ₃	24	18

Os valores representam médias de cinco réplicas

Tabela 2
Atividade celulolítica

Solos	Decomposição da Celulose (%)	
	in situ	
	50 dias	100 dias
R ₁	16	100
R ₂	27	100
R ₃	55	100

Os valores representam médias de cinco réplicas

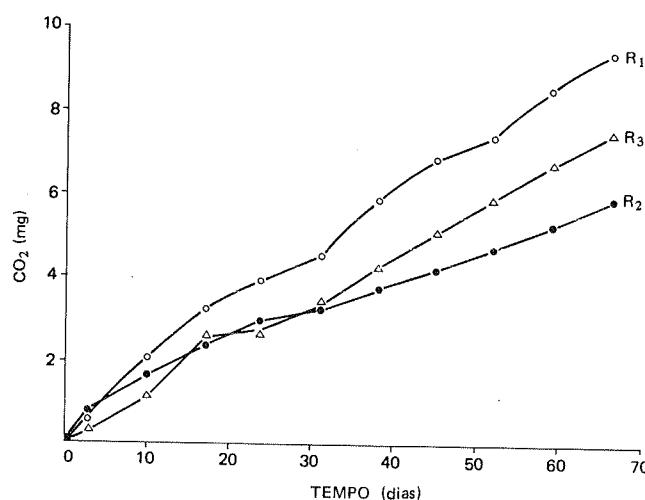
Tabela 3
Atividades enzimáticas dos solos^(*)

Solo	Desidrogenase (em mg TPF/g solo)	Catalase (em ml KMnO ₄ 0,1N/g solo seco) (**)	Sacarase (em ml tiosulfato 0,1N/g solo seco)	Urease (em mg N-NH ₃ /g solo seco)
R ₁	2,9	0,8	6,8	8,4
R ₂	2,8	1,3	9,4	13,8
R ₃	2,8	0,4	9,0	10,3

(*) Os valores representam médias de 3-4 réplicas

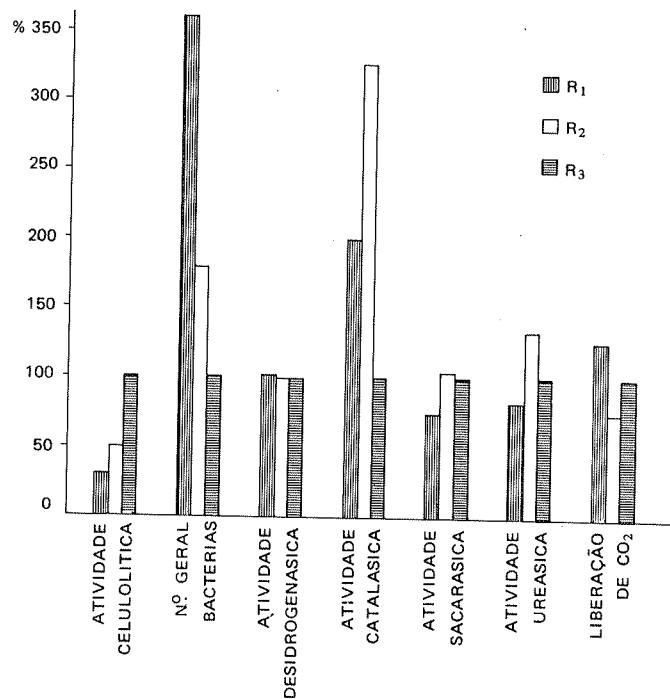
(**) Secagem do solo por um período de três dias, a temperatura ambiente, sendo os valores correspondentes a período de incubação de 2 1/2hs à temperatura ambiente.

Gráfico 1
LIBERAÇÃO DE CO₂ DOS SOLOS



Obs: Os valores representam médias de três réplicas, com 10g de solo cada, expressos em mg CO₂/g solo seco.

Gráfico 2
COMPARAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS SOLOS



Obs: Para feitura do gráfico, o solo R₃ foi considerado com 100% de atividade, sendo os valores de R₁ e R₂ calculados dentro desta premissa. Tal foi feito objetivando facilitar a comparação na análise dos resultados. O gráfico da atividade celulolítica corresponde àquela observada após um período de 50 dias de incubação.

O trabalho teve sentido apenas descritivo, em virtude das limitadas possibilidades de se tirar conclusões, devido à falta de um sistema controle, ou seja, solo com as mesmas características pedológicas e florísticas, porém sem sofrer a ação da radiatividade natural elevada.

Foi possível apenas constatar algumas distinções entre os lotes estudados, que diferem apenas no grau de radiatividade apresentado, podendo tal fato sugerir o possível efeito da radiação crônica, natural, sobre os mesmos. Pelo caráter preliminar do estudo, limitamo-nos ao exame de alguns indicadores gerais, dentre aqueles mais freqüentemente usados para a avaliação da atividade biológica do solo, quais sejam, densidade populacional, capacidade enzimática de transformar a matéria orgânica (celulases e sacarase) e de transformar compostos nitrogenados (urease), bem como os processos de óxido-redução (liberação de CO₂, atividade desidrogenásica e catalásica).

Os indicadores verificados, que caracterizam a densidade da população microbiana e algumas atividades enzimáticas, encontram-se, num sentido bastante amplo, dentro das faixas descritas em trabalhos realizados com diferentes solos "normais". Isto poderia significar que as técnicas utilizadas e os parâmetros escolhidos talvez não fossem adequados para determinar, de forma nítida, o possível efeito da

irradiação crônica, caso ele exista.

Não foi constatada regularidade nos efeitos dos diferentes níveis de radiação dos solos sobre os diversos parâmetros estudados (Gráfico 2). No caso da desidrogenase, contudo, cuja atividade foi idêntica em todos os lotes, foram obtidos índices bem mais elevados que aqueles observados em solos "normais". Sendo este indicador, considerado por muitos autores de grande importância, por caracterizar a intensidade dos processos biológicos que ocorrem no solo, tal resultado desperta a atenção e estimula estudos adicionais sobre a microbiologia desses solos e sobre isolados dos mesmos.

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq), Fundação Ford e ao Conselho de Ensino para Graduados (CEPG), pela ajuda financeira prestada ao Laboratório de Microbiologia do Solo para a realização de seus trabalhos. Agradecemos também à Divisão de Radioisótopos do Instituto de Biofísica da UFRJ e à Comissão Nacional de Energia Nuclear, extensivos à sua Equipe de Campo Fixa, em Poços de Caldas, pela generosa ajuda técnica e colaboração prestadas.

Referências Bibliográficas

1. CASIDA, L.E.; KLEIN, D.A. & SCHMIDT, T. — Soil dehydrogenase activity. *Soil Sci.*, 98:371-376, 1964.
2. CAWSE, P.A. & CORNFIELD, A.H. — Factors affecting the formation of nitrite in gamma-irradiated soils and its relationships with denitrifying potential. *Soil Biol. Biochem.*, 3:111-120, 1970.
3. CAWSE, P.A. & CORNFIELD, A.H. — Biological and chemical reduction of nitrate to nitrite in gamma-irradiated soils and factors leading to eventual loss of nitrite. *Soil Biol. Biochem.*, 4:497-511, 1972.
4. CLARK, B.W. & COLEMAN, D.C. — A comparative study of the effects of acute and chronic gamma irradiation on total soil respiration. *Pedobiologia*, 10:199-206, 1970.
5. EMMERICH, M. & BECKER, J — Cataloguing of flora and fauna of Morro do Ferro. Caracterization of its radiation environment. Em: Radiochemical and Radio-ecological Studies on Brazilian Areas of High Natural Radiation. *Annual Report to the US Atomic Energy Commission*, October, 31, 1967, pp. VI/1-19.
6. HOFFMANN, E. & SEEGERER, A. — Über das Enzymsystem unserer Kulturboden. I. Saccharase. *Biochem. Z.*, 322:174-179, 1951.
7. ISHAQUE, M.; CORNFIELD, A. H. & CAWSE, P. A. — Effect of gamma irradiation on an acid tea soil from East Pakistan on nitrogen mineralization and nitrification during subsequent incubation. *Plant and Soil*, 35:201-204, 1971.
8. KULINSKA, D. — Wpływ Simazyny na Drobnostrój Glebowe. *Roczn. Nauk Roln.*, 93:A-2:229-262, 1967.
9. LETUNOVA, S. V.; KOVAL'SKII, V. V. & ROMANOVA, S. N. — Geochemical ecology of microorganisms under conditions of different uranium levels in mud deposits. *Zh. Obshch. Biol.*, 31:111-120, 1970. Em: *Biol. Abst.*, 52:p. 4684 it. 46.101.
10. LINHARES, L. F. T. L. & DROZDOWICZ, A. — Atividade celulolítica em alguns solos brasileiros. *Rev. Microbiol.*, 3:91-100, 1972.
11. McLAREN, A. D. — Radiation as a technique in soil biology and biochemistry, *Soil. Biol. Biochem.*, 1:63-73, 1969.
12. PENNA-FRANCA, E. ed. — Radiochemical and Radio-ecological Studies on Brazilian Areas of High Natural Radiation. *Annual Report to the US Atomic Energy Commission*, October, 31. Instituto de Biofísica da UFRJ, 1967.
13. PENNA-FRANCA, E. ed. — Radiochemical and Radio-ecological Studies on Brazilian Areas of High Natural Radiation. *Annual Report to the US Atomic Energy Commission*, July, 30. Instituto de Biofísica da UFRJ, 1968.

14. PRAMER, D. & SCHMIDT, E. L. — Experimental Soil Microbiology. *Burgess Publishing Company*, Minneapolis, Minnesota, 1964, pp. 29/35.
15. ROSER, F. X. & CULLEN, T. L. — Environmental Radioactivity in High Background Areas of Brazil. Instituto de Física da Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro, 1962.
16. ROSER, F.X.; GOMES, H.; COSTA, N.L.; HAINBERGER, L. & CULLEN, T. L. — A Study of Natural and Artificial Radioactive Contamination in Brazil. Instituto de Física da Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro, 1965.
17. TAKAHASHI, C. — Radioecological Studies on plants of Morro do Ferro. Em: Radiochemical and Radioecological Studies on Brazilian Areas of High Natural Radiation. *Annual Report to the US Atomic Energy Comission*, July, 30. Instituto de Biofísica da UFRJ, 1968, pp. IV/1-7.
18. VELA, G. R. — The Effects of Ionizing Radiation on Nitrification in the Soil. *Texas, J. Sci.*, 20:315-321, 1969.
19. WEDOW Jr.; H. — The Morro do Ferro Thorium and Rare Earth Ore Deposits. Poços de Caldas District, Brazil. *Geological Survey Bulletin* 118-D, 1967.