

Volume 5 Número 4 Out.-Dez. 1974

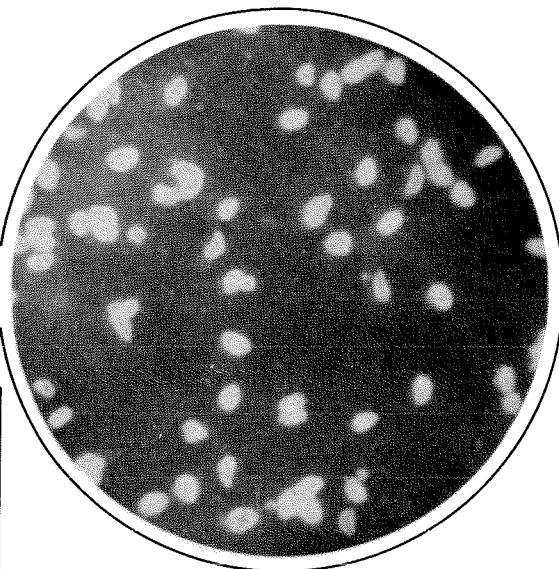
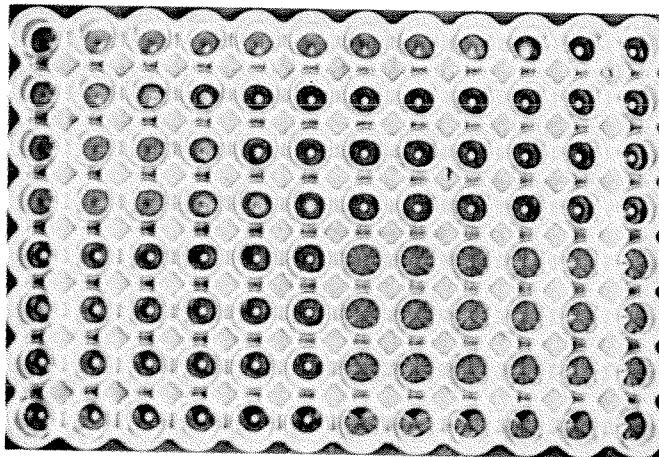
Revista de Microbiologia

Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo - Brasil

REVISTA DE
MICROBIOLOGIA
Sociedade Brasileira de Microbiologia

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 JOSE 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



Pertence a:

REVISTA DE MICROBIOLOGIA - SBM
Av. Prof. Lineu Pires, 1374
Cid. Universitária - USP
05508-900 - São Paulo/SP

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. Christóvão, Dirce Franco de Araujo, Eduardo O. Cisalpino, Gobert 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 Castrillon (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: 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 (Nilópolis). SANTA CATARINA: Aquilles A. Cordova Santos (Florianópolis). SÃO PAULO: Deise Pasetto Falcão (Araraquara), Vicente Correia Miranda (Araraquara), Augusto Cezar 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 Outubro-Dezembro 1974 Número 4

Rev. Microbiol. (S. Paulo), 5(4)

CONTEÚDO – CONTENTS

Artigos originais

Effect of pesticides on nitrogen fixation by blue-green algae – Edgar J. DaSilva, Lars-Erik Henriksson & Elisabet Henriksson.....	73
Algae in American sewage stabilization ponds – C. Mervin Palmer.....	75
Utilization of agricultural wastes by <i>Aspergillus awamori</i> for the production of glucoamylase – R.M. Attia & Samia A. Ali.....	81

Revisão

Origem procariótica da mitocôndria [<i>The prokaryotic origin of the mitochondria</i>] – Sérgio Olavo Pinto da Costa.....	85
---	----

JEOL DO BRASIL

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

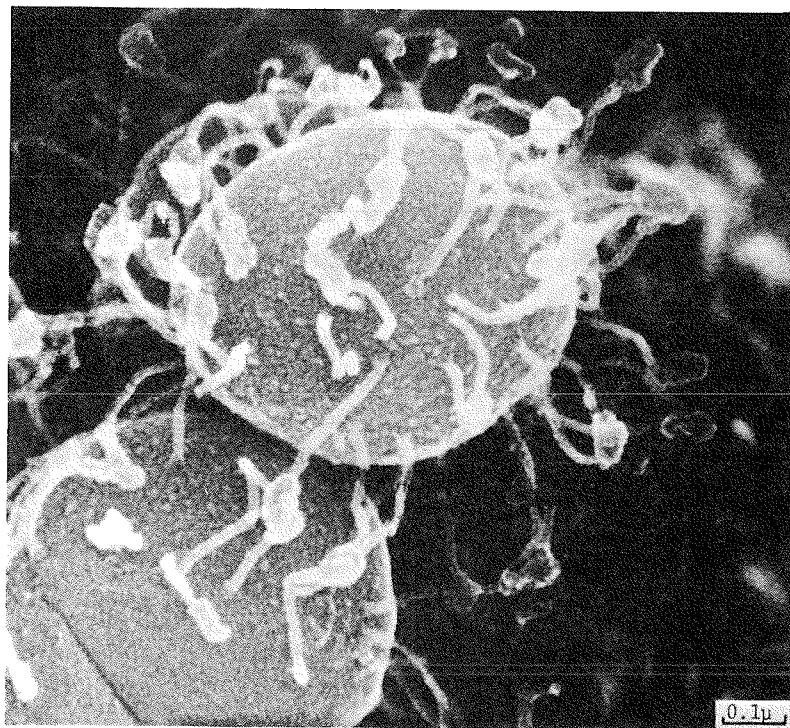


Imagen eletrônica secundária de fago PΦ55 adsorvido sobre *Staphylococcus*, obtida com JEM-100C, equipado com SEG e ASID.

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 milímicro ($m\mu$) 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 milímicro ($m\mu$); e Angstroms (A ; $10^{-10} m$). Partes por milhão (ppm) devem ser expressas como microgramos por mililitros ($\mu g/ml$) ou microlitros por litro (μl 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 "Berger'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 Berger 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 — Devem ser numeradas em arábico 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) 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; 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; ureia.

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

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

ROLCO SRL — Qualidade a preço inigualável

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

Effect of pesticides on nitrogen fixation by blue-green algae*

Edgar J. DaSilva, Lars-Erik Henriksson & Elisabet Henriksson

Summary

Effect of pesticides amitrole and its derivative, monuron, linuron, diquat, paraquat, MCPA, and of insecticide malathion on the abilities of nitrogen-fixation by green-algae *Anabaena cylindrica*, *Aulosira* sp., *Calothrix elenkenii*, *Chlorogloea fritschii*, *Cylindrospermum muscicola*, *Nostoc muscorum*, *Tolyphothrix tenuis*, *Westiellopsis* sp., and the phycobiont, *Nostoc* sp..

Resumo

Efeito de pesticidas sobre cianófitas fixadoras de nitrogênio

Efeito dos pesticidas "amitrole" e seu derivado, "monuron", "linuron", "diquat", "paraquat", "MCPA", e do inseticida "malathion" na habilidade de fixar nitrogênio pelas cianófitas *Anabaena cylindrica*, *Aulosira* sp., *Calothrix elenkenii*, *Chlorogloea fritschii*, *Cylindrospermum muscicola*, *Nostoc muscorum*, *Tolyphothrix tenuis*, *Westiellopsis* sp., and the phycobiont, *Nostoc* sp..

The increasing use of pesticides in agriculture and crop-protection programmes necessitates an investigation into the effects of these substances on the soil microflora — especially the blue-green algae which are vital in the stabilisation of the nitrogen economy of tropical and temperate soils^{5,11}. Whereas varied tolerance responses have been reported with the blue-green algae^{7,10} relatively few species have been examined⁶ with respect to their nitrogen-fixing abilities in the presence of pesticides. In the present study, the influences of eight pesticides was observed on axenic cultures of *Anabaena cylindrica*, *Aulosira* sp., *Calothrix elenkenii*, *Chlorogloea fritschii*, *Cylindrospermum muscicola*, *Nostoc muscorum*, *Tolyphothrix tenuis*, *Westiellopsis* sp. and the phycobiont, a *Nostoc* sp., of the lichen *Collema tenax*. The pesticides amitrole and its derivative, a diamino compound, monuron, linuron, diquat, paraquat, MCPA and the insecticide malathion were used at recommended field rates¹. In the nitrogen-fixing studies exponentially growing cultures in the recommended IBP medium⁴ were mixed with the different pesticides. Nitrogen-fixation activity was assayed by the acetylene-reduction

technique at the end of 1hr, one day, eight days and 17 days incubation at 30°C and 3000 lux⁸.

On analysis, a varied pattern of response in the nitrogen-fixing abilities of the nine algal species was observed with respect to time. In the case of the bipyridylium salts, apart from an initial stimulatory effect on *Tolyphothrix tenuis* by paraquat, *Cylindrospermum muscicola* by paraquat and diquat and *Westiellopsis* sp. by diquat, both pesticides exhibited a marked inhibitory action on nitrogen-fixation. Except in the case of the species that exhibited a stimulation response within a 50% level beyond that of the control cultures, inhibition was observed after 24hr. At the end of the 7th day inhibition of nitrogen-fixation was observed in all species. The response to the phenylureas, monuron and linuron was variable. With monuron, which has already shown promise as an algicide, an inhibitory effect at the 20% level with respect to the controls was observed with all species throughout the duration of the experiment. Linuron, on the other hand, was initially inhibitory but later stimulatory. The herbicide MCPA was found to behave in a similar manner to linuron. Malathion, the only insecticide

* Contribution of the Institute of Physiological Botany, University of Uppsala, Uppsala, Sweden; presented during GIAM IV — Fourth International Conference on the Global Impacts of Applied Microbiology, São Paulo 23-28 July, 1973.

tested in the investigation, was found, like linuron and MCPA, initially to depress nitrogen-fixation which property was later stimulated as time increased.

With amitrole and its diamino derivative similar patterns of response to those of linuron and malathion were noted in all the species tested except *Aulosira*.

In conclusion four patterns of response were found. They can be categorised as follows:

i) With some species an initial period of depression is succeeded by an increased activity in nitrogen-fixation. The ability of pesticides to stimulate microbial activity in terms of population, ammonification, nitrification, CO₂ evolution and other microbial forms have been reviewed by Audus² and more recently by Alexander¹. The pesticidal compounds probably undergo a detoxification process the products of the reaction being beneficial and stimulatory in nature. Bartha & col.³ in their studies with pesticides and nitrification have shown

that pesticides are degraded with the formation of stimulatory breakdown products, though this was not studied in this investigation.

ii) With other species of algae an initial increase is observed followed by a subsequent decrease in nitrogen-fixation. With these species the parent compound is transformed to a more stable and toxic product, and though we have no definite evidence as to the formation of such products by the blue-green algae, it has been shown that the fungicidal effectiveness of vapam is largely due to its conversion to a methylisothiocyanate by-product⁹.

iii) The nitrogen-fixing ability of the blue-green algae is either markedly or partially affected by pesticides like diquat and paraquat which in themselves are toxic.

iv) The blue-green algae like the nitrifying bacteria are known to play a vital role in enriching the nitrogen content of soil, and hence the use of pesticides.

References

1. ALEXANDER, M. — Microbial degradation and biological effects of pesticides in soil. In *Soil Biology — Reviews of Research*. pg. 209-236. Unesco Publ., 1969.
2. AUDUS, L.J. — Herbicide behaviour in the soil. In AUDUS, L.J. (ed.), *The physiology and biochemistry of the herbicides*, pp. 163-206. N.Y., Academic Press, 1964.
3. BARTHA, R.; LANZILOTTA, R.P. & PRAMER, D. — Stability and effects of some pesticides in soil. *Appl. Microbiol.*, 15: 67-75, 1967.
4. GORHAM, P.R.; MACLACHLAN, R.; HAMMER, U. & KIM, W.D. — Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb) de Breb. *Verh. int. Ver. Limnol.*, 15: 789-803, 1964.
5. HENRIKSSON, E. — Algal nitrogen-fixation in temperate regions. *Plant and Soil*, Special Volume, 415-419, 1971.
6. LUNDOVIST, I. — Effect of herbicides on nitrogen-fixation by blue-green algae. *Svensk. Bot. Tidskr.*, 64: 460-461, 1970.
7. SINGH, P.K. — Effect of pesticides on blue-green algae. *Arch. Mikrobiol.*, 89: 317-320, 1973.
8. STEWART, W.D.P.; MAGUE, T.; FITZGERALD, G.P. & BURRIS, R.H. — Nitrogenase activity in Wisconsin lakes of differing degrees of eutrophication. *New. Phytol.*, 70: 479-509, 1971.
9. TURNER, N.J. & CORDEN, M.E. — Decomposition of sodium N-methyldithiocarbamate in soil. *Phytopathology*, 53: 1388-1394, 1963.
10. VENKATRAMAN, G.S. & RAJAYALAKSHMI, B. — Relative tolerance of nitrogen-fixing blue-green algae to pesticides. *Indian J. agric. Sci.*, 42: 119-121, 1972.
11. WATANABE, A. & YAMAMOTO, Y. — Algal nitrogen-fixation in the tropics. *Plant and Soil*, Special Volume, 403-413, 1971.

Algae in American sewage stabilization ponds*

C. Mervin Palmer**

Summary

More than 75 algal genera were recorded from 914 samples from 72 American sewage ponds in 18 states. Algal genera per sample ranged from 1 to 33 with 1/3 of the ponds having a maximum number of genera between 13 and 33 per sample. Roughly 50% of the genera were green algae, 25% pigmented flagellates, 15% blue-greens, and 10% diatoms. The taxa were related to their seasonal distribution.

Resumo

Algas em lagoas de estabilização americanas

Mais de 75 gêneros de algas foram registrados a partir de 914 amostras de 72 lagoas de estabilização de resíduos nos Estados Unidos. Os gêneros variaram de 1 a 33 por amostra, com um terço das lagoas apresentando o número máximo de gêneros entre 13 a 33 por amostra. Aproximadamente 50% dos gêneros foi de clorofíceas, 25% de flagelados pigmentados, 15% de cianófitas e 10% de diatomáceas. A distribuição sazonal dos gêneros é tratada.

Introduction

A number of papers recording algae from sewage stabilization ponds have been published but they seldom cover more than a partial year or are extended over more than one year. Each deals with a specific pond in one location and is not statewide or nationwide in coverage (1 - 13).

Procedure

In this study algal genera were identified and recorded from samples collected for various periods of time over a period of several years. The ponds were distributed throughout eighteen states, the Panama Canal Zone, and the West Indies. All major areas of the United States were included, with samplings from 74 ponds. Collections were made on five or more days from 23 ponds located in nine states and the Panama Canal Zone. For approximately one-half of the 74 ponds more than one sampling date was involved (Table 1). The total number of

sampling dates for the 74 ponds was 929, with 294 of these being for one series of ponds located at Lancaster, California, and covering a period of more than six years.

Sample bottles to be shipped were filled to about one-third of their capacity with pond water thus allowing plenty of air to be present. No preservative was added as there were many flagellates present which could not be readily identified except in the living condition. The samples were shipped by air mail from each pond area to Cincinnati, Ohio, where they were analyzed and the algae identified. In most cases four separate collections were made for each sampling, two near the influent, one of pond water and one of floating algal material, and the other two from near the effluent for the same two types of material.

Along with a record of the algal genera, the relative abundance of each genus was estimated and listed as rare, occasional, common, frequent, and abundant using the numbers from 1 to 5 to indicate these.

* Presented in GIAM IV – Fourth International Conference on the Global Impacts of Applied Microbiology, São Paulo 23-28 July.

** Kendal at Longwood, Box 220, Kennett Square, Pa. 19348, USA.

Table 1 (continued)

<i>Ponds, by States</i>	<i>Date of First Sample</i>	<i>Nº dates Sampled</i>	<i>Total Nº Algal Genera</i>	<i>Date of First Sample</i>	<i>Nº dates Sampled</i>	<i>Total Nº Algal Genera</i>	
Table 1							
List of sewage ponds studied							
<i>California</i>				<i>New Hampshire</i>			
Concord	5/5/65	14	21	Exeter	9/17/68	50	35
El Centro	4/ /59	3	6	Jaffrey	11/16/64	58	45
Lancaster	9/25/63	294	79	New Hampton	1/17/66	63	29
Napa	5/5/64	1	1	Sunapee	4/18/67	75	58
Rio Lindo School	5/5/64	1	3				
Woodland	3/22/63	42	58				
<i>Colorado</i>				<i>New York</i>			
Alamosa	7/14/67	3	14	from State Health Department	4/14/65	1	3
Cortez	1/8/63	1	8				
Evans	5/ /68	1	5	<i>North Carolina</i>			
Fowler	6/ /68	1	5	Pilot Mountain	8/9/60	1	3
Hideway Park	6/ /68	1	3	Research Triangle	5/14/69	6	30
Kittredge	10/ /67	2	3				
Las Animas	6/13/68	1	5	<i>North Dakota</i>			
Lochmoor	6/ /68	1	6	Dunn Center	8/4/56	1	1
Rifle	6/ /68	1	6	Elgin	8/4/56	1	1
Rochy Ford	6/ /68	1	4	Flaxton	8/5/56	1	1
Walden	6/ /68	1	2	Jamestown	8/7/56	1	3
Wray	2/13/67	1	13	Laramae	8/6/56	1	2
				Maddock	2/5/55	5	22
<i>Florida</i>				Newtown	8/5/56	1	1
Sun City Center	2/18/65	61	37	Portland	8/6/56	1	4
				Richardton	8/4/56	1	1
<i>Georgia</i>				Rolla	8/6/56	1	4
Carrollton	7/ /68	1	7	Walford	8/4/56	1	3
Jenkinsburg	12/4/65	1	8	Wishek	2/9/55	5	14
Waycross	1/ /61	1	3				
<i>Indiana</i>				<i>Ohio</i>			
Berne	9/4/69	1	15	Lebanon	5/18/59	19	21
Montpelier	9/4/69	1	20				
Napoleon	5/9/62	44	67	<i>Oklahoma</i>			
St. Paul	4/4/66	8	41	Oklahoma City	1/28/63	24	46
Sunman	5/9/62	44	53				
<i>Kentucky</i>				<i>South Dakota</i>			
Hebron	1/ /57	1	4	Bison	8/3/56	1	2
				Burke	7/31/56	1	3
<i>Maryland</i>				Freeman	8/1/56	1	4
Hyattsville	6/17/63	1	32	Isabel	8/3/56	1	1
				Kadoka	4/24/55	8	14
<i>Mississippi</i>				Lemmon	1/31/55	6	16
Bay Springs	8/12/58	1	7	North Effington	8/9/56	1	5
Brandon	7/8/58	2	9	Philip	7/31/56	1	2
Jackson	8/11/58	3	22	Redfield	8/2/56	1	1
Prentise	8/12/58	1	8	Sisseton	8/9/56	1	3
Raymond	8/11/58	1	6	Vehlin	8/9/56	1	1
Skyway Hills	8/11/58	1	5	Wall	1/25/55	7	17
<i>Montana</i>							
Helena	9/12/62	10	27	<i>Texas</i>			
				Austin	5/18/64	2	28
				Jourdanton	2/ /61	1	10
				<i>Virginia</i>			
				Farmville	6/26/61	1	16
				<i>Panama Canal Zone</i>			
				Ft. Amador	2/14/69	14	15
				<i>West Indies</i>			
				Trinidad	7/4/67	1	4

Results

The number of algal genera recorded per sample ranged from 1 to 33. Approximately one-third of the ponds had a maximum number of 13 to 33 algae per sample, the others having 1 to 11. More than 125 different genera of algae were recorded (Table 2). Roughly, 50% were green algae, 25% were pigmented flagellates, 15% were blue-green algae, and 10% were diatoms. This same percentage held for the 46 most abundant algae.

A number of the algae were well represented in ponds throughout the various states. These are shown in Table 3 together with their maximum abundance for a sampling date for each state.

Table 2
Combined list of algal genera from all ponds

<i>Actinastrum</i>	<i>Diacanthos</i>	<i>Pandorina</i>
<i>Agmenellum</i>	<i>Dictyosphaerium</i>	<i>Pediastrum</i>
<i>Anabaena</i>	<i>Dinobryon</i>	<i>Pedinoptera</i>
<i>Anabaenopsis</i>	<i>Dispora</i>	<i>Phacotus</i>
<i>Anacystis</i>	<i>Elakatothrix</i>	<i>Phacus</i>
<i>Ankistrodesmus</i>	<i>Epithemia</i>	<i>Phormidium</i>
<i>Aphanizomenon</i>	<i>Errerella</i>	<i>Pinnularia</i>
<i>Aphanochaete</i>	<i>Eudorina</i>	<i>Planktosphaeria</i>
<i>Apiococcus</i>	<i>Euglena</i>	<i>Pleodorina</i>
<i>Arthrosira</i>	<i>Fragilaria</i>	<i>Pleurocapsa</i>
<i>Ascoglena</i>	<i>Francea</i>	<i>Pleurogaster</i>
<i>Asterococcus</i>	<i>Frustulia</i>	<i>Pocillomonas</i>
<i>Borzia</i>	<i>Glenodinium</i>	<i>Polyedriopsis</i>
<i>Calothrix</i>	<i>Gloeocystis</i>	<i>Pseudanabaena</i>
<i>Carteria</i>	<i>Gloeoomonas</i>	<i>Pteromonas</i>
<i>Cephalomonas</i>	<i>Golenkinia</i>	<i>Raphidiopsis</i>
<i>Cerasterias</i>	<i>Gomphonema</i>	<i>Rhizochrysis</i>
<i>Ceratoneis</i>	<i>Gomphosphaeria</i>	<i>Rhodomonas</i>
<i>Characium</i>	<i>Gonium</i>	<i>Rhoicosphenia</i>
<i>Chlamydomonas</i>	<i>Gymnodinium</i>	<i>Scenedesmus</i>
<i>Chlorella</i>	<i>Haematococcus</i>	<i>Schizothrix</i>
<i>Chlorococcum</i>	<i>Hantzschia</i>	<i>Schroederia</i>
<i>Chlonogonium</i>	<i>Hemidinium</i>	<i>Selenastrum</i>
<i>Chodatella</i>	<i>Kirchneriella</i>	<i>Sphaerellopsis</i>
<i>Chromulina</i>	<i>Lepocinclis</i>	<i>Spirogyra</i>
<i>Chroomonas</i>	<i>Lobomonas</i>	<i>Spirulina</i>
<i>Chrysamoeba</i>	<i>Lyngbya</i>	<i>Staurastrum</i>
<i>Chrysococcus</i>	<i>Mallomonas</i>	<i>Stauroneis</i>
<i>Cladophora</i>	<i>Massartia</i>	<i>Stichococcus</i>
<i>Closteridium</i>	<i>Micractinium</i>	<i>Stigeoclonium</i>
<i>Closteriopsis</i>	<i>Microspora</i>	<i>Surirella</i>
<i>Closterium</i>	<i>Myxosarcina</i>	<i>Tetradesmus</i>
<i>Coccochloris</i>	<i>Nannochloris</i>	<i>Tetraedron</i>
<i>Coccomonas</i>	<i>Navicula</i>	<i>Tetrastrum</i>
<i>Coelastrum</i>	<i>Nephroselmis</i>	<i>Trachelomonas</i>
<i>Cosmarium</i>	<i>Nitzschia</i>	<i>Treubaria</i>
<i>Crucigenia</i>	<i>Ochromonas</i>	<i>Trochiscia</i>
<i>Cryptomonas</i>	<i>Oedogonium</i>	<i>Ulothrix</i>
<i>Cyanomonas</i>	<i>Oocystis</i>	<i>Uroglenopsis</i>
<i>Cyclotella</i>	<i>Oscillatoria</i>	<i>Vacuolaria</i>
<i>Cymatopleura</i>	<i>Ourococcus</i>	<i>Zoochlorella</i>
<i>Cymbella</i>	<i>Pachycladon</i>	<i>Zygnema</i>
<i>Desmidium</i>	<i>Palmella</i>	
	<i>Palmelloccoccus</i>	

Heading the list of the most abundant algae were the following (in decreasing order of abundance): *Chlorella*, *Ankistrodesmus*, *Scenedesmus*, *Euglena*, *Chlamydomonas*, *Oscillatoria*, *Micractinium*, and *Golenkinia* (Table 4). *Nannochloris* was abundant only in the northern half of the country while *Massartia* and *Trachelomonas* were abundant only in the northeastern states. *Closteridium*, *Cyclotella*, *Nitzschia*, *Oocystis*, and *Phacus* were abundant only in the southwestern area; *Oscillatoria* was abundant only in the central and southeastern areas. *Chlamydomonas* was the only genus abundant throughout the country although *Chlorella* was abundant in all but the southeast. Numerous flagellates and green algae were limited in abundance geographically.

At Lancaster, California, *Chromulina* was most abundant in winter, *Anacystis* in summer and early fall, while *Pteromonas* was equally prevalent throughout the year. *Pandorina* persisted only during the summer in most ponds where it was present, while *Nitzschia* and *Ankistrodesmus* persisted throughout the year. At Lancaster, California, *Chodatella* and *Euglena* decreased in maximum abundance from the first year to the last sampling dates seven years later, while *Closteridium* increased during those same years and *Scenedesmus* remained constantly abundant.

Some algae unusual for sewage ponds were recorded. *Aphanizomenon* and *Enteromorpha* were found in ponds from North Dakota only, *Pediastrum* and *Gonium* were abundant only in Colorado, and *Pyrobotrys* from Ohio only. A few of the other algae unusual for sewage ponds were *Anabaenopsis*, *Lyngbya*, and *Spirogyra* for North Dakota; *Dinobryon*, *Fragilaria*, *Microspora*, and *Zygnema* for Maryland; *Oedogonium* for Indiana and Maryland; *Spirulina* for Mississippi; *Gloeocystis* and *Pleurogaster* for New Hampshire.

New Hampshire Ponds

In New Hampshire four ponds were studied each for a period of 50 to 75 sampling dates. A comparison of the algal flora of the ponds shows that each was quite distinctive and differed from the others. The total number of genera for each pond varied from 18 to 58. Only one genus (*Chlorella*) was abundant in all four ponds; four more (*Chlamydomonas*, *Euglena*, *Nannochloris*, and *Scenedesmus*) were abundant in three ponds; three additional ones (*Ankistrodesmus* and *Chodatella* and *Golenkinia*) in two ponds; while ten (*Chlorogonium*, *Closteridium*, *Closteriopsis*, *Cryptomonas*, *Dictyosphaerium*, *Massartia*, *Micractinium*, *Nitzschia*, *Pandorina*, and *Trachelomonas*) were abundant in only one pond. However, out of a total of 59 genera recorded for

Table 3

Maximum abundance, by states, of 40 genera of algae

	<i>Actinastrum</i>	<i>Anabaena</i>	<i>Anacystis</i>	<i>Ankistrodesmus</i>	<i>Chlamydomonas</i>	<i>Chlorella</i>	<i>Chlorococcum</i>	<i>Chlorogonium</i>	<i>Chodatella</i>	<i>Chromulina</i>	<i>Closterium</i>	<i>Closteriopsis</i>	<i>Coelastrum</i>	<i>Cryptomonas</i>	<i>Cyclotella</i>	<i>Ditytospaerium</i>	<i>Eudorina</i>	<i>Euglena</i>	<i>Golenkinia</i>	<i>Kirchneriella</i>	<i>Lepocinclis</i>	<i>Massingaria</i>	<i>Micractinium</i>	<i>Nannochloris</i>	<i>Oscillatoria</i>	<i>Pandorina</i>	<i>Pediastrum</i>	<i>Phacus</i>	<i>Planktosphaeria</i>	<i>Pteromonas</i>	<i>Scenedesmus</i>	<i>Schizothrix</i>	<i>Schroederia</i>	<i>Stigeoclonium</i>	<i>Trachelomonas</i>		
California	16	2	11	19	18	20	12	13	20	15	10	20	17	10	9	20	12	20	1	2	12	19	11	9	17	19	14	13	7	18	20	20	11	20	1		
Colorado		20	20	12	12	16	14	4	8	5		16	2	2	7	17	2	8	14	20	6	12	15	15	15	15	2	20	20	20	12	7	5				
Florida		11	12	16	14	4	16	2	12		14		6		6		7	17	2	14	10	3	2	20	6	15	11	19	17	1	10	18	19	18	13	5	7
Georgia			4	16	2	12																															
Indiana	13	5	12	20	20	20	15	12	3	12																											
Kentucky			12																																		
Maryland	5		1	2	1	2																															
Mississippi		4	20	14	7	6	6																														
Montana		2	2	16	18	4		16																													
New Hampshire	1		20	20	20	10	15	19	11	1		15	16	1	20		15	1	20	20	2	7	17	19	20	3	15	6	14	16	6	8	3	20	13	8	18
New York			2																																		
North Carolina	1	6	11	17	20	2	4	4	2	1	8	1	6	13	10	12	6	1	6	16	5	14	13	10	5	15	18	2	8	12	20	12	8	12			
North Dakota		8	4	12	16	8					16	8	5	14	12	1	11	11	20	5	6	16	5	2	3	20	7	4	4	4	4	4	4	4	4		
Ohio		7	16	20	20	13						2	6	5	1	11	3	8	2	3	4	5	12	10	10	1	1	8	1	20	1	7	7	6	1		
Oklahoma	2	3	1	7	17	20	5	2		8	7	1	2	4	8	3	16	20	5	16	16	2	5	1	8	1	1	8	1	20	1	7	7	6	1		
South Dakota	12	1	12	18	20	1	5		4							7					7	8	5	3	18	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Texas	5	5	10	4	5	13	2																														
Virginia		12	11	9	2																																
Panama Canal Zone		1		20	20	1																															
West Indies			2	10																																	

Note: Numbers represent the sum of the figures indicating abundance for the four samples collected on each sampling date.

Table 4

Algae most abundant and widespread in sewage ponds

Rank	Genus	Score*
1	<i>Chlorella</i>	51
2	<i>Ankistrodesmus</i>	49
3	<i>Scenedesmus</i>	49
4	<i>Euglena</i>	48
5	<i>Chlamydomonas</i>	47
6	<i>Oscillatoria</i>	46
7	<i>Micractinium</i>	39
8	<i>Golenkinia</i>	37
9	<i>Anacystis</i>	34
10	<i>Oocystis</i>	34
11	<i>Chodatella</i>	33
12	<i>Nitzschia</i>	32
13	<i>Nannochloris</i>	31
14	<i>Planktosphaeria</i>	29
15	<i>Pandorina</i>	29
16	<i>Pteromonas</i>	28
17	<i>Closteridium</i>	28
18	<i>Cryptomonas</i>	28
19	<i>Chlorococcum</i>	28
20	<i>Schizothrix</i>	28
21	<i>Cyclotella</i>	27
22	<i>Phacus</i>	27
23	<i>Schroederia</i>	25
24	<i>Trachelomonas</i>	25
25	<i>Actinastrum</i>	25

* Note: Score was determined by adding together the highest sampling date abundance figure, the number of states for the genus, and the number of states where abundance figure was 5 or above. Genera with similar scores were ranked according to the first item.

the state one pond (Sunapee) had all but one. A substantial part of the higher numbers of genera in Sunapee and Exeter ponds was due to more than a dozen forms in each pond which were listed as "rare" in frequency. The other two ponds had almost no forms so listed. The rare forms included *Actinastrum*, *Chroomonas*, *Closterium*, *Coccimonas*, *Coelastrum*, *Cosmarium*, *Crucigenia*, *Elakothrix*, *Eudorina*, *Glenodinium*, *Gloeomonas*, *Gymnodinium*, *Ourococcus*, and *Rhodomonas*.

Lancaster, California Ponds

A series of ponds at Lancaster, California, was studied over a period of more than six years, covering 294 sampling dates. During that time 25 algae were very abundant one or more times. *Scenedesmus* was the most consistently abundant during every year and every month of the year. Others fluctuated during the years, especially *Actinastrum*, *Anacystis*, *Chlorogonium*, *Chodatella*, *Chromulina*, *Closteridium*, *Closteriopsis*, *Closterium*, *Golenkinia*, *Micractinium*, *Nitzschia*, *Phacus*, *Planktosphaeria*, *Pteromonas*. For example, *Closteridium* was absent during 1963-'64 but reached a very high abundance in 1968-'69. *Phacus* was absent during the first two years but abundant during the third and fourth years; *Pediastrum* was absent during the first three years but present in reasonable numbers during the other

years; *Chodatella* was present in much larger numbers during the first two years and almost disappeared during the last two years; *Euglena* also became less abundant, gradually, from the first to the last year.

Seasonal variation in abundance was evident in some genera. Those tending to be most abundant in winter or early spring included *Ankistrodesmus*, *Euglena*, *Golenkinia*, *Micractinium*, and *Phacus*. *Cyclotella* tended to be more abundant from August to November. At Lancaster, California, there was no indication of a greater abundance of algae in late spring and summer than during the remainder of the year.

A total of 79 genera of algae were recorded over the whole period of the test at Lancaster, California, with as many as 33 being recorded from a single sample. As was true of other ponds, no significant difference was found between the number, kinds, and abundance of algae in the influent area compared to the effluent area of the pond or series of ponds.

Florida Pond

At Sun City Center, Florida, the sewage stabilization ponds were studied from February 18, 1965, to August 23, 1966, involving 61 collecting dates. A total of 37 genera was recorded. Although a number were consistently represented in moderate abundance, no forms were very abundant even for single dates or for short periods of time. The more common forms were *Chlamydomonas*, *Euglena*, *Golenkinia*, *Chlorella*, *Micractinium*, *Ankistrodesmus*, *Anacystis*, and *Nannochloris*. While *Golenkinia* and *Micractinium* were more abundant in early spring and *Chlamydomonas* in mid-spring, others tended to be more prominent in summer and fall including *Anacystis*, *Ankistrodesmus*, *Chlorella*, *Euglena*, *Oscillatoria*, *Pandorina*, *Schizothrix*, and *Scenedesmus*. *Nitzschia* was more evident in the winter.

Conclusion

The algae in sewage stabilization ponds tend to be stable in numbers, kinds, and abundance. Seldom does a sudden change occur. Each pond tends to have a distinctive flora so that the source of an unknown sample could often be determined by recording its algal flora and comparing this with the algal flora of ponds from which the sample of unknown source could have come. The algae present in small numbers would be particularly significant in this respect. Most ponds have algae of several kinds present during the winter as well as during the warmer seasons.

Table 5

New Hampshire ponds
Comparison of most abundant genera

Genera with a yearly maximum per sampling date of 15-20

	Exeter	Jaffrey	New Hampton	Sunapee
<i>Ankistrodesmus</i>		x		x
<i>Chlamydomonas</i>		x	x	x
<i>Chlorella</i>	x	x	x	x
<i>Chlorogonium</i>			x	
<i>Chodatella</i>			x	x
<i>Closteridium</i>			x	
<i>Closteriopsis</i>				x
<i>Cryptomonas</i>				x
<i>Dictyosphaerium</i>				x
<i>Euglena</i>	x	x	x	
<i>Golenkinia</i>	x	x		
<i>Massartia</i>				x
<i>Micractinium</i>	x			
<i>Nannochloris</i>	x		x	x
<i>Nitzschia</i>	x			
<i>Pandorina</i>	x			
<i>Scenedesmus</i>		x	x	x
<i>Trachelomonas</i>				x

References

1. ALLEN, M.B. — General features of algal growth in sewage oxidation ponds. California State Water Pollution Control Board, Publ. N° 13:1-48, 1955.
2. CLAUSEN, H.T. — Some observations on the action of algae on sewage in ponds. *Institute of Sewage Purification Jour. and Proc. Pt.*, 3:345-348, 1959.
3. FITZGERALD, G.P., & ROHLICH G.A. — An evaluation of stabilization pond literature. *Sewage and Indus. Wastes*, 30:1213-1224, 1958.
4. HOPKINS, G.J. (ed.). Waste stabilization lagoons. Proc. Symposium at Kansas City, Mo., Aug. 1-5, 1960. U.S. Dept. Health, Educ., and Welfare, Pub. Health Serv. Publ. N° 872:1-170, 1961.
5. MACHENTHUN, K.M., & MCNABB, C.D. — Stabilization pond studies in Wisconsin. *Jour. Water Poll. Contr. Fed.* 33:1234-1251, 1961.
6. MYERS, J. — Studies of sewage lagoons. *Public Works* 79:25-27, Dec. 1948.
7. NEEL, J.K., McDERMOTT, J.H. & MONDAY, Jr. C.A. — Experimental lagooning of raw sewage at Fayette, Missouri. *Jour. Water Poll. Contr. Fed.*, 33:603-641, 1961.
8. DENOYELLES, Jr., F. — Factors affecting phytoplankton distribution in a double-cell sewage lagoon. *Jour. Phycol.* 3:174-181, 1967.
9. OSWALD, W.J.; GOTAS, H.B.; GOLUEKE, C.G.; & KELLEN, W.R. — Algae in waste treatment. *Sewage and Indus. Wastes*, 29:437-457, 1957.
10. PALMER, C.M. — Algal records for three Indiana sewage stabilization ponds. *Proc. Indiana Acad. Sci. for 1968*, 78:139-145, 1969.
11. PALMER, C.M. — Nutrient assimilation by algae in waste stabilization ponds. *Proc. Indiana Acad. Sci. for 1966*, 76:204-209, 1967.
12. PORGES, R. & MACKENTHUN, K.M. — Waste stabilization ponds: use, function, and biota. *Biotechnology and Bioengineering*, 5:255-273, 1963.
13. WIEDEMAN, V.E. — Chemical analyses and algal composition in a waste-stabilization pond system. *Southwestern Naturalist*, 10:188-210, 1965.

Utilization of agricultural wastes by *Aspergillus awamori* for the production of glucoamylase*

R. M. Attia & Samia A. Ali**

Summary

The main industrial use of glucoamylase is in the production of crystalline D-glucose. *Aspergillus awamori* was used. Variations in the specific type of carbohydrate source affected the yield of enzyme markedly. Of all the substances tried, maltose support satisfactory enzyme yields. Sucrose, lactose, fructose and galactose gave abundant growth which seemed to be a necessary but not sufficient condition for maximum enzyme yields. The specificity of the carbohydrate structure for glucoamylase production was tried. The synthesis of enzyme was significantly stimulated when two-third of the starch in the medium was replaced by maltose and the adaptation seemed to be specific to maltose structure. Since the substitution of the maltose by structurally related compound, i. e. lactose in the medium did not give a comparable glucoamylase yield. Maltose or compounds constituted of maltose units are essential for producing a maximum yield of enzyme. These results seemed to favor the theory that glucoamylase production is adaptive. Agricultural wastes produced locally in large quantities from plants manufacturing starch and other products were discussed. Rice bran followed by glucose syrup, corn bran, wheat bran and cane sugar molasses support good yield of glucoamylase.

Resumo

Uso de resíduos agrícolas por Aspergillus awamori para a produção de glucoamilase

O principal uso industrial da glucoamilase é para a produção de D-glicose cristalina. No presente trabalho, *Aspergillus awamori* foi usado. Variações na fonte de carboidrato específico influiu no rendimento de enzima marcadamente. Entre todas as substâncias utilizadas, a maltose garantiu o rendimento satisfatório da enzima. Sacarose, lactose, frutose e galactose deram abundante crescimento do fungo, porém não renderam suficientemente para a produção da enzima. A especificidade da estrutura do carboidrato para a produção de glucoamilase foi tentada. A síntese da enzima foi significativamente estimulada quando dois terços do amido no meio foram substituídos por maltose, com indicações que a adaptação pareceu ser específica para a estrutura da maltose. Maltose ou compostos formados por unidades de maltose são essenciais para a produção e máximo rendimento de glucoamilase. Os resultados parecem ratificar a teoria de que a produção de glucoamilase é adaptativa. Resíduos agrícolas produzidos em grandes quantidades em indústrias de amido e outros produtos são discutidos. Farelo de arroz, seguido do melado de glicose, farelo do milho, do trigo e o melado da cana de açúcar permitem um bom rendimento da glucoamilase.

Enzymes of industrial or analytical usefulness may have increased applicability if they can be successfully produced. Large scale industrial use of enzyme is hampered by high cost and instability. In recent years, glucoamylase (α -1,4-glucan glucohydrolase, EC 3.2.1.3) has assumed considerable industrial importance because of its ability to hydrolyse starch nearly quantitatively to glucose with little formation of reversion products as compared to acid hydrolysis of starch^{2,6}. It catalyses the stepwise hydrolysis of

α -1,4-links in starch and oligosaccharides by releasing single glucose units from the non-reducing end of the molecule³. The α -1,6-links are also attacked so it is possible to achieve complete conversion of liquefied starch to glucose⁴.

So far, investigations on glucoamylase production were all confined to the use of crude materials i. e. corn mashes^{1,2}, with which the separate studies on basic variables are difficult. The purpose of this study was to investigate: (a) the specificity of the carbo-

* Presented in GIAM IV – Fourth International Conference on the Global Impacts of Applied Microbiology, São Paulo July 23–28, Brazil.

** Microbiological Research Unit, Agricultural Research Centre, Cairo, Egypt, A.R.E.

hydrate structure for glucoamylase synthesis, and (b) the utilization of molasses, wheat bran, rice bran, corn bran and glucose syrup produced locally in large quantities for glucoamylase production.

Materials and Methods

Strain: a preliminary screening program for high glucoamylase producing molds grown in submerged culture indicated that *Aspergillus awamori* was one of the most active. In these studies the *A. awamori* strain was used through out.

Culture conditions: fermentation was carried out in 500ml cottonplugged Erlenmeyer flasks, each containing 50ml of medium. The basal medium contained 1.5% casein hydrolysate, 0.1% potassium dihydrogen phosphate and 0.05% magnesium sulphate septahydrate⁵ to which various carbon sources were added. Temperature of fermentation was kept at 30°C. One percent of a 24hr old vegetative inoculum was used in the experiments. Aeration and agitation were obtained by shaking the fermentation flasks using incubated reciprocal shaker. Enzyme analysis were made after 96 hours.

Enzyme assay: alpha amylase was determined by the method of SKB⁷. Glucoamylase was determined by the method described in Tech. Bull. of Miles Lab⁸. A glucoamylase unit (GU) is the amount of enzyme that will catalyse, under the assay conditions described, the production of one gram glucose from four gram of Zulkowski starch substrate in one hour at 60°C.

Results

Non-Nitrogenous Carbon Sources: previous studies¹ reported the effect of a number of carbon sources supplemented to corn steep liquor on glucoamylase production. It was found that corn meal was highly satisfactory. Further, the results indicate that the type of the supplementary carbon sources influences the yield of glucoamylase. In a preliminary study, it was found that proteins did not support growth of the organism used in the present investigation. Therefore, the use of a supplementary carbon source was necessary. A number of types of organic compounds namely, mono-and poly-saccharides were tried. The fermentations were conducted under the described conditions. The media contained 1.5% casein hydrolysate as the sole source of nitrogen. The amounts of a non-nitrogenous carbon compounds added to the media were equivalent to 3% glucose (on carbon basis). The experimental results are given in Table 1. Of all the substances tried, maltose,

Table 1

Effect of non-nitrogenous carbon sources on the production of alpha-amylase and glucoamylase.

Non-nitrogenous carbon source	Enzyme activity	
	Alpha amylase (SKB/ml)	Glucoamylase (GU/ml)
Potato starch	1.25	5.00
Dextrin	0.90	4.20
Maltose	1.80	6.25
Sucrose	0.50	1.20
Lactose	0.65	0.90
Glucose	1.50	3.20
Fructose	0.30	1.00
Galactose	0.45	1.15

followed by starch, dextrin and glucose support satisfactory glucoamylase (GU) yields.

Maltose or compounds composed of maltose units gave the highest yields of the enzyme. Sucrose, lactose and galactose gave abundant growth which seemed to be a necessary but not sufficient condition for maximum enzyme yields. Comparing the two enzymes, the production of alpha amylase is the least dependent on the substrate while glucoamylase production was very sensitive to the type of the substrate present. Higher glucoamylase activities were obtained with maltose or substances containing maltose units. These results seemed to favor the theory that glucoamylase production is adaptive.

The specificity of the carbohydrate structure for glucoamylase production was further studied in media containing 3% carbohydrates (Table 2). The synthesis of glucoamylase was significantly stimulated when two-third of the starch in 3% starch medium was replaced by maltose. When all the starch was replaced by maltose (3%), the glucoamylase was stimulated. The adaptation seemed to be specific to the maltose structure since the substitution of maltose by structurally related compounds i.e. lactose in the medium did not give a comparable glucoamylase yield.

Utilization of agricultural by-product and wastes: results in Table 3 clearly show that when using wheat meal at a concentration of 15% plus corn steep liquor 2% (w/v) proved to be the best medium for the production of glucoamylase (14.4 GU). Considerable activity was also achieved by using 20% malted barley (14.04 GU), followed by a medium containing 15% malted barley plus 2% corn steep liquor (12.60 GU). Medium containing 15% corn meal plus 2% corn steep liquor is inferior in this respect (6.0 GU). Because of the nutritional value of grains, the medium consists of 10% rice bran plus 4% corn

Table 2

Specificity of the carbohydrate structure for glucoamylase synthesis.

Medium contents of carbohydrate	Enzyme activity	
	Alpha-amylase (SKB/ml)	Glucoamylase (GU/ml)
Maltose 3%	2.00	8.40
Maltose 1%, Glucose 2%	1.20	5.40
Glucose 3%	1.20	4.35
Sucrose 3%	0.30	1.80
Sucrose 1%, Glucose 1%, Fructose 1%	1.00	2.70
Glucose 1.5%, Fructose 1.5%	0.35	3.30
Fructose 3%	0.60	1.32
Lactose 3%	0.90	1.32
Lactose 1%, Glucose 1%, Galactose 1%	0.70	2.16
Glucose 1.5%, Galactose 1.5%	1.20	3.45
Galactose 3%	0.10	1.80
Starch 3%	3.50	4.50
Starch 1%, Maltose 2%	2.00	10.80
Starch 1%, Maltose 1%, Glucose 1%	2.30	6.90

Table 3

Different media for glucoamylase production

Medium	Glucoamylase (GU/ml)
Corn meal 15%, CSL 2%	6.00
Corn meal 20%	7.20
Wheat meal 15%, CSL 2%	14.40
Wheat meal 20%	9.00
Malted barley 15%, CSL 2%	12.60
Malted barley 20%	14.04
Rice bran 10%, CSL 4%	9.00

Table 4

Utilization of agricultural by-products for glucoamylase production by *Aspergillus awamori*.

Agriculture by-products*	Enzyme activity	
	Alpha-amylase (SKB)	Glucoamylase (GU)
Cane sugar molasses (24% C)	1.20	7.20
Wheat bran (16% C)	0.70	7.50
Rice bran (18% C)	1.00	9.00
Corn bran (16% C)	0.50	7.80
Glucose syrup (20% C)	0.40	8.26

* Agriculture by-products added to the medium consist of 1.5% casein hydrolysate, 0.1% KH_2PO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, in a concentration equivalent to 3% glucose (on carbon basis).

steep liquor (9.0 GU) was considered to be used in the commercial production of glucoamylase. Different agricultural by-products and waste were used as carbon sources i. e. cane sugar molasses, wheat bran, rice bran, corn bran and glucose syrup. These different carbon sources were added to the basal medium in amounts calculated to give final carbon concentration of 3% glucose (on carbon basis). Results in Table 4 show that the source of carbon affects the glucoamylase production. In general rice bran gave the highest enzyme yield (9.0 GU). This was followed in decreasing order by glucose syrup (8.26 GU), wheat bran (7.50 GU) and cane sugar molasses (7.20 GU).

It can generally be concluded from this experiment that rice bran was the best cheap carbon source. The reason for such a result could be due to its chemical constitution and to the nitrogen content which can balance carbon and nitrogen ratio in the medium.

References

1. ATTIA, R. M. & ALI, SAMIA A. — Production of glucoamylase by *Aspergillus awamori*. *Agric. Res. Rev.*, A. R. E. 51:201-206, 1973.
2. CADMUS, M. C.; JAYKO, L. G.; HENSLEY, D. E.; GASDORF, H. J. & SMILEY, K. L. — Enzymatic production of glucose syrup from grains and, its use in fermentations. *Cereal Chemistry*, 43:658-669, 1966.
3. PAZUR, J. H. & ANDO, T. — The action of α-amyloglucosidase of *Aspergillus niger* on starch and maltooligosaccharides. *J. Biol. Chem.*, 234:1966-1970, 1959.
4. PAZUR, J. H. & ANDO, T. — The hydrolysis of glucosyl oligosaccharides with α-D-(1-4) and α-D-(1-6) bonds by fungal Amyloglucosidase. *J. Biol. Chem.*, 235: 297, 1960.
5. SHU, P. & BLACKWOOD, A. C. — Studies on carbon and nitrogen sources for the production of amylolytic enzymes by submerged culture of *Aspergillus niger*. *Canad. J. Bot.*, 29:113-124, 1951.
6. SMILEY, K. L.; HENSLEY, D. E.; SMILEY, M. J. & GASDORF, H. J. — Kinetic patterns of glucoamylase isozymes isolated from *Aspergillus* species. *Arch. Bioch. Bioph.*, 144:694-699, 1971.
7. SANDSTEDT, R. M.; KNEEN, E. & BLISH, M. J. — A standardized Wohlgemuth procedure for α-amylase activity. *Cereal Chemistry*, 16:712-723, 1939.
8. TECHNICAL BULLETIN № 2-122, Miles Chemical Co., Elkhart, Ind., 1962.

Origem procariótica da mitocôndria

Sérgio Olavo Pinto da Costa*

Resumo

As teorias simbióticas e não simbióticas da origem da célula eucariótica e de suas mitocôndrias foram discutidas. Apesar de sugestivo e agradável, à primeira vista, o modelo endossimbiótico não é a única maneira de se explicar corretamente a origem da mitocôndria a partir de uma célula procariótica.

Summary

The prokaryotic origin of the mitochondria

The current symbiotic and non symbiotic theories of the origin of the eukaryotic cell and its mitochondria are discussed. Although suggestive and pleasing at first sight, the endosymbiotic model is by no means the only possible way to account adequately for the origin of the mitochondria from a prokaryotic cell.

Uma das características mais enigmáticas da organização celular eucariótica é a existência de genomas citoplasmáticos semi-autônomos, tais como mitocôndrias e cloroplastos. Essas organelas são capazes de crescer e dividir-se, e portanto são descendentes diretas de organelas preexistentes. O sistema de síntese de proteínas da mitocôndria (assim como do cloroplasto) apresenta grande semelhança com o de procariotos. Esses fatos levaram à grande aceitação de uma teoria proposta no século XIX, segundo a qual mitocôndria e cloroplasto teriam sua origem numa associação simbiótica de bactérias ou de algas cianofíceas ou azul-esverdeadas (no caso do cloroplasto), com o ancestral das células eucarióticas².

A mitocôndria contém seu próprio genoma e seu próprio mecanismo de síntese de proteínas, este último totalmente distinto do sistema núcleo-citoplasmático. Não obstante, com notável exceção dos tRNAs mitocondriais^{14,17} e dos rRNAs mitocondriais^{52,74}, o sistema mitocondrial de síntese de proteínas é grandemente codificado por genes nucleares. Certas enzimas da membrana interna mitocondrial contêm subunidades proteicas, parte sintetizadas no sistema proteico citoplasmático e parte no mitocondrial, como é o caso da citocromoxidase^{42,56}, do complexo ATPase sensível à rutamicina^{68,69} e, provavelmente, de um transportador de ATP mitocondrial^{27,48}.

Por outro lado, a maioria, senão todas as proteínas dos mitorribossomos, é codificada pelo núcleo e sintetizada nos citorribossomos. As proteínas mitorribosomais, por sua vez, são inteiramente distintas das encontradas nos citorribossomos, codificadas também no núcleo.

Um estudo sobre a origem procariótica da mitocôndria esbarra com grandes dificuldades, já que a maior descontinuidade existente entre seres vivos é a que separa células procarióticas de eucarióticas. Enquanto há ampla evidência bioquímica, indicadora de que essas duas classes não se desenvolveram independentemente, diferenças fundamentais em suas organizações básicas tornam extremamente difícil reconstruir suas histórias evolucionárias.

Nestes últimos anos, uma grande soma de conhecimentos, a nível molecular, estimularam a retomada da antiga teoria simbiótica da origem da mitocôndria, adquirindo, com isso, grande popularidade. Ao lado desses conhecimentos surgiu, mais recentemente, uma teoria alternativa referente à origem plasmídica da mitocôndria^{49,50}.

Sistema de síntese de proteínas mitocondrial e bacteriana

O sistema de síntese de proteína da mitocôndria, apesar de apresentar forte semelhança com o de células procarióticas, mostra algumas divergências

* Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

(Tab. 1). Mitorribossomos de ascomiceto são pouco maiores do que ribossomos de bactéria, e contêm algumas espécies de rRNA com peso molecular maior. Por outro lado, mitorribossomos de células animais são muito menores do que ribossomos de bactérias. Os rRNAs de mitocôndrias são peculiares em vários aspectos; são de baixo conteúdo em guanina mais citosina e aparentemente não metilados. Além do mais, o rRNA 5S (120 nucleotídos), encontrado em ribossomos de bactérias e de eucariotos, não o é em mitorribossomos.

Subunidades de mitorribossomos não se permitem com as de ribossomos bacterianos. No entanto, fatores proteicos de iniciação e de alongamento de mitocôndrias e bactérias parecem ser intercambiáveis^{7,8}. Mitorribossomos e ribossomos bacterianos são sensíveis ao cloranfenicol e a vários outros inibidores que não atuam sobre síntese de proteína citoplasmática de eucariotos. Além disso, drogas tais como cicloheximida, emetina e anisomicina, que inibem ribossomos eucarióticos, não apresentam esse efeito na síntese proteica de bactérias ou de mitocôndrias.

Os sistemas de síntese de proteína de bactérias e mitocôndria utilizam formilmetionil-tRNA em resposta ao codon de iniciação AUG. Formilmetionil-tRNA (fMet-tRNA^{f met}) inicia cadeias polipeptídicas nas mitocôndrias mas não em citoplasma euca-rioto⁶⁰. O interessante é que existem as duas espécies de metionil-tRNA no citoplasma de células eucarióticas, tRNA^{met} e tRNA^{f met*} (não carregado)^{30,39}. O metionil-tRNA^{f met*} pode ser formilado "in vitro" pela transformilase de *Escherichia coli*. Dessa maneira, o metionil-tRNA^{f met*} derivado de eucarioto (levedura) pode iniciar síntese de proteína em extratos de *E. coli* e, vice-versa, tRNA^{f met} de *E. coli* pode iniciar síntese de hemoglobina "in vitro"³⁰. Metionil-tRNA^{f met*} não formilado tem sua posição definida como iniciador de síntese de proteína no citoplasma de eucariotos^{30,32,59,73}. Provavelmente, o mecanismo de iniciação de síntese de proteínas citoplasmáticas contou, originalmente, com fMet-tRNA^{f met} até a perda da transformilase e subsequente conversão de tRNA^{f met} a tRNA^{met}, enquanto que as alterações, a partir do modelo procariótico, têm sido evolucionariamente

Tabela 1

Propriedades de sistemas de síntese de proteínas mitocondrial divergentes de sistemas de síntese de proteínas procariótica

Sítio	Bactérias	Sistema			Referências
		Mitocôndria de ascomicetos	Mitocôndria animal		
<i>Coefficiente de sedimentação (S)</i>					
Ribossomo	70	70–74	50–60		4, 5, 8
Subunidade grande	50	50–58	33–45		
Subunidade pequena	30	35–40	25–35		
<i>Pesos moleculares de rRNA</i>					
Subunidade grande	$1,10 \times 10^6$	$1,23\text{--}1,28 \times 10^6$	$0,65\text{--}0,95 \times 10^6$		5, 8
Subunidade pequena	$0,56 \times 10^6$	$0,63\text{--}0,79 \times 10^6$	$0,36\text{--}0,50 \times 10^6$		
<i>Guanina mais citosina (% do rRNA)</i>					
Subunidade grande	52–53	25–34	38–46		4, 5, 8
Subunidade pequena	52–54	27–38			
<i>Presença de RNA 5S</i>					
Ribossomo	Sim	Não	Não		37, 75
<i>Metilação de rRNA</i>					
	Sim	?	Não estabelecido		5, 6, 7, 8
<i>Permuta de subunidades com ribossomos de bactéria</i>					
	Sim	Não	?		7, 25
<i>Inibição da síntese de proteínas por ácido fusídico</i>					
	Sim	Não	?		7
<i>Efeito de NH₄Cl 120 mM</i>					
Estímulo máximo (<i>E. coli</i>)		Inibição (90%)	?		7, 25

conservadoras. Devido à longa coexistência, na célula, dos dois sistemas de síntese de proteínas, eles têm sido parte de duas unidades de seleção e divergiram tanto do modelo procarioto ancestral, como entre eles próprios. Assim, os mitorribossomos e citorribossomos mostram semelhanças e dissemelhanças em relação aos ribossomos procarióticos.

Considerando que a maioria, senão todas as proteínas ribosomais são codificadas pelo núcleo e sintetizadas em citorribossomos (Tab. 2), e que proteínas mitorribosomais são inteiramente distintas das proteínas dos ribossomos citoplasmáticos que também são codificadas no núcleo, pergunta-se qual a vantagem evolucionária em manter os dois diferentes sistemas de síntese de proteínas, quando se sabe que os produtos de síntese de proteína mitocondrial são poucos (aproximadamente 5%). Tal vantagem certamente existe, já que a síntese de proteínas mitocondriais tem sido mantida em células eucarióticas, da levedura ao homem, por aproximadamente 1,2 bilhões de anos de evolução eucariótica.

Modelo endossimbiótico bacteriano da origem da mitocôndria

As mais promissoras contribuições para esse modelo foram fornecidas recentemente por Sagan (agora Margulies)^{40,41,58} e discutido amplamente por Stanier⁶².

Os indícios fundamentais que levaram muitos a especular a origem evolucionária da mitocôndria (e de cloroplastos) foram a existência de genomas citoplasmáticos semi-autônomos e auto-replicadores nessas organelas, e a ocorrência de notável analogia entre bactérias e mitocôndrias, particularmente em relação a alguns aspectos de seus sistemas de síntese de proteínas.

Como essa idéia da associação simbiótica de bactérias e algas azul-esverdeadas com células ancestrais eucarióticas ganhou recentemente grande aceitação, serão examinados os argumentos que suportam essa teoria.

A Terra, durante seus cinco bilhões de anos, mostrou, em sua evolução, duas fases bem distintas: an-

Tabela 2

Localização intracelular de genes para proteínas de sistemas de DNA replicativo mitocondrial, RNA sintético e proteína sintética

Proteína	Função e Propriedades	Localização do gene	Referências
DNA polimerase (mamíferos, ascomicetos)	Polimerase distinta da enzima de núcleo	Núcleo	4, 43, 44
RNA polimerase (<i>Neurospora</i>)	Rifamicina sensível e amanitina insensível, portanto, semelhante à bactéria; polipeptídio simples: 64.000 daltons (menor polimerase conhecida)*	?	35, 72
(Levedura)	Sensível ao brometo de etídio	Núcleo	61, 67
(HeLa)	Transcrição simétrica** ; sensível ao brometo de etídio	?	7
Proteínas ribosomais (<i>Neurospora</i>)	30 na grande subunidade; 23 na pequena subunidade; todas distintas das proteínas ribosomais citoplasmáticas	Núcleo	8, 21, 34, 38
Fator de resistência à eritromicina (levedura)	Uma proteína ribosomal ou talvez um RNA modificado	Mitocondrial	25, 65
Fatores de iniciação da cadeia polipeptídica	Semelhante à bactéria	?	8
Fatores de elongação da cadeia polipeptídica (levedura)	Fatores necessários para a síntese de proteínas mitocondrial podem substituir os fatores de elongação de bactérias com ribossomos de bactérias	Núcleo	8, 47

* Polimerase de bactérias consiste em várias cadeias de polipeptídos;

** Esta é única; transcrições de bactérias e de núcleo são assimétricas.

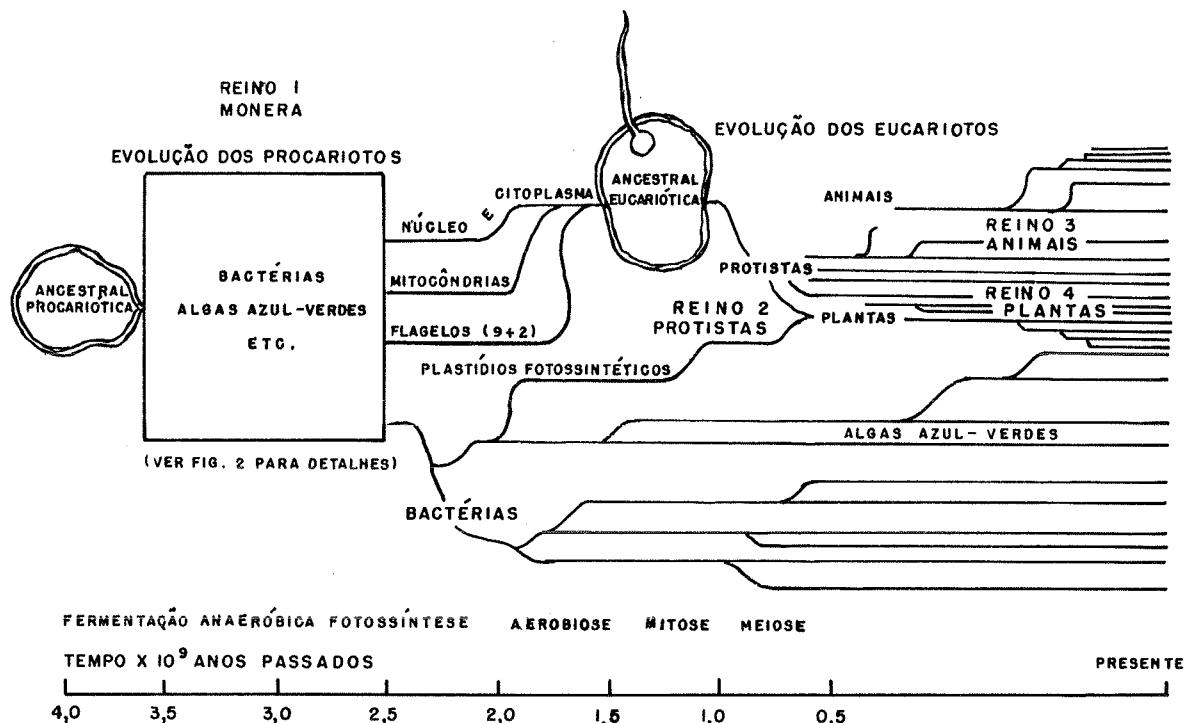


Fig. 1 – Representação esquemática da teoria simbiótica da origem das mitocôndrias e cloroplastos.

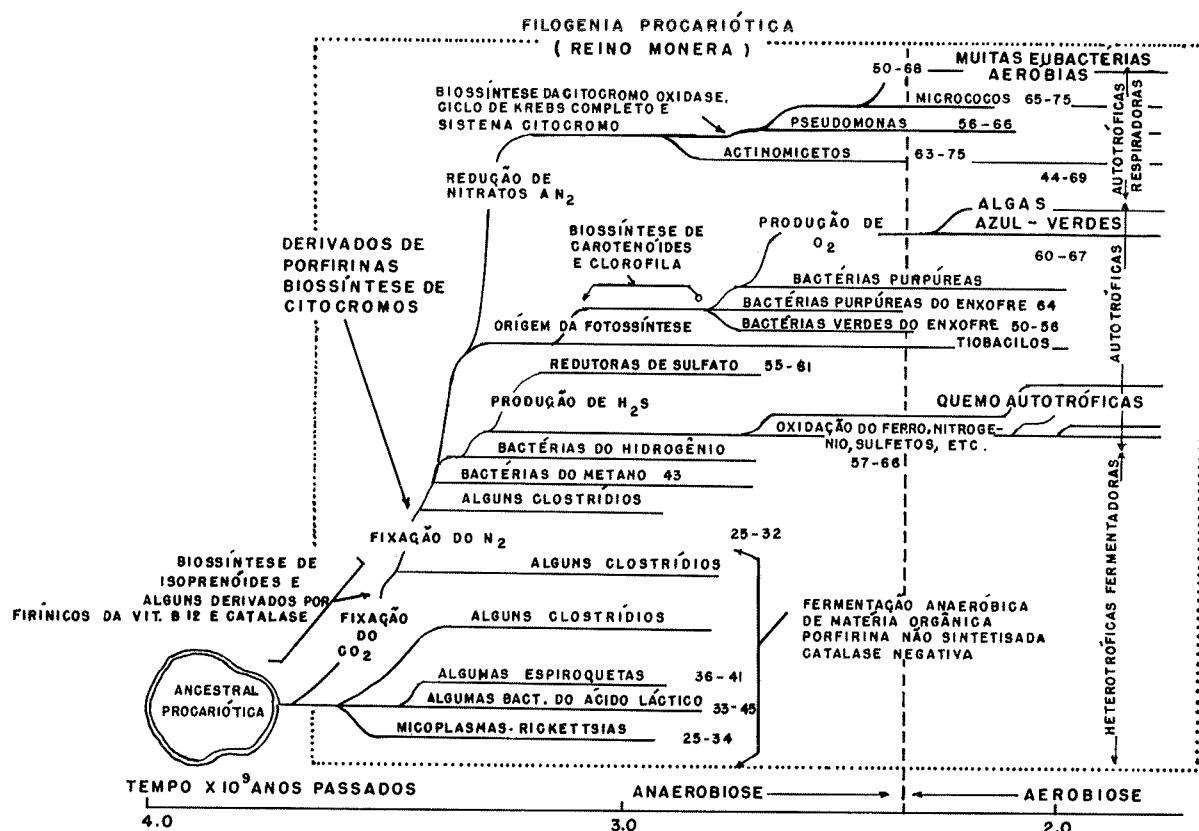


Fig. 2 – Diagrama representativo da evolução dos procariotos, baseado em Sagan⁵⁸. Os números representam freqüência de base G + C.

tes do aparecimento dos seres vivos, datada até mais ou menos três bilhões de anos atrás e, conforme prova o aparecimento de fósseis, depois do aparecimento dos seres vivos.

No primeiro período da existência da Terra, a atmosfera deveria estar reduzida, constituída de hidrogênio, nitrogênio, metano, dióxido de carbono, traços de amônia e vapor d'água. As células primitivas heterotróficas evoluíram, portanto, sob condições anaeróbicas da atmosfera terrestre (Figs. 1, 2). A fotodissociação do vapor d'água na atmosfera atuou como pressão seletiva, que resultou no desenvolvimento de seqüência de nucleotídios que codificaram para a síntese de porfirinas. Porfirinas queladas protegeram os ácidos nucleicos da oxidação e foram assim selecionados genes envolvidos na síntese dessa substância.

Dois tipos de células procarióticas então evoluíram. Um desenvolveu sistema respiratório primitivo, utilizando, talvez, nitratos e sulfatos como aceptores de elétrons — “respiradores anaeróbios” — e outro, um sistema fotossintético igualmente primitivo, com liberação crescente de oxigênio. Isso capacitou os respiradores anaeróbios a evoluírem o passo final da cadeia respiratória e oxidarem carboidratos completamente a dióxido de carbono e água, tornando-os assim “respiradores aeróbios” ou protomitocôndrias.

O fato de que as porfirinas queladas funcionaram como substâncias anti-mutagênicas e absorveram, preferencialmente, luz visível, fez com que ocorresse vantagem evolucionária; células eventualmente evoluíram, contendo mecanismos para produzir ATP (e outros nucleotídios), utilizando energia obtida da luz solar. Essas células, então fotossintéticas, substituíram as células iniciais, cujo ATP era sintetizado pela absorção direta da luz ultra-violeta. Com a energia liberada pelo ATP fotoproduzido, átomos de hidrogênio da atmosfera e do sulfeto de hidrogênio foram utilizados na redução do CO₂ para o material celular.

Com a produção contínua de oxigênio, através do processo fotossintético, a concentração de oxigênio da terra foi aumentando e acabou por se tornar abundante há aproximadamente 1,2 bilhões de anos. Todas as células foram se tornando cada vez mais adaptadas ao ambiente aeróbico, ou então tiveram que sobreviver em ambientes anaeróbicos especializados.

À medida que a população de heterotróficos aumentava, as substâncias orgânicas existentes nos oceanos, que lhes serviam de alimento, diminuíam. Durante um longo período de tempo, as radiações ultra-violeta teriam quebrado moléculas de água, originando pequenas quantidades de hidrogênio e oxigênio que ficaram livres na atmosfera. Essas mesmas radiações poderiam ter transformado o oxigênio em ozona; esse gás, concentrando-se na atmosfera supe-

rior, atuaria como absorvente das radiações ultra-violeta, privando, dessa maneira, a formação abiogênica da matéria orgânica e, ainda, oxidando rapidamente qualquer matéria orgânica.

Durante milhões de anos, à medida que o suprimento de alimento orgânico diminuía, a seleção natural agiu, dispondo um novo grupo de organismos que desenvolveram a capacidade de usar a luz solar para a síntese de alimento, capacidade essa que envolveu a conversão da energia luminosa em química. Os primeiros organismos capazes de usar a energia luminosa deveriam ter se comportado em parte como heterotróficos, utilizando compostos orgânicos para obter energia e, em parte, como autotróficos, absorvendo energia solar. Ainda hoje, existem certas bactérias que apresentam ambas as propriedades. São bactérias purpúreas que apresentam gotículas de enxofre, como resultado da foto-oxidação do H₂S, que antigamente eram consideradas heterotróficas e depois se descobriu que também eram capazes de usar energia solar. A conversão da energia luminosa em química foi essencial para a evolução dos autotróficos. A formação de clorofila ou de outros pigmentos capazes de absorver luz nos heterotróficos foi possivelmente o primeiro passo nessa evolução. As matérias primas usadas pela maioria dos autotróficos foram o dióxido de carbono e água. Com essas substâncias a célula, na presença da luz, é capaz de produzir carboidratos e desprender oxigênio como sub-produto.

Todas as formas de vida tornaram-se assim dependentes direta ou indiretamente da fotossíntese. Para sobreviver, os organismos heterotróficos anaeróbios foram forçados a utilizar matéria orgânica, produzida por processos fotossintéticos ou quimioautotróficos.

Isso fez sugerir que o primeiro passo na origem de eucariotos, a partir de procariotos, foi relacionado com a sobrevivência numa nova atmosfera contendo oxigênio. Uma endossimbiose ocorreu então, envolvendo procariotos aeróbios e anaeróbios, fenômeno esse que mais tarde se tornou obrigatório, presumivelmente através de uma série de passos de consolidação ao nível do DNA. Os organismos são referidos como “amebóides amitóticos aeróbios”: foi proposto ainda que, nessas células, todo metabolismo oxidativo ocorria dentro das “promitocôndrias simbóticas”, que usavam seus produtos de genes promitocondriais para sua construção.

O que aconteceu então foi a evolução desses primitivos organismos amebóides em eucariotos, um processo que envolveu uma profunda modificação do relacionamento simbótico entre os dois genomas.

A primeira aquisição simbótica foi produzir células com vias oxidativas de carboidratos. A degradação anaeróbia da glicose a piruvato ocorreu no cito-

plasma, sob a direção do genoma da célula hospedeira. Oxidação da glicose, utilizando oxigênio molecular, via ciclo de Krebs, ocorreu unicamente na mitocôndria simbótica, sob a direção de seus próprios genes.

Essa simbiose mitocôndria-célula hospedeira pode ter resultado na síntese da membrana fosfolipídica e de esteróides, e, em particular, na formação da membrana nuclear e retículo endoplasmático. A maior quantidade de energia, agora disponível, resultou em grandes células mais organizadas.

Os eucariotos fotossintéticos evoluíram de maneira análoga, por simbiose de bactérias e algas azul-esverdeadas, em células primitivas eucarióticas, já dotadas de mitocôndrias endossimbióticas.

Se a mitocôndria teve sua origem num microrganismo aeróbio, cabe a pergunta de como a célula hospedeira sobreviveu num ambiente anaeróbio, antes dessa simbiose. Qual seria o sistema respiratório da célula hospedeira antes de aceitar a endossimionte? De Duve & Baudhuin²² verificaram que os "microbodies" encontrados em células hepáticas e renais de mamíferos pertenciam, na realidade, à classe dos peroxissomos ou glioxissomos; o termo peroxissomos foi usado desde que se verificou que continha, em sua estrutura, enzimas que tanto formavam como decompunham peróxido de hidrogênio. Essas partículas seriam sítios importantes do metabolismo do peróxido de hidrogênio e a associação de oxidases com catalase teria grande significado biológico. Os peroxissomos contêm oxidases que reduzem o oxigênio a peróxido de hidrogênio, por conta de um substrato, RH₂, e catalase que reduz o peróxido de hidrogênio à água, por dois processos: (a) mecanismo peroxidático, requerendo um doador de elétrons RH₂; e (b) mecanismo pelo qual uma segunda molécula de peróxido de hidrogênio serve como doador de elétrons.

Outras enzimas estão presentes nos peroxissomos, tais como D-aminoácidos oxidases, urato oxidase, L- α -hidroxiácido oxidase. Foi proposto um esquema onde essas enzimas, atuando em conjunto, poderiam fornecer um mecanismo para oxidação do NADH não mitocondrial. Considerando que as D-aminoácidos oxidases são enzimas anômalas, porque atuam sobre D-aminoácidos e não sobre os de forma L, normais e comuns, acredita-se que elas representem vias enzimáticas resquiciais de oxidação de substâncias que não mais ocorrem na célula. Se outros componentes enzimáticos dos peroxissomos forem analisados, verifica-se que esse fenômeno é mais ou menos geral. A catalase pode ser considerada uma enzima fóssil¹⁵. Realmente, indivíduos portadores de acatalasia⁶⁴ podem sobreviver com poucos sintomas patológicos, com somente traços dessa enzima, certamente quantidade insuficiente para participar efetivamente nas oxidações acreditadas terem lugar nos

peroxissomos. A enzima urato oxidase é dispensável, ausente, em numerosas espécies, inclusive na humana. Em vista desses fatos, De Duve & Baudhuin²² sugerem que peroxissomo constitui uma "organela fóssil" ou seja, partícula respiratória "fóssil" que foi ativa no início da evolução, característica de células hospedeiras nucleadas que sobreviveram sob condições aeróbias. Após a infecção da célula hospedeira por microrganismos aeróbios, os peroxissomos perderam muito de suas funções e agora constituem partículas vestigiais.

Origem plasmídica da mitocôndria

Enquanto que o modelo simbótico supõe a existência de um protoeucarioto anaeróbio que adquiriu um endossimbionte respiratório, o modelo não simbótico de origem plasmídica da mitocôndria^{49,50} propõe o protoeucarioto como sendo uma célula aeróbia avançada, maior do que a procariótica típica. Essa tendência para maior tamanho necessitou, ao lado de muitas alterações na organização celular, de um aumento da superfície da membrana respiratória. Isso foi adquirido inicialmente através de invaginação da membrana interna (Fig. 3) e ultimamente pela formação de vesículas geradas nesses processos invaginativos da membrana.

As partículas respiratórias assim constituídas eram providas de barreira de permeabilidade seletiva entre os elementos respiratórios e o citoplasma. Contudo, essa barreira de permeabilidade impõe um problema para a célula, já que alguns constituintes da cadeia respiratória, como por exemplo elementos

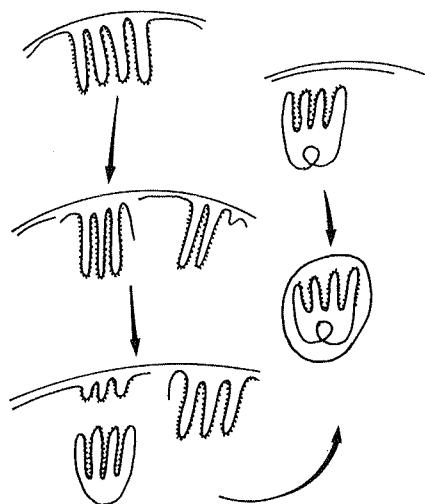


Fig. 3 — Modelo representativo da origem não simbótica ou plasmídica da mitocôndria (Raff & Mahler⁵⁰) envolvendo os vários passos da organização mitocondrial a partir da membrana dotada de atividade respiratória da célula protoeucariótica e subsequente aquisição de plasmídio transportando alguns genes destinados à informação de elementos usados na síntese de proteínas mitocondrial.

da citocromoxidase, requeriam síntese "in situ". Enquanto que a membrana era permeável a muitas proteínas, inclusive citocromo *c* e enzimas das seqüências respiratória e fosforilativa, era impermeável aos ribossomos e RNAs ribossômicos. Assim, as organelas respiratórias requeriam constantes renovações "de novo" da membrana da célula, o que tornava um processo não econômico. Teria sido para a célula uma considerável vantagem implantar um sistema de síntese de proteína dentro da organela, para a sua manutenção.

A implantação de um sistema de síntese de proteína, no interior da organela respiratória, foi conseguida através da simples incorporação de um plasmídio contendo genes apropriados. Um processo análogo ocorre na geração de múltiplos nucléolos durante a ovogênese de anfíbios. Nesse processo, são feitas múltiplas réplicas de genes de configuração circular a partir de genes cromossômicos de rRNA, que são envolvidos em nucléolos livres^{10,12}. O plasmídio hipotético da organela respiratória do protoeucarioto pode não ter sido originado por esse mesmo mecanismo, mas esse exemplo serve para mostrar que o plasmídio organelar proposto não é tão artificial e tem um correspondente conhecido.

A célula procariótica possui mesossomos que são organelas membranosas equivalentes às mitocôndrias. Mesossomos constituem sítios de várias atividades redutásicas⁷⁰ e os citocromos estão localizados preferencialmente neles²³.

A replicação de cromossomos e plasmídios bacterianos envolve, aparentemente, sítios de replicação localizados na membrana^{28,31,33,53}. A célula pro-

toeucariótica possuiria essa organela que sofreu modificação evolucionária. Essa organela deveria possuir um sítio para replicação do plasmídio, o qual teria sido disponível para a ligação do plasmídio hipotético do modelo.

Por outro lado, várias propriedades dos plasmídios suportam a idéia de que são ancestrais do genoma mitocondrial (Tab. 3). Eles são de tamanho semelhante ao DNA mitocondrial de forma circular, super-helicoidal e são alterados por drogas comuns. Além do mais, são capazes de replicação autônoma na bactéria. Além de genes envolvidos na replicação, os plasmídios contêm outros genes capazes de interações com genes cromossômicos. Essa integração é freqüentemente reversível. Ocorre assim um contínuo fluxo de informação genética entre cromossomos e plasmídios. A incorporação de genes em plasmídios pode não se restringir somente a genes responsáveis pela resistência a antibióticos e outros produtos metabólicos, mas estender-se a genes para rRNA, tRNA e para várias proteínas de membrana. Realmente, genes para tRNA foram encontrados numa classe de plasmídios, os fagos temperados⁵⁷. A geração de um plasmídio contendo apropriados genes teria sido um meio eficiente para explicar interações plasmídio-nucleares e a subsequente incorporação de um sistema de síntese de proteína na organela respiratória de uma célula protoeucariótica, durante uma pressão seletiva.

Esses eventos não são particularmente raros e numa população natural sujeita a pressões seletivas evidenciam genes vantajosos que muito rapidamente se tornam aparentes.

Tabela 3

Características dos plasmídios

Características	Observações	Referências
Pesos moleculares	$1,5 \times 10^6$ a $1,0 \times 10^8$ daltons	28
Conformação	Duplo fio circular, superhelicoidal	28, 53
Distribuição	Eubacteria, bactérias fotossintéticas	28
Quantidade de DNA plasmídico por célula	Varia com plasmídio e hospedeiro; deve ser de 1 a 30 ou mais cópias por célula ou até 40% da célula de DNA total	19, 28
Replicação	Pontos prováveis de replicação específica na membrana; estabilidade de mutantes plasmídicos ligada tanto ao plasmídio como ao cromossomo	20, 28, 33, 46, 53
Conteúdo genômico de vários plasmídios	Genes de replicação, fator sexual, fatores colicinogênicos, variedade de genes para resistência a antibióticos, vários genes obtidos do cromossomo de bactéria (<i>lac</i> , <i>gal</i> , <i>trp</i> , <i>cysB</i>)	3, 9, 13, 20, 53, 71
Efeito da acriflavina e do brometo de etídio	Plasmídio eliminado do hospedeiro	53

Considerações

A hipótese endossimbiônica da origem da mitocôndria tem alguns aspectos negativos. Primeiramente, a célula protoeucariótica anaeróbica, apesar de muitas adaptações celulares avançadas, teria sido primitiva e ineficiente metabolicamente. A competição com procariotos possuindo vias produtoras de energia aeróbica mais eficientes, onde já se previam modelos observados hoje, a teria deixado em considerável desvantagem. Em segundo lugar, integração da protomitocôndria endossimbionte requereu transferência de genes do genoma endossimbiônico para um genoma nuclear não relacionado. Um mecanismo pelo qual esse objetivo tenha sido conseguido é extremamente difícil de se conceber. Outros aspectos da teoria endossimbiônica parecem ainda um tanto improváveis, tais como a origem dos cílios a partir de espiroquetas, implicando numa homologia não existente entre flagelina e proteína do microtúbulo^{63,66} e a origem de cloroplastos como sendo de três grupos inteiramente distintos de procariotos fotossintéticos, sendo dois deles hipotéticos⁵¹.

De acordo com o modelo não simbótico, a transferência de genes ocorreu na célula protoeucariótica, no sentido núcleo para plasmídio. O plasmídio que deveria conter inicialmente somente um número mínimo de genes necessários para a sua replicação foi dotado de outros, tais como os genes para rRNAs e tRNAs.

A compreensão das interações plasmídio-núcleo estão cada vez se tornando mais claras, depois do conhecimento recente de construção de genomas recombinantes de DNA "in vitro", onde se tem criado novos tipos de plasmídios bacterianos funcionais, transportando marcas de resistência a antibióticos^{16,18}. A integração de DNA ribossomal de *Xenopus laevis* ao DNA de plasmídio bacteriano também já foi conseguida. O plasmídio recombinante foi capaz de ser replicado de maneira estável em *E. coli*, onde transcreveu RNA que é complementar ao DNA ribossomal de *X. laevis*⁴⁵. De maneira semelhante, segmentos de DNA cromossomal de *Drosophila* foram incorporados em DNAs de plasmídio e bacteriófago, resultando moléculas híbridas que puderam in-

fectar e replicar em *E. coli*²⁹.

Ocorrem, no entanto, algumas propriedades divergentes da expressão gênica em mitocôndria, tais como o sistema transcritivo (Tab. 2). Esse sistema apresenta-se com várias características não encontradas nem na transcrição nuclear, nem na transcrição bacteriana. Em particular, a RNA polimerase mitocondrial da *Neurospora*³⁵ assemelha-se à RNA polimerase nucleolar de eucarioto e à RNA polimerase bacteriana, em relação à insensibilidade à α -amanitina que é, por sua vez, um potente inibidor da RNA polimerase nuclear de eucarioto^{36,54,55}. Como a bacteriana, a RNA polimerase mitocondrial é sensível à rifamicina. Contudo, a RNA polimerase mitocondrial é constituída somente de uma cadeia polipeptídica dotada de peso molecular 64.000, sendo assim a menor polimerase conhecida. Não se sabe se o gene para essa enzima é nuclear ou mitocondrial, mas há uma certa evidência de que, no caso da RNA polimerase mitocondrial de levedura, seja nuclear⁷⁴.

O processo de transcrição mitocondrial (pelo menos em mitocôndrias de mamíferos) é sem igual. Transcrição em mitocôndria de células HeLa é simétrica, enquanto as transcrições bacteriana e nuclear são assimétricas¹. Somente um dos transcritos é realmente utilizado; o transrito do outro fio é degradado. As proteínas componentes do sistema de síntese de proteínas mitocondrial são também quase todos produtos de genes nucleares (Tab. 1).

A sugestão de Raff & Mahler⁵⁰ é que essa mistura de propriedades bactéria-mitocôndria constitui um produto evolucionário de dois diferentes eventos. Primeiro, desenvolveram os sistemas de interações nuclear-plasmídico (ou nuclear-mitocondrial) e nuclear-citoplasmático numa célula procariótica e assim a evolução divergente desses dois sistemas utilizou o mesmo material de partida. Em muitas situações, o sistema nuclear-mitocondrial tem sido mais conservativo. Segundo, os requisitos regulatórios dos dois sistemas são provavelmente bem diferentes e o mais simples modo de manejá-los é utilizar componentes separados. Assim, encontra-se as diferentes RNA polimerases mitocondrial e nuclear, embora os genes para ambas possam ser nucleares.

Referências Bibliográficas

- ALONI, Y. & ATTARDI, G. — Symmetrical *in vivo* transcription of mitochondrial DNA in HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 68: 1757-1759, 1971.
- ALTMANN, R. — Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen. Leipzig: Veit und Comp. 1890
- ANDERSON, E.S. — The ecology of transferable drug resistance in the Enterobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, 22: 131-180, 1968.
- ASHWELL, M. & WORK, T.S. — The biogenesis of mitochondria. *Ann. Rev. Biochem.*, 39: 251-290, 1970.
- ATTARDI, G. & AMALDI, F. — Structure and synthesis of ribosomal RNA. *Ann. Rev. Biochem.*, 39: 183-226, 1970.
- ATTARDI, B. & ATTARDI, G. — Expression of the mitochondria genome in HeLa cells. Properties of the discrete RNA components from the mitochondria fraction. *J. Mol. Biol.*, 55: 231-236, 1971.

7. BORST, P. — Mitochondrial nucleic acids. *Ann. Rev. Biochem.*, 41: 333-376, 1972.
8. BORST, P. & GRIVELL, L.A. — Mitochondrial ribosomes. *FEBS Lett.*, 13: 73-88, 1971.
9. BRODA, P.; BECKWITH, J.R. & SCAIFE, J. — The characterization of a new type of F-prime factor in *Escherichia coli* K12. *Genet. Res.*, 5: 489-494, 1964.
10. BROWN, D.D. & DAWID, I.B. — Specific gene amplification in oocytes. *Science*, 160: 272-275, 1968.
11. BROWN, J.C. & SMITH, A.E. — Initiator codons in eukaryotes. *Nature*, 226: 610-612, 1970.
12. BROWN, D.D. & BLACKLER, A.W. — Gene amplification proceeds by a chromosome copy mechanism. *J. Mol. Biol.*, 63: 75-83, 1972.
13. CAMPBELL, A. — Episomes. *Adv. in Genetics*, 11: 101-125, 1962.
14. CASEY, J.; COHEN, M.; RABINOWITZ, M.; FUKUHARA, H. & GETZ, G.S. — Hybridization of mitochondrial transfer RNA's with mitochondrial and nuclear DNA of grande (wild type) yeast. *J. Mol. Biol.*, 63: 431-440, 1972.
15. CHANCE, B. — The iron-containing enzymes. The enzyme-substrate compound and mechanism of action of the hydroperoxidase. In SUMNER, J.B. & MYRBACK, K. — The enzymes. New York, Academic Press, 1951. vol. 2, p. 428-453.
16. CHANG, A.C. & COHEN, S.N. — Genome construction between bacterial species *in vitro* in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 71: 1030-1034, 1974.
17. COHEN, M.; CASEY, J.; RABINOWITZ, M. & GETZ, C.S. — Hybridization of mitochondrial transfer RNA and mitochondrial in petite mutants of yeast. *J. Mol. Biol.*, 63: 441-451, 1972.
18. COHEN, S.N.; CHANG, A.C.Y.; BOYER, H.W. & HELLING, R. — Construction of biologically bacterial plasmids *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 70: 3240-3244, 1973.
19. COUDRAY, Y.; QUETIER, F. & GUILLE, E. — New compilation of satellite DNA's. *Biochim. Biophys. Acta*, 217: 259-267, 1970.
20. CUZIN, F. & JACOB, F. — Analyse génétique fonctionnelle de l'épisode sexuel d' *Escherichia coli* K 12. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 260: 2087-2080, 1965.
21. DAVEY, P.J.; YU, R. & LINNANE, A.W. — The intracellular site of formation of mitochondrial protein synthetic system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 36: 30-34, 1969.
22. DeDUVE, C. & BAUDHUIM, P. — Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol. Rev.*, 43: 323-357, 1966.
23. FERRANDES, B.; CHAIX, P. & RYTER, A. — Localization des cytochromes de *Bacillus subtilis* dans les structures misomiques. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 263: 1632-1635, 1966.
24. GRANDI, M.; HELMS, A. & KUNTZEL, H. — Fusidic acid resistance of mitochondrial G factor from *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 44: 864-871, 1971.
25. GRIVELL, L.A. & REIJNDERS, L. — Altered mitochondrial ribosomes in a cytoplasmic mutant of yeast. *FEBS Lett.*, 16: 159-163, 1971.
26. GRIVELL, L.A.; REIJNDERS, L. & BORST, P. — Isolation of yeast mitochondrial ribosome highly active in protein synthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 247: 91-103, 1971.
27. HASLAM, J.M.; PERKINS, M. & LINNANE, A.W. — Biogenesis of mitochondria. A requirement for mitochondrial protein synthesis for the formation of a normal adenine nucleotide transporter in yeast mitochondria. *Biochem. J.*, 134: 935-947, 1973.
28. HELINSKI, D.R. & CLEWELL, D.B. — Circular DNA. *Ann. Rev. Biochem.*, 40: 899-942, 1971.
29. HOGNESS, D.S. — Potential biohazards of recombination DNA molecules. *Science*, 185: 303, 1974.
30. HOUSMAN, D.; JACOBS — LORENA, M.; RAJBHANDARY, U.L. & LODISH, H.F. — Initiation of haemoglobin synthesis by methionyl-tRNA. *Nature*, 227: 913-919, 1970.
31. HUGHES, D.E.; LLOYD, D. & BRIGHTWELL, R. — In CHARLES, H.P. & KNIGHT, B.C.J.G. — eds. — Organization and control in prokaryotic and eukaryotic cells. Cambridge, Cambridge University Press, 1970.
32. JACKSON, R. & HUNTER, T. — Role of methionine in the initiation of haemoglobin synthesis. *Nature*, 227: 672-676, 1970.
33. JACOB, F.; BRENNER, S. & CUZIN, F. — On the regulation of DNA replication in bacteria. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 28: 329-333, 1963.
34. KUNTZEL, H. — Proteins of mitochondrial and cytoplasmic ribosomes from *Neurospora crassa*. *Nature*, 222: 142-144, 1969.
35. KUNTZEL, H. & SCHAFER, K.P. — Mitochondrial RNA polymerase from *Neurospora crassa*. *Nature New Biol.*, 231: 265-268, 1971.
36. LINDELL, T.J.; WEINBERG, F.; MORRIS, P.W.; ROEDER, R.G. & RUTTER, W.J. — Specific inhibition of nuclear RNA polymerase II by α -amanitin. *Science*, 170: 447-449, 1970.
37. LIZARDI, P.M. & LUCK, D.J.L. — Absence of a 5S RNA component in the mitochondrial ribosomes of *Neurospora crassa*. *Nature New Biol.*, 229: 140-142, 1971.
38. LIZARDI, P.M. & LUCK, D.J.L. — *Abstracts*, 11th Annual Meeting of the American Society of Cell Biology, 1971. p. 170.
39. LUCAS-LEONARD, J. & LIPPMANN, F. — Protein biosynthesis. *Ann. Rev. Biochem.* 40: 407-409, 1971.
40. MARGULIS, L. — Evolutionary criteria in Thallophytes: a radical alternative. *Science*, 161: 1020-1022, 1968.
41. MARGULIS, L. — Origin of eukaryotic cells. New Haven, Yale Univ. Press, 1970. 349p.
42. MASON, T.L. & SCHATZ, G. — Cytochrome c oxidase from baker's yeast. II. Site of translation of the protein components. *J. Biol. Chem.*, 248: 1355-1360, 1973.
43. MEYER, R.R. & SIMPSON, M.V. — DNA biosynthesis in mitochondria: partial purification of a distinct DNA polymerase from isolated rat liver mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 61: 130-137, 1968.
44. MEYER, R.R. & SIMPSON, M. — DNA biosynthesis in mitochondria: differential inhibition of mitochondrial and nuclear DNA polymerase by the mutagenic dyes acriflavin and ethidium bromide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 34: 238-244, 1969.

45. MORROW, J.F.; COHEN, S.N.; CHANG, A.C.Y.; BOYER, H.W.; GOODMAN, H.M. & HELLING, R.B. — Replication and transcription of eukaryotic DNA in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 71: 1743-1747, 1974.
46. NOVICK, R.P. — 6th Congr. Chemotherapy. Vienna, 1967. p. 269.
47. PARISI, B. & CELLA, R. — Origin of the ribosome specific factors responsible for peptide chain elongation in yeast. *FEBS Lett.*, 14: 209-212, 1971.
48. PERKINS, M.E.; HASLAM, J.M.; KLYCE, H.R. & LINNANE, A.W. — Bongrekic acid resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, 36: 137-142, 1973.
49. PERLMAN, P.S. & MAHLER, H.R. — Formation of yeast mitochondria. III. Biochemical properties of mitochondria isolated from a cytoplasmic petite mutant. *J. Bioenerg.*, 1: 113-125, 1970.
50. RAFF, R.A. & MAHLER, H.R. — The non-symbiotic origin of mitochondria. *Science*, 177: 575-582, 1972.
51. RAVEN, P.H. — A multiple origin for plastids and mitochondria. *Science*, 169: 641-646, 1970.
52. REIJNDERS, L.; KLEISEN, C.M.; GRIVELL, L.A. & BORST, P. — Hybridization studies with yeast mitochondrial RNAs. *Biochim. Biophys. Acta*, 272: 396-407, 1972.
53. RICHMOND, M.H. — In CHARLES, H.P. & KNIGHT, B.C.J.G. — eds. — Organization and control in prokaryotic and eukaryotic cells. Cambridge, Cambridge University Press, 1970.
54. ROEDER, R.G. & RUTTER, W.J. — Multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase in eukaryotic organisms. *Nature*, 224: 234-237, 1969.
55. ROEDER, R.G. & RUTTER, W. — Multiple ribonucleic acid polymerases and ribonucleic acid synthesis during sea-urchin development. *Biochem.*, 9: 2543-2553, 1970.
56. RUBIN, M.S. & TZAGOLOFF, A. — Assembly of the mitochondrial synthesis of three of the subunit protein of yeast cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem.*, 248: 4275-4279, 1973.
57. RUSSELL, R.L.; ABELSON, J.N.; LANDY, A.; GEFTER, M.L.; BRENNER, S. & SMITH, J.D. — Duplicate genes for tyrosine transfer RNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 47: 1-13, 1970.
58. SAGAN, L. — On the origin of mitosing cells. *J. Theoret. Biol.*, 14: 225-274, 1967.
59. SMITH, A.E. & MARCKER, K.A. — Cytoplasmic methionine transfer RNAs from eukaryotes. *Nature*, 226: 607-610, 1970.
60. SMITH, A.E. & MARCKER, K.A. — N-formyl-methionine transfer in RNA in mitochondria from yeast and rat liver. *J. Mol. Biol.*, 38: 241-245, 1968.
61. SOUTH, D.J. & MAHLER, R. — RNA synthesis in yeast mitochondria: a derepressible activity. *Nature*, 218: 1226-1228, 1968.
62. STANIER, R.Y. — In CHARLES, H.P. & KNIGHT, B.C.J.G. — Organization and control in prokaryotic and eukaryotic cells. Cambridge, University of Cambridge Press, 1970. 275 p.
63. STEFENS, R.E. — Thermal fractionation of outer fiber doublet, microtubules into A and B subfiber components: A and B tubulin. *J. Mol. Biol.*, 47: 353-363, 1970.
64. TAKAHARA, S. & MIJAMOTO, H. — Three cases of progressive oral gangrene due to lack of catalase. *J. Otorhinolaryngol. Soc.*, 51: 165-167, 1948.
65. THOMAS, D.Y. & WILKIE, D. — Inhibition of mitochondrial synthesis in yeast by erythromycin: cytoplasmic and nuclear factors controlling resistance. *Genet. Res.*, 11: 33-41, 1968.
66. TILNEY, L.G. — In REINERT, J. & URSPRUNG, H. — eds. — Origin and continuity of cell organelles. New York, Springer-Verlag, 1971. 253p.
67. TSAI, M.J.; MICHAELIS, G. & CRIDDLE, R.S. — DNA-dependent RNA polymerase from yeast mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 68: 473-477, 1971.
68. TZAGOLOFF, A. — Assembly of the mitochondrial membrane system. III. Function and synthesis of oligomycin sensitivity conferring protein of yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 245: 1545-1551, 1970.
69. TZAGOLOFF, A.; AKAI, A. & SIERRA, M.F. — Assembly of mitochondrial membrane system. VII. Synthesis and integration of F₁ subunits into the rutamycin-sensitive adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.*, 247: 6511-6516, 1972.
70. VANITERSON, W. — Symposium on the fine structure and replication of bacteria and their parts. II. Bacterial cytoplasm. *Bacteriol. Rev.*, 29: 299-351, 1965.
71. WATANABE, T. — Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 27: 87-115, 1963.
72. WATSON, J.D. — Molecular biology of the gene. New York, Benjamin, 1970. 2nd ed. 662p.
73. WIGLE, D.T. & DIXON, G.H. — Transient incorporation of methionine at N-terminus of protamine newly synthesized in trout testis cells. *Nature*, 227: 676-680, 1970.
74. WINTERSBERGER, E. & VIEHHAUSER, G. — Function of mitochondrial DNA in yeast. *Nature*, 220: 699-702, 1968.
75. ZYLBER, E. & PENMAN, S. — Mitochondrial associated 5S RNA synthesis inhibition by ethidium bromide. *J. Mol. Biol.*, 46: 201-204, 1969.

Volume 5, Número 1 — Janeiro/Março, 1974**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 ascosporos 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 [<i>Portuguese standards for foods</i>] — A.M.R. Ribeiro	17

Volume 5, Número 2 — Abril/Junho, 1974**Artigos originais**

Características culturais, bioquímicas, sorológicas e virulência de amostras de <i>Salmonella typhimurium</i> fermentadoras de lactose [Cultural, biochemical and serological behavior of lactose fermenting strains of <i>Salmonella typhimurium</i> and its virulence] — 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 [Microbiological activity of radioactive soils] — Luiz Fernando de T.L. Linhares & Adam Drozdowicz	43

Volume 5, Número 3 — Julho/Setembro, 1974**Artigos originais**

Yeasts associated with cacao (<i>Theobroma cacao</i>) pods — S.I. Faparusi	49
Pruebas de imunodifusión para identificación de sangre ingerida por garrapatas [Immunodiffusion tests for identification of blood ingested by ticks] — Eduarda Fca. Daniel Sandoval	55
Isolamento de micobactérias atípicas a partir de gânglios linfáticos de suínos [Isolation of atypical mycobacteria from lymph nodes of swines] — Paulo Pinto Gontijo Filho, Dirceu do Nascimento & Leila de Souza Fonseca	59
The production of soil pores by bacteria — D.B. Arkcoll	63
Monitoring for the kerosene fungus <i>Amorphoteca resiniae</i> — J.E. Sheridan	67

Volume 5, Número 4 — Outubro/Dezembro, 1974**Artigos originais**

Effect of pesticides on nitrogen fixation by blue-green algae — Edgar J. DaSilva, Lars-Erik Henriksson & Elisabet Henriksson	73
Algae in American sewage stabilization ponds — C. Mervin Palmer	75
Utilization of agricultural wastes by <i>Aspergillus awamori</i> for the production of glucoamylase — R.M. Attia & Samia A. Ali	81

Revisão

Origem procariótica da mitocôndria [The prokaryotic origin of the mitochondria] — Sérgio Olavo Pinto da Costa	85
---	----

