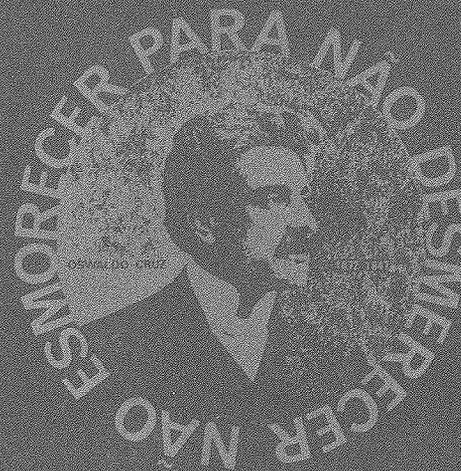


Volume 6 Número 2 Abr.-Jun. 1975

# Revista de Microbiologia

Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia  
São Paulo – Brasil



# Jarras GasPak

nova dimensão  
no sistema

## BBL

para anaeróbios

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

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

### PRINCÍPIO

As jarras GasPak permitem a obtenção de uma anaerobiose perfeita, numa hora, sem auxílio de qualquer aparelho anexo. Em policarbonato, material transparente, autoclavável, realizam as condições ótimas de higiene e visualidade.

Os envelopes GasPak são geradores de hidrogênio e de gás carbônico que permitem realizar, sem bomba de vácuo, uma atmosfera inerte no interior da Jarra Anaeróbia.

Os dois componentes de base são:

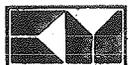
- Um gerador de hidrogênio + um gerador de gás carbônico.
- Um catalisador de paládio agindo à temperatura ambiente.

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

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

Para maiores detalhes, consultar o nosso

Departamento de Microbiologia.



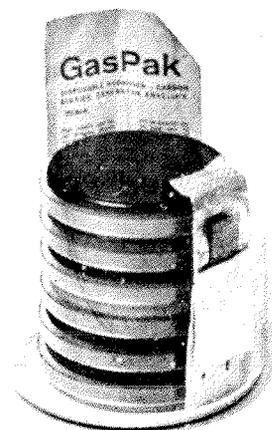
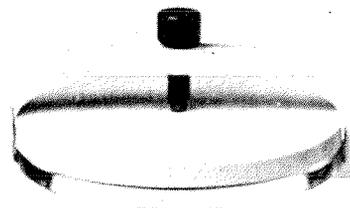
**BIOLAB-MÉRIEUX**

PRODUTOS PARA LABORATÓRIOS LTDA

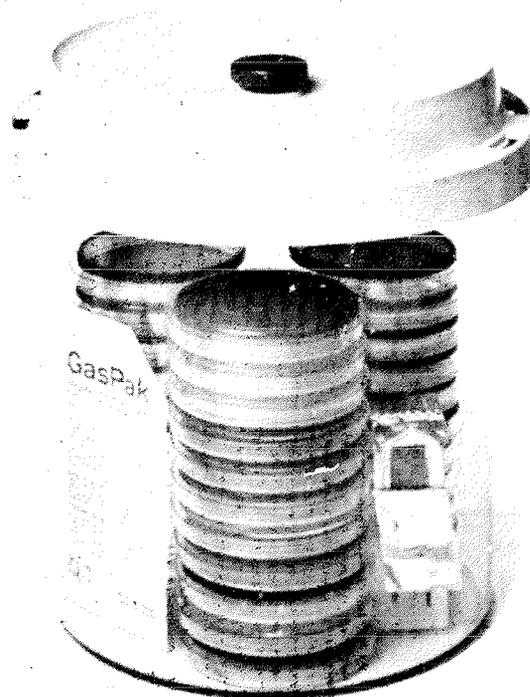
Rua do Resende, 96-A - Gr. 201 e 202. Tels.: 221-4089 e 242-0050

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

São Paulo - Brasília - Porto Alegre - Niterói - Recife



JARRA ANAERÓBIA "100"



JARRA ANAERÓBIA "150"



# Revista de Microbiologia

Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia  
São Paulo – Brasil

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

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

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

**Aquisição por não-membros** Assinatura anual para quatro números: Cr\$ 120,00 para o Brasil; US\$ 20,00 (via marítima) ou US\$ 25,00 (via aérea) para o Exterior. Números avulsos: Cr\$ 30,00 para o Brasil e US\$ 6,50 (via aérea) ou US\$ 5,00 (via marítima) para o Exterior. Cheques ou ordens de pagamento em nome da Sociedade Brasileira de Microbiologia, para o endereço do Editor.

**Acquisition by non-members** Annual subscription for four numbers: US\$ 20,00 (surface mail) or US\$ 25,00 (air mail). Single copies: US\$ 6,50 (air mail) or US\$ 5,00 (surface mail). Checks or money orders for Sociedade Brasileira de Microbiologia, addressed to the Editor's office.

## Sociedade Brasileira de Microbiologia

**Diretoria** Gobert 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 Castillon (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 (Niterói). SANTA CATARINA: Aquilles A. Cordova Santos (Florianópolis). SÃO PAULO: Deise Pasetto Falcão (Araraquara). Vicente Correa 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 6      Abril-Junho 1975      Número 2

*Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 6(2)

### CONTEÚDO – CONTENTS

#### Artigos originais

- El crecimiento de *Aspergillus oryzae* en aguas de desperdicio del beneficiado de café [*Growth of Aspergillus oryzae on coffee wastewaters*] — O. Maldonado, L. Cordero, H. Mayorga, R. Espinosa, J.F. Menchú, S. Schneider, C. Roz & Brooks Church ..... 27
- Assimilação de fontes de C e N por *Sporotrichum schenckii* na fase leveduri-forme [*Assimilation of C and N sources by Sporotrichum schenckii in the yeast-like phase*] — Paulo S. Minami ..... 35
- Liberação de hemolisina de *Pseudomonas aeruginosa* [*Liberation of Pseudomonas aeruginosa hemolysin*] — Heloiza Ramos Barbosa, Mitsue Baba & Lúcio Penna de Carvalho Lima ..... 38
- Comparative study on SCP production from molasses, vinasse or bakers yeast effluent — A.S. ELNawawy & M.A. Fouda ..... 42
- A spontaneous Spo mutant of *Bacillus licheniformis* with increased respiratory metabolism — L. Rabinovitch, M.L. Palmeira & S.M. da Silva ..... 47

# JEOL DO BRASIL

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

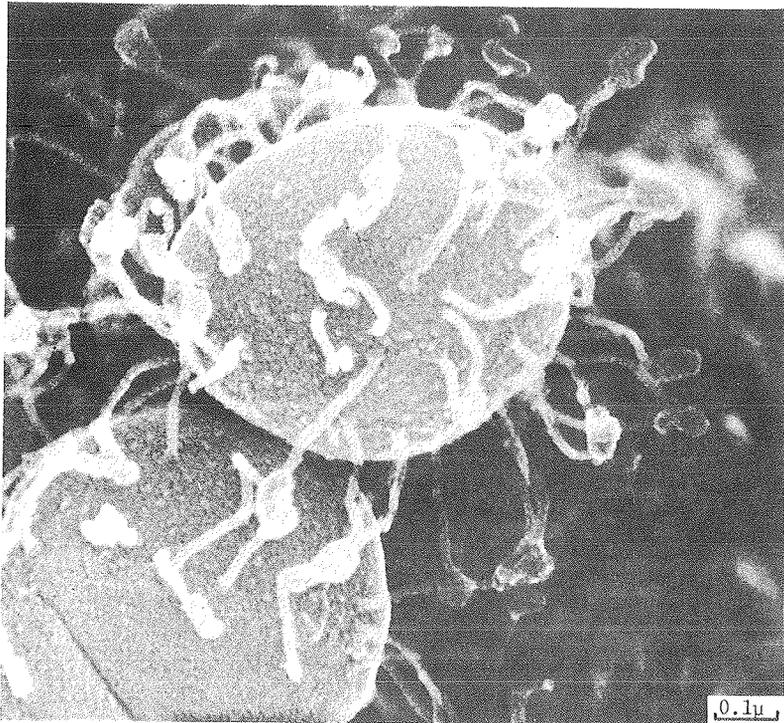
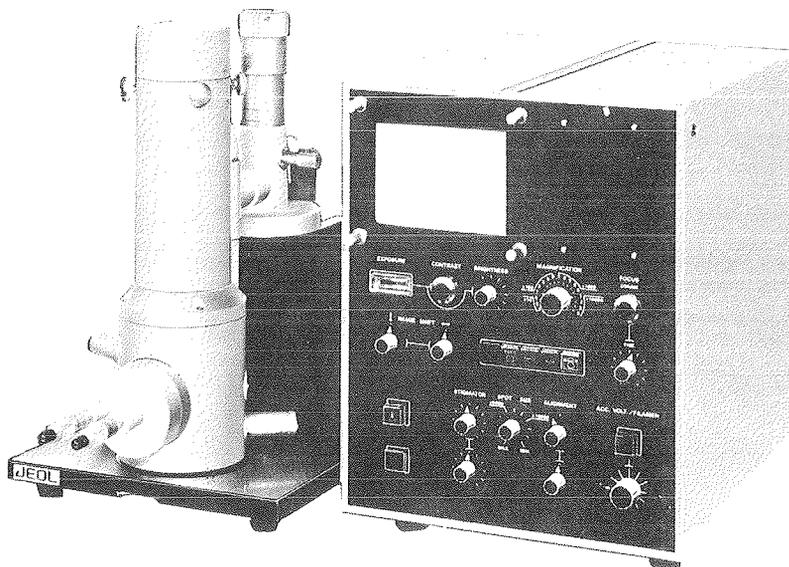


Imagem eletrônica secundária de fago Pφ55 adsorvido sobre *Staphylococcus*, obtida com JEM-100C, equipado com SEG e ASID.

## 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" (2ª edição, AIBS, 1964). Os símbolos genéticos devem seguir, essencialmente, as recomendações de Demerec & col. (*Genetics*, 54: 61, 1966). Abreviações bioquímicas devem seguir, essencialmente, as regras da IUPAC-IUB (*J. Biol. Chem.*, 241: 527, 1966). Atividade enzimática deve ser expressa em termos de unidades internacionais (Enzyme Nomenclature, Elsevier Publ. Co., 1965). Para pesos e volumes, devem ser usados os prefixos nano (n) e pico (p), ao invés de milimicro (m $\mu$ ) e micromico ( $\mu\mu$ ). Comprimentos devem ser expressos em micrômetro ( $\mu\text{m}$ ;  $10^{-6}\text{m}$ ), ao invés de micro ( $\mu$ ); nanômetro (nm;  $10^{-9}\text{m}$ ), ao invés de milimicro (m $\mu$ ); e Angstroms (A;  $10^{-10}\text{m}$ ). Partes por milhão (ppm) devem ser expressas como microgramas por mililitros ( $\mu\text{g/ml}$ ) ou microlitros por litro ( $\mu$  litros/litro). A Revista se reserva o direito de adaptar os manuscritos ao estilo adotado.

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

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

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; uréia.

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

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

**ROLCO SRL – Qualidade a preço inigualável**

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

## El crecimiento de *Aspergillus oryzae* en aguas de desperdicio del beneficiado de café\*

O. Maldonado, L. Cordero, H. Mayorga, R. Espinosa,  
J.F. Menchú, S. Schneider, C. Roz\*\* & Brooks Church\*\*\*

### Sumário

Se presentan resultados de pruebas a nivel de planta piloto del crecimiento de *A. oryzae* en aguas de desperdicios del beneficiado de café. Se ensayaron dos tipos diferentes de fermentadores: los de canal abierto con una o varias celdas en serie y los de tanques cilíndricos. El volumen de trabajo varió desde 7 hasta 50l para los primeros y de 10l para los segundos. Los fermentadores se operaron primero en batch, en forma aséptica y después en forma contínua no aséptica. La temperatura fue la del medio ambiente (18–25°C) y el pH se ajustó manualmente a 4–4.5. Se ensayaron velocidades de dilución desde 0.01 hasta 0.08 hrs<sup>-1</sup> en cultivo contínuo. El DQO inicial de las aguas de desperdicio estuvo entre 10–30 g/l y se obtuvieron reducciones del 75% del DQO inicial con rendimientos a material celular alrededor del 50%. Se presentan datos de la composición de aminoácidos de la proteína del hongo y de un ensayo biológico con ratas.

### Summary

#### *Growth of Aspergillus oryzae on coffee wastewaters*

Results are presented on growth of *A. oryzae* on coffee wastewaters at a pilot plant level. Two types of fermentors were used, an open channel with one or a series of interconnected cells with volume from 7 to 50 liters, and simple glass jar fermentors, 10 liters in volume. The experiments were started batchwise under aseptic conditions and then continuous with a non-aseptic feed. The temperature was room temperature (18–25°C) and the pH of the medium was hand controlled at pH 4–4.5. Dilution rates from 0.01 to 0.08 hr<sup>-1</sup> were experimented under continuous operation. The initial COD load of the raw water was between 10 to 30 g/l and COD reductions 75% were obtained. The cell yield was around 50% of this value. Data are presented on the aminoacid compositions of the mycelium protein material and results of a biological feeding test of rats are shown.

### Introducción

En las operaciones de beneficiado por vía húmeda del café, la fruta se somete al despulpado (eliminación de la cáscara) utilizando agua que se recircula varias veces adquiriendo al final de la operación, un color pardo rojizo y un contenido elevado de sustancias solubles de la pulpa así como el mucílago que recubre los granos. Esta agua es llamada "Agua miel".

Después de la etapa de fermentación del café, los granos se lavan con la llamada "agua de lavado" que también contiene proporciones elevadas de sólidos en suspensión, así como productos de degradación

de la pectina que es el principal componente del mucílago que recubre el grano.

Estas aguas representan un problema de contaminación bastante serio ya que tienen niveles de 10–30 g/l de demanda química de oxígeno total (DQO total), además puede pensarse en ellas como un substrato adecuado para producción de proteína microbiana. En este aspecto, se pensó cultivar un hongo imperfecto (*A. oryzae* I-14)<sup>6-8</sup> con el objeto de producir dicha proteína con posible utilización en la formulación de dietas para animales a la vez de resolver el problema de la contaminación de las aguas<sup>1-3,10</sup>, la selección de un hongo para realizar el objetivo antes mencionado se basó principalmente

\* Presentado en la Cuarta Conferencia Internacional sobre las Consecuencias Globales de la Microbiología Aplicada — GIAM IV, São Paulo, 23-28 Julio, 1973.

\*\* Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial, Guatemala, C.A.

\*\*\* Denver Research Institute, U.S.A.

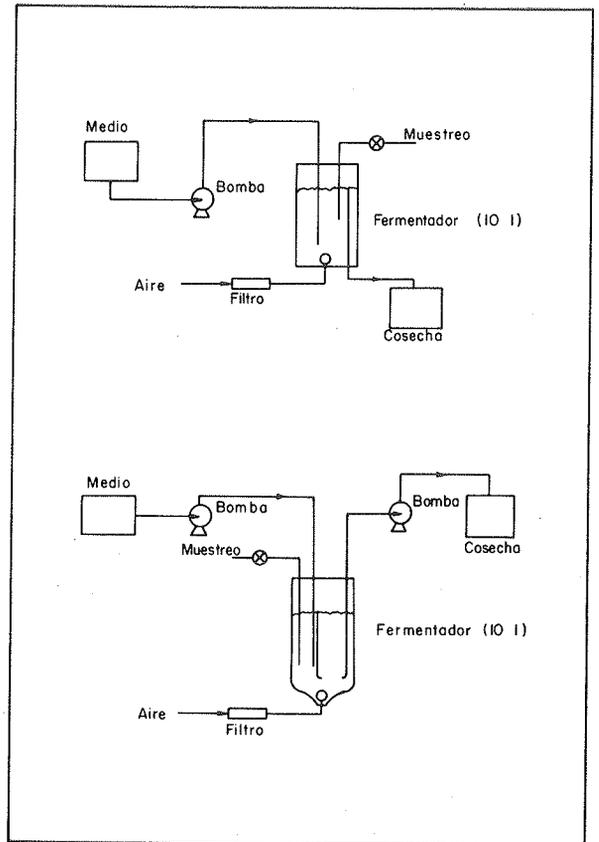
en la facilidad de recuperación de estos microorganismos, lo cual es un aspecto sumamente influyente en el costo total de la operación.

Previo a instalar un sistema de tratamiento a escala industrial es necesario tener conocimiento de la cinética de crecimiento y utilización de sustrato de dicho microorganismo. El trabajo a nivel de planta piloto realizado provee dicha información. Este trabajo fue realizado en ICAITI con colaboración del Denver Research Institute, así como de la firma H. De Sola é hijos, de San Salvador, C.A.

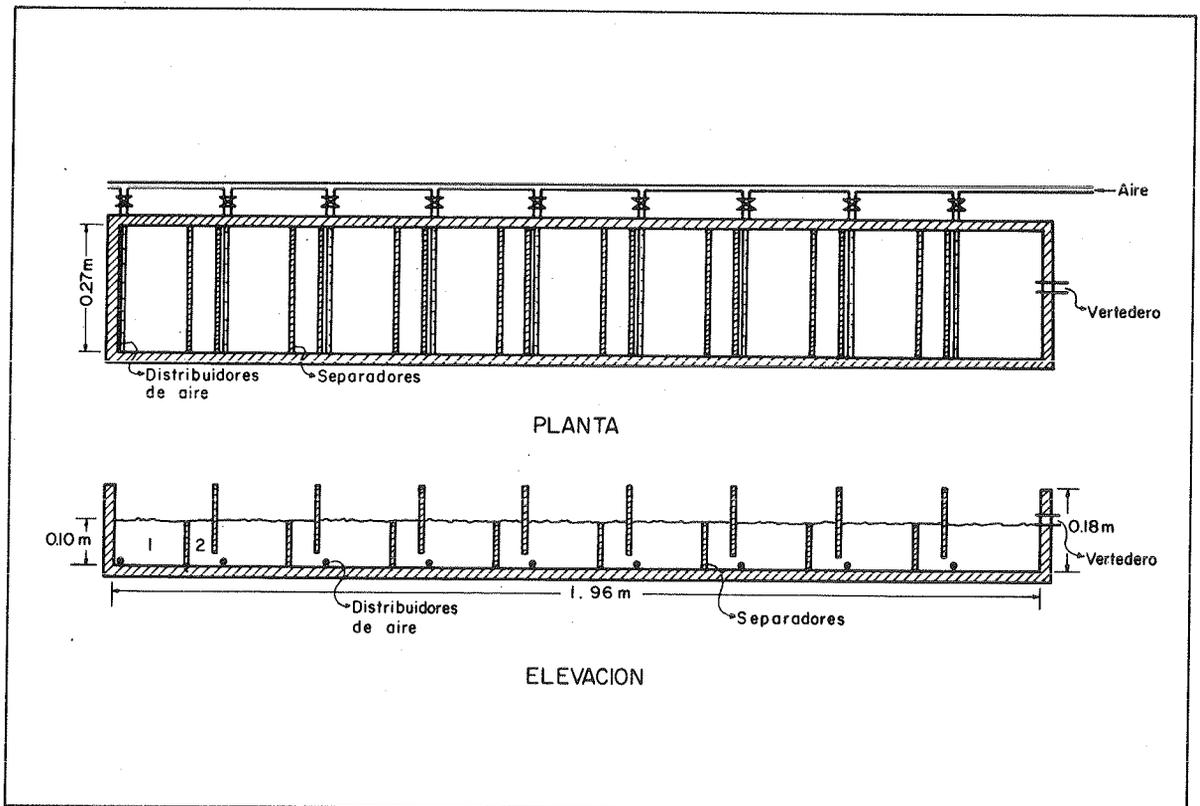
### Metodología y Equipo

*Análisis químicos* – demanda química de oxígeno<sup>9</sup>, nitrógeno total<sup>4</sup>, sólidos totales.

*Equipo* – Fermentador cilíndrico de vidrio de 10 lts de capacidad (Gráfica 1), fermentador de canal de madera con capacidad de 95 lts (Gráfica 2), ambos de construcción local; fermentador Microferm Fermentor New Brunswick de 7–14 lts, y bombas de cultivo continuo Continuous Culture Console de New Brunswick.



Gráfica 1 – Esquema de los fermentadores de diez litros.



Gráfica 2 – Diagrama del fermentador de canal abierto. 1: celda agitada, 2: vertedero.

Condiciones de operación

**Cultivo batch.** El inóculo era preparado con una mezcla de aguas de lavado y aguas miel lavando las esporas de un tubo de agar PDA en el cual se había incubado durante 5 días el hongo *A. oryzae* 1-14 a 30°C. Las esporas traspasadas a la mezcla de aguas se incubaron por un período de 24 hrs a 30°C y agitación de 300 RPM.

El inóculo se tomó de 10% del volumen total. Las aguas fueron suplementadas con fosfato de amonio 1-2% y con elementos traza 1 ml/lit, ajustando el pH a un nivel de 4.5 con ácido sulfúrico concentrado. La aereación varió de 1-2 vvm. Se trabajó a temperatura ambiente con oscilaciones de 18-25°C. La agitación en todas las pruebas fue únicamente por el aire entrando al equipo; el inóculo fue preparado en forma estéril.

**Cultivo continuo.** Se hizo crecer el microorganismo en forma batch y al final del período exponencial de crecimiento se sometió el sistema a flujo continuo con diferentes velocidades de dilución tratando de alcanzar estado estable en cada una de éstas. Las condiciones de aereación-agitación, temperatura, pH se mantuvieron iguales a las mencionadas para el cultivo batch.

Nomenclatura

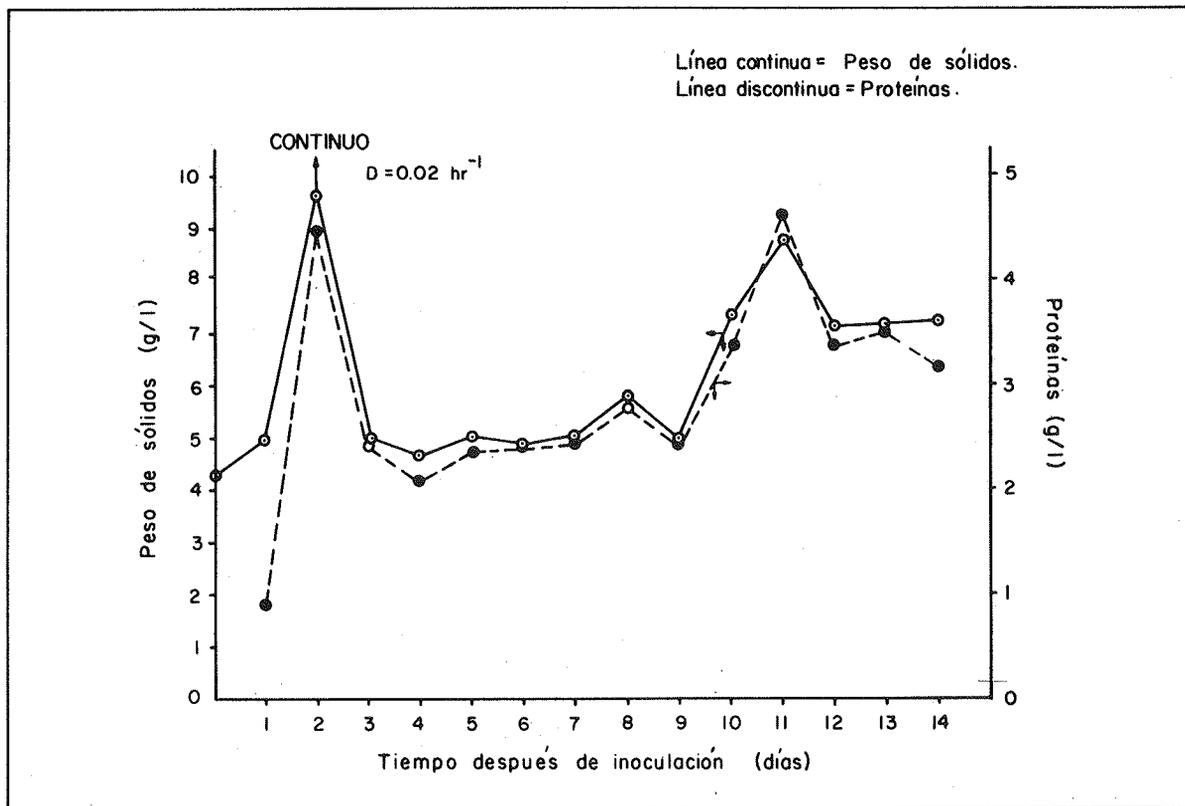
DQO	Demanda química de oxígeno (g/l)
vvm	Volumen de aire/volumen de medio - min
D	Velocidad de dilución = $\frac{F}{V}$ (hr <sup>-1</sup> )
F	Flujo lts/hr
V	Volumen lts
$\mu$	Velocidad específica de crecimiento (hr <sup>-1</sup> )
$\theta$	Tiempo de residencia = 1/D (hr)

Resultados

Pruebas batch y continuo

**Prueba A.** El sistema fue mantenido en forma batch durante 48 horas, después de las cuales se comenzó a alimentar medio no estéril con un flujo de 1 lt/hr, lo cual provee un tiempo de residencia de 50 horas o una velocidad de dilución de 0.02 hr<sup>-1</sup>. Para esta prueba se utilizó un fermentador con volumen de cultivo de aproximadamente 50 lts. El medio utilizado fue agua miel. Los resultados se muestran en la Gráfica 3.

El fermentador consistía de un canal de madera con varios compartimientos (ver Gráfica 2). Se

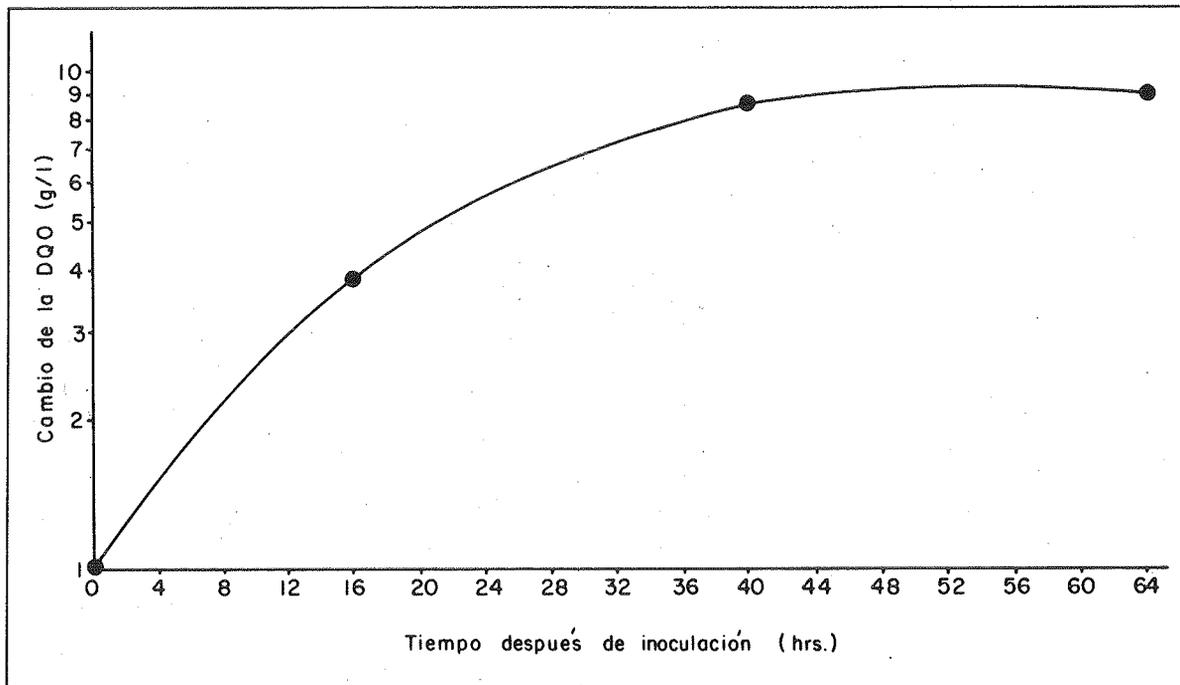


Gráfica 3 — Resultados del peso de sólidos y de proteína vs tiempo.

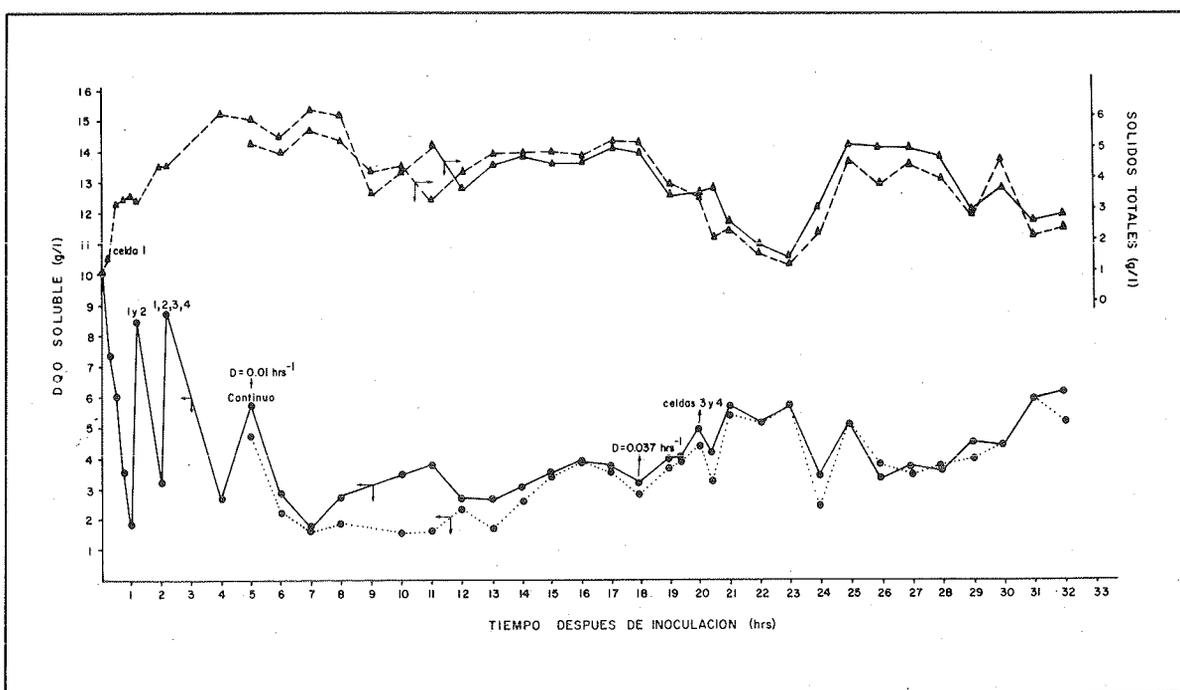
observó que en los vertederos entre las celdas existía acumulación de micelio que se encontraba sin aereación.

El grado de contaminación de acuerdo a las observaciones microscópicas fue sumamente elevado. El estado del hongo no fue satisfactorio ya que se observó un porcentaje elevado de micelio en lisis, con granulaciones y esporulando.

*Prueba B.* Se utilizó el mismo fermentador de canal con celdas, pero variando la disposición de los compartimientos para evitar el problema de zonas anaeróbicas. El volumen de cultivo de aproximadamente 72 lts. La Gráfica 4 muestra la variación de la reducción en la DQO en el tanque utilizado para inocular el fermentador de canal; después de 64 horas de crecimiento batch, el contenido del tanque se utilizó



Gráfica 4 — Variación diaria en la reducción de la DQO del tanque.



Gráfica 5 — Resultados de la DQO soluble y sólidos vs tiempo. ▲ Celda 1 △ Celda 4

para inocular la primera celda del canal a un nivel de 50%. A las 24 horas de crecimiento en la primera celda, la mitad del volumen de medio fue transferido a la segunda celda y el volumen ajustado al nivel inicial, adicionando medio fresco. Entre el segundo y tercer días, se empleó el contenido de las dos primeras celdas para inocular las restantes.

El medio utilizado fue solamente agua miel adicionando fosfato de amonio al 1%. Al quinto día de operación, el sistema se trabajó en forma continua con un flujo de 0.72 lts/hr que dan un tiempo de residencia de 100 horas o una velocidad de dilución igual a 0.01 hr; la alimentación era medio fresco no estéril. A los 18 días el flujo se incrementó a 2.5 lts/hr ( $\theta = 28.8$  hr,  $D = 0.0347$ ).

Los datos se reportan en la Gráfica 5. El proceso de inoculación ensayado ofrece buenas posibilidades, ya que se logra operar todo el volumen en un período de tiempo relativamente corto partiendo de un inóculo fuerte. Durante este proceso el hongo compitió con la flora natural de las aguas en buena forma; la cantidad de micelio fue abundante y no presentaba esporulación ni granulación.

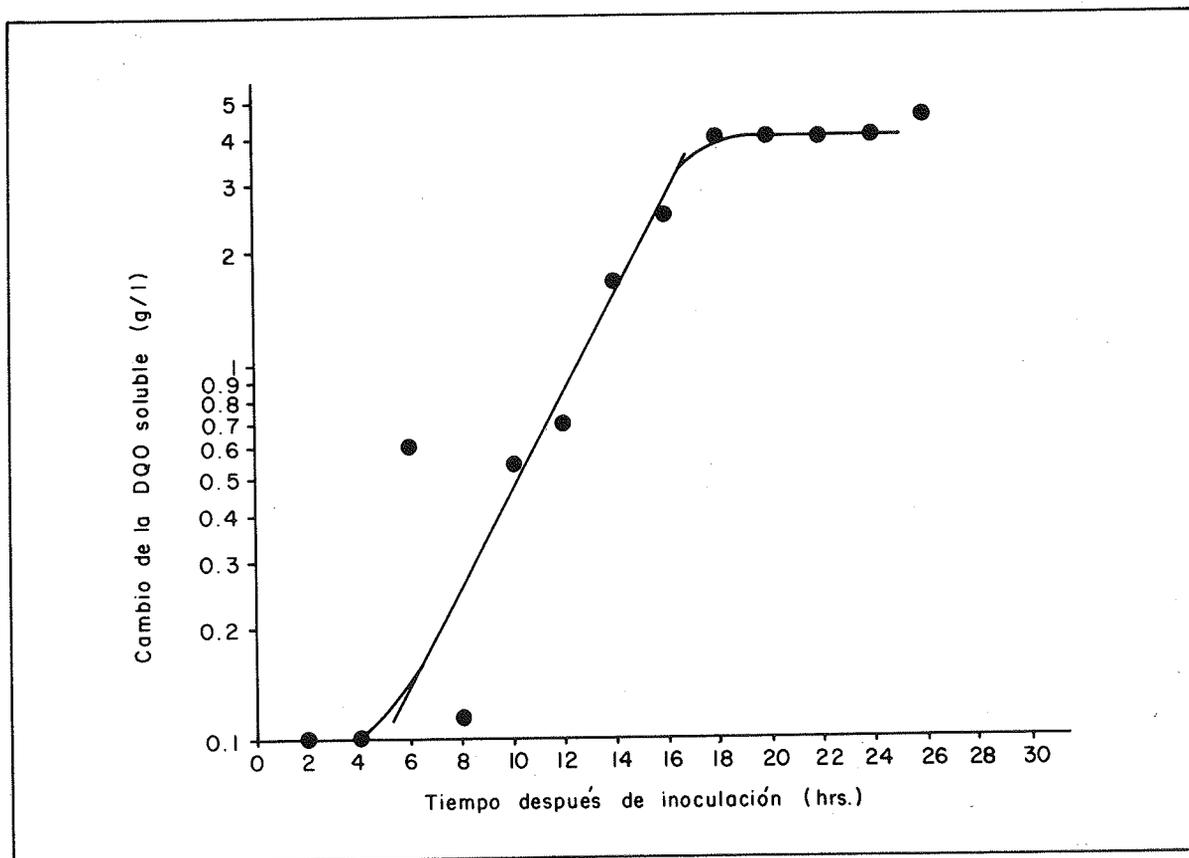
*Prueba C.* Se utilizó un arreglo similar al mostrado en la Gráfica 2, funcionando únicamente la celda

Nº 4. El volumen del cultivo fue de 17.7 l y el crecimiento batch duró día y medio, tiempo después del cual se comenzó a alimentar medio fresco con flujo de 0.85 l/hr ( $D = 0.111$  hr;  $\theta = 9.06$  hrs).

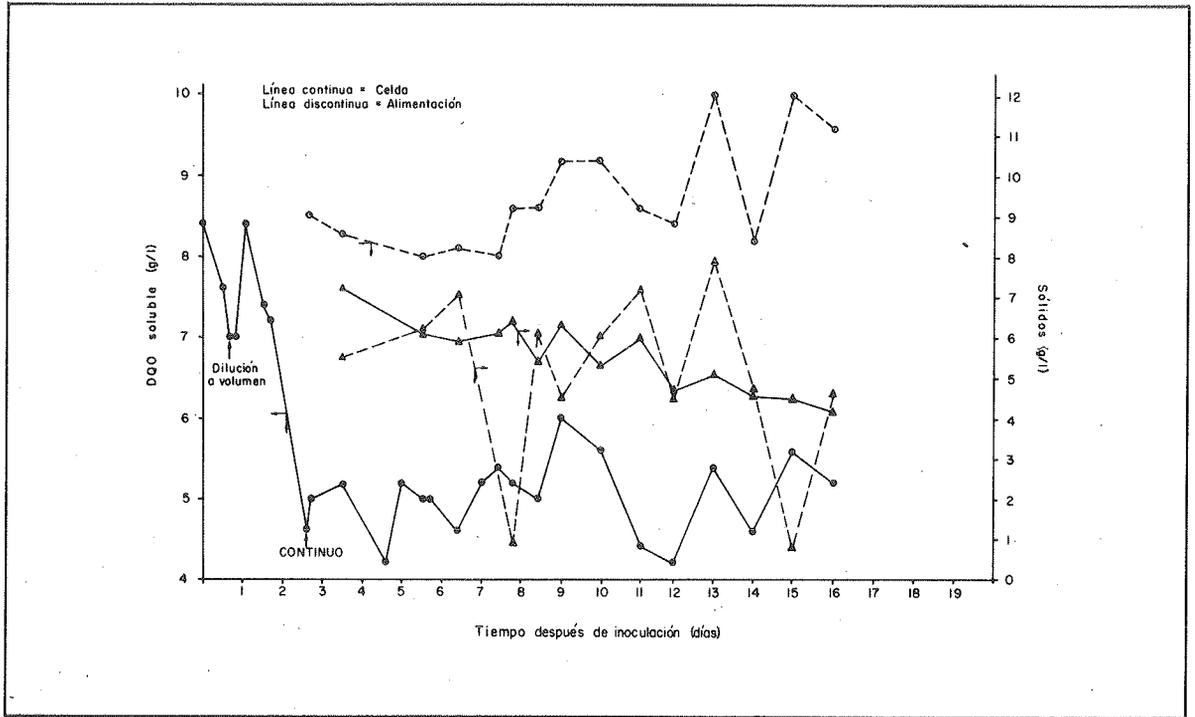
El medio utilizado fue una mezcla de 50% agua miel y 50% agua de lavado adicionado con sulfato de amonio 2 g/l, fosfato de potasio 2 g/l, cloruro de calcio 2 g/l, solución de elementos traza 1 ml/l. El pH del medio se ajustó a 3.5 y se controló diariamente en forma manual.

Los resultados de la fermentación operada en forma estéril en el fermentador de laboratorio se muestran en la gráfica 6 (inóculo para la celda Nº 4) y los datos para el fermentador no aséptico obtenidos en la celda se muestran en la Gráfica 7.

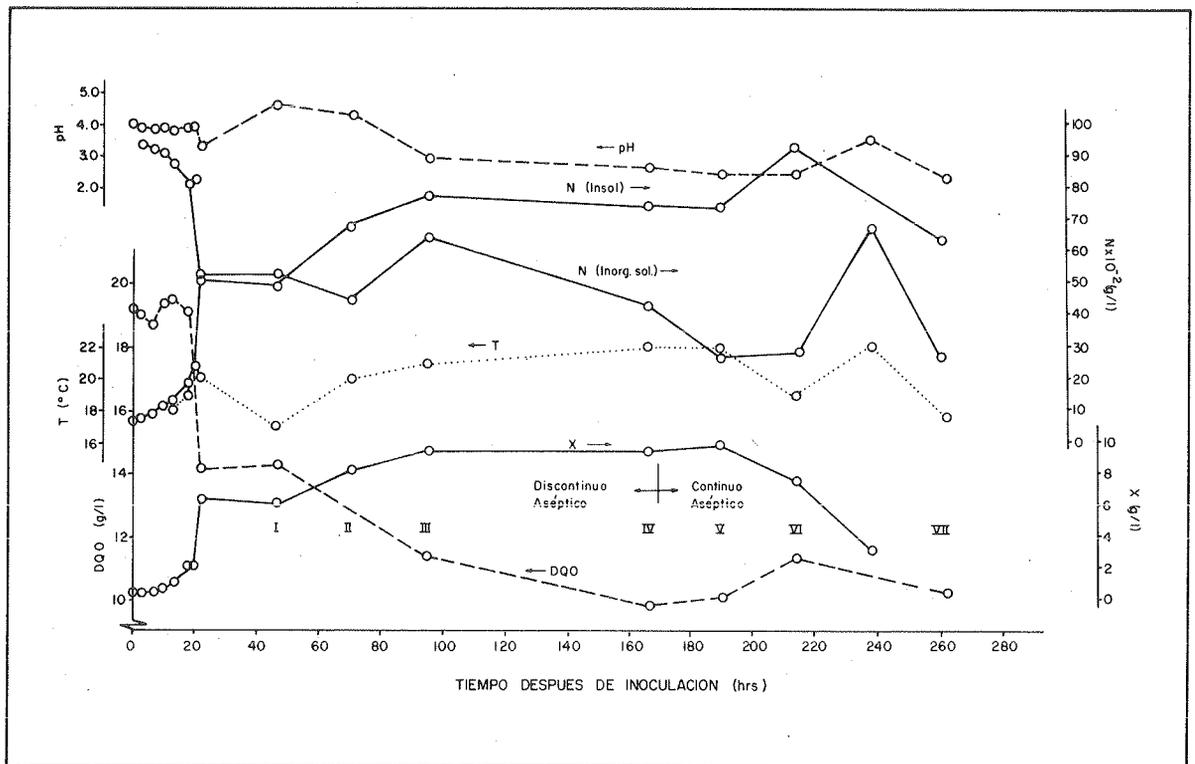
La etapa de reducción exponencial del sustrato se alcanzó a las 6 horas de cultivo y la fase estacionaria a las 16 horas para el batch de inóculo (Gráfica 6). La pendiente de la fase exponencial fue de 0.308 hr para el sustrato que es bastante alto. De acuerdo a las observaciones microscópicas, hasta el séptimo día se observó poca contaminación; ésta fue incrementando notablemente hasta el noveno y décimo días en que las levaduras predominaron sobre el hongo. El incremento en contaminación aparentemente coincidió con la reducción en el contenido de sólidos.



Gráfica 6 — Cambio de la reducción de la DQO vs tiempo.



Gráfica 7 — Resultados de la DQO soluble y sólidos vs tiempo.



Gráfica 8 — Cambios observados en el ensayo D, velocidad de dilución =  $0.0487 \text{ hr}^{-1}$

- I. 1 litro de medio agregado. Micelio delgado y con vacuolas
- II. 5 litros de medio agregado. Micelio delgado con vacuolas y crecimiento en las paredes
- III. 1 litro de medio agregado. Se bajaron las esporas y micelio crecido en las paredes
- IV. 1 litro de medio agregado. Se puso en continuo con  $\sigma = 20.546 \text{ hr}$
- V. 2 litros de medio agregado. Contaminado con levadura
- VI. 5 litros de medio agregado
- VII. Falta de aire por 3 hr. Micelio en lisis y granulado. Esporas sueltas

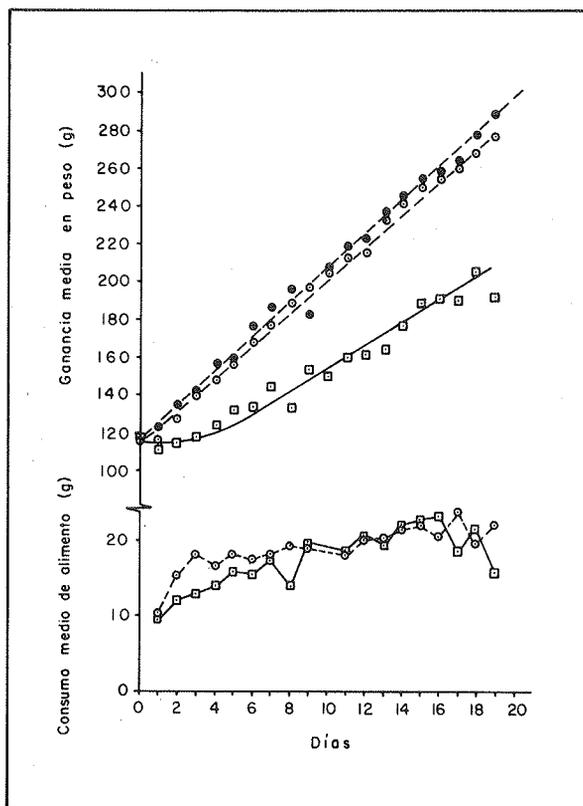
**Prueba D.** En esta prueba se usaron fermentadores con capacidad de 10 lts, construidos localmente con secciones cilíndricas de vidrio. La agitación del cultivo se logró únicamente con la aereación. En la Gráfica 1 se esquematizan los sistemas usados.

Los datos para el crecimiento batch, así como contínuo en forma estéril se dan en la Gráfica 8. Para la fase de crecimiento exponencial se encontró una velocidad específica de crecimiento  $\mu = 0.111 \text{ hr}^{-1}$  basada en la concentración celular X. El cultivo contínuo se operó a una velocidad  $D = 0.0487 \text{ hr}^{-1}$  trabajando también la alimentación en forma aséptica. Hubo una variación notable en el pH que fluctuó de 4 a 2.65 habiéndose obtenido una reducción de la DQO de 50% máximo.

Con éste tipo de fermentador se realizaron otras pruebas a diferentes velocidades de dilución.  $D = 0.0242, 0.0342, 0.0849$ .

**Estudio biológico de alimentación con ratas**

Se hizo el estudio con 12 ratas machos libres de patógenos, de 35 días de edad (raza HLA-W, Hilltop Lab. Animals Inc.), las cuales se mantuvieron en cajas individuales con un dispositivo para agua y otro para control de la alimentación.



Gráfica 9 — Ganancia en peso en función del tiempo  
 ● Dieta a base de Lab block  
 ○ Dieta estándar de caseína  
 □ Dieta con hongo

El micelio de *A. oryzae* 1-14 empleado presentaba un 41% de proteína<sup>9</sup> y se usaron las siguientes dietas:

- a) Dieta basada en alimento comercial para ratas (lab blocks)
- b) Dieta control base caseína (Ver Cuadro 2)
- c) Dieta conteniendo hongo (Ver Cuadro 3)

Los resultados de ganancia en peso en función del tiempo se muestran en la Gráfica 9. La ganancia en peso de las ratas alimentadas con dieta comercial y dieta control fue de 8 y 8.8 gramos/día. El valor para las ratas alimentadas con dieta a base de hongo fue de 6.2 gr/día. No se observaron síntomas tóxicos agudos en ninguna de las ratas alimentadas con dieta a base de hongo durante 19 días del experimento.

La composición de aminoácidos del micelio cosechada se presenta en el Cuadro 1.

Cuadro 1  
 Contenido de aminoácidos del micelio

Aminoácido	% Peso	g/100 de Proteína de Hongo*
Lisina	2.06 <sup>a</sup> - 1.72 <sup>b</sup>	5.2
Histidina	0.42 - 0.51	1.1
Arginina	0.97 - 1.38	2.4
Ácido Aspártico	3.19 - 3.13	8.0
Trionina	1.58 - 1.49	4.0
Serina	1.37 - 1.20	3.4
Ácido glutámico	3.96 - 3.50	9.9
Prolina	1.52 - 1.34	3.8
Glicina	1.86 - 1.86	4.7
Alanina	2.49 - 2.27	6.2
1/2 Cistina	0.09 - —	0.23
Valina	1.93 - 1.99	4.8
Metionina	0.38 - .53	0.95
Isoleucina	1.68 - 1.56	4.2
Leucina	2.59 - 2.05	6.5
Tirosina	1.06 - 0.86	2.7
Fenilalanina	1.51 - 1.31	3.8
Hidroxiprolina	0.07 - —	0.18
Metionina (sufóxido)	— - 0.14	0.35

\* Obtenido multiplicando primera columna x 2.5 debido a que el producto contiene un 40% de proteína aproximadamente

<sup>a</sup> Analizados por Anal. Biochem. Labs., Inc., U.S.A.

<sup>b</sup> Analizados por Biochemical Data Corp., U.S.A.

Cuadro 2  
 Composición de la dieta control

Caseína (10.5% H <sub>2</sub> O)	257g
Vitaminas	20g
Metionina	1g
Sales	40g
Alfacela	40g
Aceite	80g
Agua	17g
Almidón de maíz	545g

Cuadro 3  
Composición de la dieta con hongo

Micelio	495g
Aminoácidos no presentes	79.6g
Vitaminas	20g
L-metionina	1g
Sales	20g
Aceite	40g
Agua	104.8g
Almidón de maíz	239.6g

### Conclusiones

a) Es factible crecer *A. oryzae* I-14 continuamente en un medio no aséptico de aguas procedentes del beneficio de café.

b) El uso de medio no esterilizado para el proceso de fermentación, es adecuado media vez se haya partido de un inóculo puro, un nivel satisfactorio de nutrientes y el valor del pH se mantenga dentro del rango óptimo (alrededor de 4.5).

c) La velocidad específica de crecimiento del hongo osciló entre 0.07 y 0.11 hr<sup>-1</sup>.

d) La relación de transformación del sustrato en materia celular del hongo estuvo cercano a 0.5 (rendimiento: peso de hongo seco/peso sustrato consumido). La reducción de la DQO varió en los diversos experimentos desde un 40 hasta un 75%.

e) El hongo *Aspergillus oryzae* I-14 cosechado no presentó toxicidad en ratas durante 19 días de alimentación con una dieta a base de dicho microorganismo.

### Referências Bibliográficas

1. CHURCH, B.D. — Second and fourth quarterly report on Applications of fungi imperfecti for treatment of cereal processing water. United States Department of Agriculture, 1972.
2. GRAY, W.D. — *Adv. in Chemistry Series 57*. American Chemical Society, 1966.
3. LITCHFIELD, J.H. — The production of fungi, en *Single Cell Protein*, por R.I. Maldels 309-329. The MIT Press, 1968.
4. Official method of Analysis of the AOAC, 10a. Ed., 1965.
5. SCHNEIDER, S.; ESPINOSA, R.; ROLZ, C. & UPDEGRAFF, D. — The production of animal feed by the growth of fungi on wastes from the coffee and rum distilling industries. Presentado en el 3er. Congreso Centroamericano de Microbiología. Guatemala, 1971.
6. SPICER, A. & SOLOMONS, G.L. — BP 120356, 1970.
7. SPICER, A. — *Tropical Science XIII*, Nº 4: 239-250, 1971.
8. SPICER, A. — Protein production by micro-fungi. The Lord Rank Research Center, High Wycombe, England, 1971.
9. Standard methods for the examination of water and wastewater. 12 Ed. New York, APHA, 1967.
10. THATCHER, F.S. — *Ann. Rev. Microbiol.*, 8: 449-472, 1954.

## Assimilação de fontes de C e N por *Sporotrichum schenckii* na fase leveduriforme

Paulo S. Minami\*

### Resumo

A assimilação de fontes de N e de C por 16 amostras de *Sporotrichum schenckii*, na fase leveduriforme, foi estudada pela técnica de meio sólido em placas, incubadas a 37°C. Foram usados como fontes de N: uréia, cisteína, glicina, triptofano, nitrato de potássio, sulfato de amônio, peptona e asparagina. Como fontes de C, foram usados: dextrose, galactose, lactose, maltose, rafinose, sacarose, celobiose e inositol.

O comportamento observado entre as amostras estudadas não foi uniforme, devendo-se assinalar o fato de ter havido crescimento da fase leveduriforme utilizando substâncias inorgânicas, além de substâncias orgânicas de baixo peso molecular.

### Summary

*Assimilation of C and N sources by Sporotrichum schenckii in the yeast-like phase.*

The assimilation of N and C sources by *Sporotrichum schenckii* in the yeast-phase was studied with the solid medium technique in plate at 37°C. The N sources employed were: urea, cystein, glycin, tryptophan, potassium nitrate, amonium sulfate, peptone and asparagin. The C sources used were: dextrose, galactose, lactose, maltose, raffinose, saccharose, celobiose and inositol.

The behavior among the strains studied was not uniform. Growth of the yeast-phase of *Sporotrichum schenckii* by utilization of inorganic substances, other than organics substances of low molecular weight, was observed.

### Introdução

*Sporotrichum schenckii* cresce muito bem à temperatura ambiente no ágar Sabouraud, na fase filamentosa, sendo pouco exigente quanto aos nutrientes. Na fase leveduriforme, exige meios contendo sangue ou proteínas, temperatura de 37°C e ambiente de CO<sub>2</sub> a 5%.

Poucos estudos têm sido realizados sobre a nutrição de *Sporotrichum schenckii*, principalmente na fase leveduriforme. Gilardi<sup>2</sup>, em revisão sobre nutrição de fungos patogênicos, relata a observação de vários autores sobre a inclusão, nos meios de culturas, de hidrolisados protéicos e aminoácidos.

Mariat & Drouhet<sup>4,5</sup> estudaram a influência de fatores químicos no crescimento da fase leveduriforme, como a biotina, tiamina, aminoácidos e caseína.

Os intermediários do ciclo de Krebs, a capacidade oxidativa, a composição do meio após o crescimento, as variações do conteúdo celular, a ação do

aldeído fórmico no conteúdo celular e outros problemas de metabolismo foram estudados por Bacila & cols.<sup>1</sup> e Mariat & Bievre<sup>3</sup>.

No presente trabalho, procurou-se elucidar alguns aspectos sobre a nutrição de *Sporotrichum schenckii* na fase leveduriforme.

### Material e Métodos

*Amostras de Sporotrichum schenckii* — Foram utilizadas as de nº FM440, FM628, FM890, FM111, FM131, FM339, FM260, FM441, FM148, FM66 e FM986, da Micoteca da Faculdade de Medicina da USP. As amostras J.A.D., J.P.S., E.S.G., F.C.F. e P.R.F. foram obtidas recentemente de pacientes com esporotricose.

As culturas foram mantidas em ágar Sabouraud temperatura ambiente, na fase filamentosa. A fase leveduriforme foi obtida e mantida no seguinte meio: BHI — 37g; extrato de levedura — 1g; hidrolisado de caseína — 5g; dextrose —

\* Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo SP.

## Liberação de hemolisina de *Pseudomonas aeruginosa*

Heloiza Ramos Barbosa, Mitsue Baba & Lúcio Penna de Carvalho Lima\*

### Resumo

Liberação da hemolisina de *P. aeruginosa* no meio de cultura: se por processo ativo (secreção ou excreção) ou por lise da célula. Os resultados indicaram que não deve haver relação entre a lise do germe e o aparecimento da substância hemolítica no meio. Devido à presença de componentes comuns, na molécula de hemolisina e na parede do germe, fragmentos do envoltório foram testados quanto à capacidade hemolítica. Os resultados mostraram que a parede não contribui para a atividade hemolítica, o que reforça a hipótese da liberação ativa do produto.

### Summary

#### *Liberation of Pseudomonas aeruginosa hemolysin*

There is no relationship between the release of hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa* into the culture medium and cell lysis. The presence of common components in the molecule of hemolysin and the bacterial cell wall led to the study of a possible hemolytic activity by the latter. No such activity was found, a fact that gives additional support to the hypothesis of an active secretion of the product.

### Introdução

Estudos iniciais com *Pseudomonas aeruginosa* evidenciaram a lise de glóbulos vermelhos, quando o germe era cultivado em ágar sangue.

Bullock & Hunter<sup>1</sup> demonstraram que filtrados de culturas, em caldo de 3 a 4 semanas, eram capazes de lisar suspensões de eritrócitos de várias espécies animais, inclusive do homem. Os autores não constataram presença de atividade hemolítica em culturas jovens e, baseados nos resultados, presumiram que a liberação de substância hemolítica era devida à autólise do germe.

A finalidade do presente trabalho foi verificar se a liberação de hemolisina era feita por lise da célula ou se seria produto de secreção ou excreção.

Paralelamente, procurou-se verificar se havia relação estrutural entre a parede de *P. aeruginosa* e a molécula de hemolisina. Javis & Johnson<sup>6</sup> demonstraram que a molécula da substância hemolítica é composta por duas moléculas de ramnose e duas de ácido  $\beta$ -hidroxidecanóico. A parede de *P. aeruginosa* apresenta diferentes hidróxi-ácidos, entre os quais encontra-se o  $\beta$ -hidroxidecanóico e, entre os constituintes da parte glicídica, o açúcar ramnose<sup>3, 5, 8</sup>.

Como a molécula de hemolisina e a parede celular apresentam unidades básicas comuns, foi investigada a possível atividade hemolítica da parede.

### Material e Métodos

*Microrganismo* — O microrganismo utilizado foi isolado de um caso fatal de meningite e, segundo provas bioquímicas, classificado como *P. aeruginosa*, cultivado em meio de Favorite & Hammon<sup>4</sup> modificado:

Hidrolisado ácido de caseína . . . . .	15,0g
Glicose . . . . .	2,5g
H <sub>2</sub> O q.s.p. . . . .	1000,0ml
pH . . . . .	7,0

O meio de ágar sangue foi utilizado para verificação prévia da produção de hemolisina e o meio de ágar comum para contagem de bactérias viáveis.

*Relação entre teor de hemolisina e número de células viáveis* — Para a determinação da relação entre a produção de hemolisina e o número de células viáveis, foram preparadas culturas de 72 horas no meio citado<sup>4</sup>.

\* Departamento de Bioquímica, Instituto de Química da USP, Caixa Postal 20 780, 01000 São Paulo SP.

Periodicamente, foram retiradas, da cultura em desenvolvimento, duas amostras: uma para contagem de germes viáveis e a outra para o teste de atividade hemolítica.

O teste para a contagem de viáveis foi feito através de plaqueamento de várias diluições da cultura original.

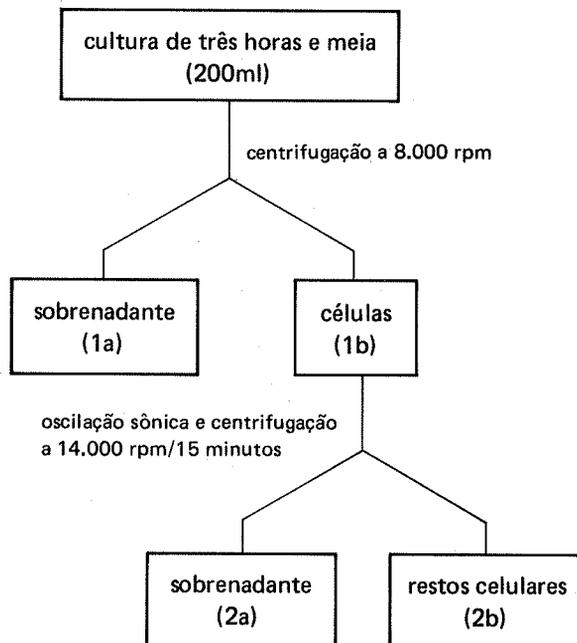
A determinação da atividade hemolítica era realizada com o sobrenadante da segunda amostra, após centrifugação para retirada das células. Volumes crescentes do sobrenadante, de 0,25ml até 2,0ml, foram testados frente a 0,5ml de uma suspensão de glóbulos vermelhos de carneiro (padronizados em água para 0,200 D.O. a 550nm) para um volume final de 4,0ml, completados com solução tampão fosfato 0,01M pH6,3, mais cloreto de sódio 0,85% e gelatina 0,02%.

*Atividade hemolítica da parede* — A atividade hemolítica da parede foi testada da seguinte maneira: foram preparadas duas culturas de *P. aeruginosa* no meio de Favorite & Hammon<sup>4</sup> modificado. Uma delas, com três horas e meia, e a outra com 60 horas. Após o crescimento, as culturas foram centrifugadas e os sobrenadantes testados quanto à atividade hemolítica.

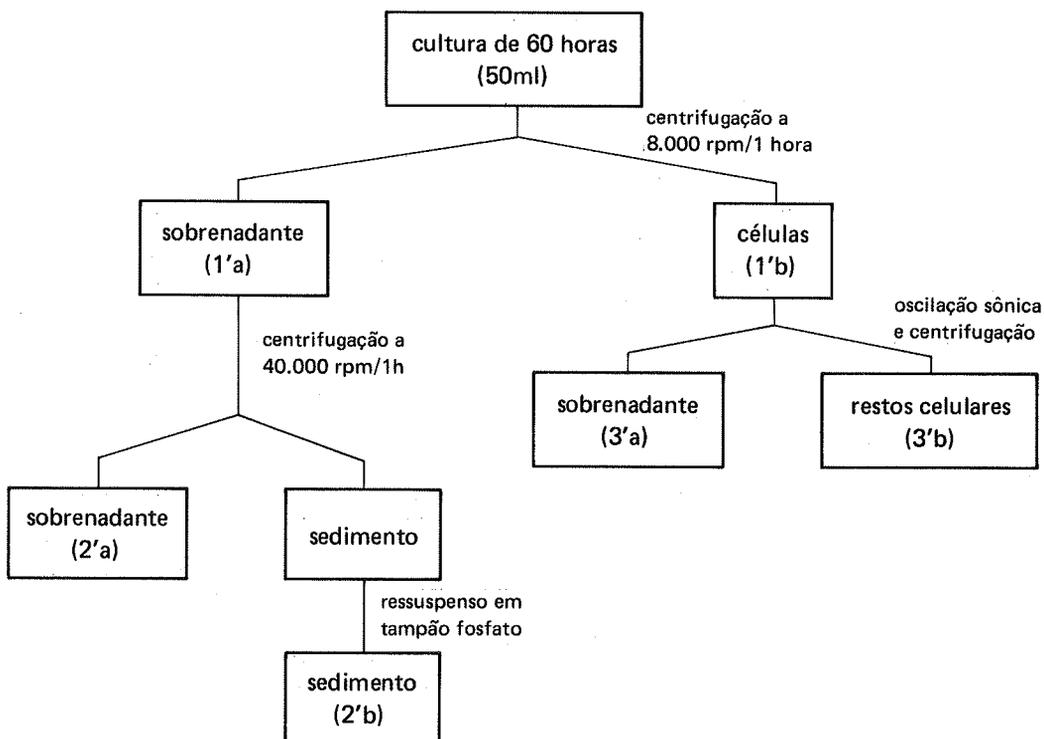
O sobrenadante da cultura de 60 horas (o único ativo) foi centrifugado a 40.000rpm (105.000g) por uma hora. O sedimento resultante foi lavado em tampão fosfato 0,1M pH6,3 e testado quanto à atividade hemolítica. O mesmo teste foi feito com o sobrenadante.

As células obtidas em ambas as culturas foram separadamente suspensas em pequeno volume de tampão fosfato 0,1M pH6,3 e submetidas a sonicação por 10 minutos. As células rompidas foram então centrifugadas a 14.000rpm por quinze minutos. A seguir, sedimentos e sobrenadantes foram testados para detectar a atividade hemolítica.

Esquema A



Esquema B



### Resultados e Discussão

Os resultados obtidos estão representados nas Tabelas 1 e 2.

A liberação de produtos bacterianos no meio de cultura pode ser feita através de dois processos: lise de um certo número de células da cultura ou, como em grande número de exemplos<sup>7</sup>, por liberação sem qualquer alteração da estrutura bacteriana e em quantidades maiores que aquelas compatíveis com o número de germes.

No presente trabalho, foram abordados certos aspectos relacionados com a liberação de hemolisina no meio, na tentativa de verificar as relações existentes entre 1) o número de células viáveis e a quantidade do produto e 2) a estrutura bacteriana e a presença de atividade. O primeiro passo dado foi no sentido de determinar o tempo necessário para o aparecimento do produto no meio de cultura, desde o seu início: foi verificado que cerca de 30 horas eram necessárias para se detectar atividade.

Numa população bacteriana, em qualquer fase de crescimento, é impossível fazer-se a medida do número de células lisadas. Devido a esse fato, as evidências necessárias para determinar se a hemolisina aparecia por lise da célula ou por liberação sem alteração de bactéria, foram obtidas através de relacionamento direto entre células vivas e quantidade do produto liberado.

Se a hemolisina fosse liberada por lise das células, seria esperado o aumento gradativo da quantidade de substância no meio, diretamente proporcional ao número de células mortas e a quantidade máxima de material seria função da morte de todos os germes da população. Seria esperado, também, que seu aparecimento só se daria longo tempo após o início da cultura, uma vez que *P. aeruginosa* é bastante resistente à lise<sup>2</sup>.

Os resultados, porém, demonstraram que o aparecimento de hemolisina no meio se dava quando a cultura apresentava cerca de 30 horas, tempo insuficiente para que houvesse lise celular. Também foi verificado que a liberação não era gradativa, uma vez que o volume mínimo necessário para 100% de hemólise, após 60 e 70 horas de cultura, era o mesmo e de valor muito próximo ao de 48 horas.

Estas evidências sugerem que a substância hemolítica é liberada no meio de cultura sem lise da célula.

Outro aspecto abordado foi a possível relação entre a estrutura química da parede de *P. aeruginosa* e a da hemolisina, uma vez que ambas apresentam unidades comuns: ramnose e ácido  $\beta$ -hidroxidecanóico. Isto motivou a investigação da atividade hemolítica da parede, abordada da seguinte maneira: após a centrifugação das células a 8000rpm, o sobrenadante, submetido a centrifugação a alta rotação (40.000rpm), teria sedimentado fragmentos de parede. Estes foram testados quanto à capacidade de lisar glóbulos vermelhos e se apresentaram inativos. Paralelamente, outro aspecto foi analisado: se eram liberadas moléculas de hemolisina no meio de cultura, por lise das células, um rompimento mecânico da parede poderia originar as mesmas moléculas. Foi o que tentamos obter, submetendo as células de *P. aeruginosa* à sonicação. Para tanto, foram usadas culturas jovens (três horas e meia), que não exibiam atividade hemolítica no sobrenadante, e populações com 60 horas de crescimento, cujo meio de cultura se apresentava ativo.

Os resultados demonstraram que tanto o sedimento obtido pela centrifugação do sobrenadante a 40.000rpm, como o obtido por rompimento das células (de três horas e meia e de 60 horas) eram inativos, o que evidenciou que a hemolisina não deve ter origem através de sub-unidades oriundas do rompimento da parede.

Tabela 1

Relação entre o número de germes viáveis obtidos por contagem durante o desenvolvimento de uma cultura e o aparecimento de atividade hemolítica no meio

Tempo (horas)	Nº de germes viáveis	Atividade hemolítica no sobrenadante	Volume mínimo que apresentava atividade hemolítica total (ml)
1	$1,4 \times 10^6$	-	-
8	$1,5 \times 10^9$	-	-
16	$5,0 \times 10^9$	-	-
24	$8,0 \times 10^9$	-	-
30	$1,5 \times 10^{10}$	+	0,75
48	$1 \times 10^{10}$	+	0,5
60	$1 \times 10^{10}$	+	0,4
72	$4 \times 10^9$	+	0,4

Tabela 2

Atividade hemolítica do sobrenadante e restos celulares obtidos por sonicação

Frações cult. 3 1/2 hs	Atividade hemolítica	Frações cult. 60 hs.	Atividade hemolítica	Quantidade
1a	-	1'a	+	0,5 ml*
1b	-	1'b	-	20% (peso total)
2	-	2'a	+	0,5 ml*
2a	-	2'b	-	30% (peso total)
2b	-	3'a	+	0,5 ml*
		3'b	-	50% (peso total)

\* Volume mínimo capaz de produzir hemólise total

## Referências Bibliográficas

- BULLOCK, W. & HUNTER, — Ueber Pyocyanolysin, eine haemolytische substanz in Culturen des *Bacterium pyocyaneum*. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.* (Stuttgart), 28:865, 1900.
- CAMBA, S.A.C.; ALTERTHUM, F. & CARVALHO LIMA, L.P. — The influence of oxygen on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to streptomycin. *Rev. Microbiol.* (São Paulo), 2(2):79-82, 1971.
- CLARK, K.; GRAY, G.W. & REAVELEY, D.A. — The cell walls of *Ps. aeruginosa*. *Biochem. J.* (London), 105: 749, 1967.
- FAVORITE, G.O. & HAMMON, W.M. — The production of *Staphylococcus* Enterotoxin and alpha Hemolysin in a Simplified medium. *J. Bact.*, 41:305, 1941.
- FENSON, A.H. & GRAY, G.W. — Lipopolysaccharide of *P. aeruginosa*. *Biochem. J.*, 144:185, 1969.
- JARVIS, F.G. & JOHNSON, M.J. — A glyco-lipide produced by *Ps. aeruginosa*. *J. Amer. Chem. Soc.*, 71:4124, 1949.
- POLLACK, M.R. — Exoenzymes. In: GUNSALUS, I.C. & STANIER, R.Y., eds. — *The Bacteria*. New York, Academic Press, 1962, v.4, p. 121.
- ROBERTS, N.A.; GRAY, G.W. & WILKINSON, S.G. — Release of Lipopolysaccharide during the preparation of cell walls of *Ps. aeruginosa*. *Biochem. biophys. Acta* (Amst), 137:1068, 1967.

## Comparative study on SCP production from molasses, vinese or bakers yeast effluent

A.S. ELNawawy & M.A. Fouda\*

### Summary

A comparative study between three yeasts, *Candida utilis*, *C. pelliculosa* and *C. tropicalis* for the production of yeast protein, when grown on Egyptian blackstrap molasses, vinese or bakers yeast effluent. The experiments were carried out in NBS 'bioflo' chemostat, using exponentially fed batch cultures. The yields of yeast were compared and discussed. Yields obtained from yeasts grown on molasses were 62.5, 67.2 and 60.0% of sugar consumed respectively. About the same yields were obtained from molasses diluted with bakers yeast effluent by *C. utilis* and *C. pelliculosa*, while *C. tropicalis* gave 54.9% from vinese. Vinese and bakers yeast effluent are cheaper and costs of production lesser when molasses are used. Moreover, the use of those two wastes reduces the problems from pollution.

### Resumo

*Estudo comparativo da produção de SCP de melação, mosto e efluente de levedura de cerveja*

Estudo comparativo entre três leveduras — *Candida utilis*, *C. pelliculosa* e *C. tropicalis*, para a produção de biomassa proteica, em cultura a partir de melação, mosto e efluente de cervejaria. O rendimento em melação foi, respectivamente, 62,5%, 67,2% e 60,0% de açúcar consumido. Em melação diluído com efluente houve rendimento similar com *C. utilis* e *C. pelliculosa*, enquanto que, em mosto, *C. tropicalis* rendeu 54,9%. Mosto e efluente são mais baratos e o custo de produção menor do que quando melação é utilizado. Além disso, o uso daqueles dois resíduos reduz problemas de poluição.

### Introduction

Fodder yeast is accepted as protein source in poultry nutrition<sup>9</sup>. According to the increasing costs of fish meal and soya meal, the use of SCP in poultry feeding gains more grounds in economical studies.

In ARE, as poultry industry is one of the national means to increase animal protein per capita, the need for increasing SCP from the local cheapest sources is becoming more demanding.

Cane molasses produced in ARE (250,000 tons) is either exported (100,000 tons), or used for local production of ethyl alcohol and bakers yeast. In the same time, vinese (distillery slop) and bakers yeast effluent arising from these two industries contain, besides other organic matter, 0.5-0.7% sugar and represent two organic pollutants in Egypt, amounting to 1500m<sup>3</sup> and 200m<sup>3</sup> respectively per day.

The three raw materials, blackstrap molasses, vinese, and bakers yeast effluent, are the subject of the present work aimed to show the feasibility of

their use for the production of fodder yeast. If it proves useful the technique also help as a partial solution for pollution problems due to decreasing BOD of vinese and bakers yeast effluent when these are finally disposed.

### Materials and Methods

The four species of yeast used were *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y2572, *Candida utilis* NRRL Y900, *Candida pelliculosa*<sup>4,5</sup> and *Candida tropicalis*<sup>7</sup>.

Blackstrap molasses and vinese (distillery slop) were provided from distilleries at Hawamdia, and bakers yeast effluent from bakers yeast factory, Alexandria.

Molasses was diluted 1:3 with tap water. Each substratum was adjusted to pH.5, steamed and centrifuged at 12000r.p.m. (MSE with continuous head) for clarification. Clarified raw material was provided with ammonium sulfate and potassium dihydrogen

\* Fermentation Research Section, Agriculture Research Centre, Gamma Street, Giza, Egypt, ARE.

phosphate in amounts of 0.200 and 0.05g respectively per each gram of sugar. The salts were sterilised separately then added aseptically to sugar containing solutions. Final sterilisation was done by autoclaving for 15 min. at 15 p.s.i.

Assimilation experiments were conducted in a 'bioflo' C 30 fermenter (New Brunswick Scientific Co., U.S.A.) used for exponentially fed batch cultures using an exponential dosing apparatus (Fouda, Mohmoud & Taha, unpublished). The experiments were such that a starter of 30ml, produced in the same fermenter, under the same conditions, was exponentially fed with 210ml of the medium. The aeration/agitation system was 800ml/min. air and 600 r.p.m. stirring speed. The air sparger was left above the liquor surface to prevent excessive foaming. These conditions gave O.A.R. (oxygen absorption rate) of 3.5 nMO<sub>2</sub> per liter per minute at liquor volume of 60ml and 0.87 nMO<sub>2</sub> per liter per minute at liquor volume of 240ml (at the end of fermentation). Reproducibility of the same conditions was excellent. An alternative culture method was by using a start volume of 90ml water with 30ml of the starter and exponential feeding starter to deliver 120ml of double strength medium. The O.A.R. available at the beginning in this type of experiments was 23 nMO<sub>2</sub>/liter/min., and 0.87 nMO<sub>2</sub>/liter/min. at the end of fermentation. Generation time of four hours was used in all experiments. When using 30ml as the starting volume, temperature regulated water was circulated in the cold finger of the fermenter to control temperature. Additionally, extra side blades were added to the magnetic stirrer to make stirring of such small volume possible (Fouda, Mahmoud & Taha, unpublished).

**Chemical determinations:** O.A.R. was determined using the sodium sulfite method<sup>3</sup>. Reducing sugars were estimated according to Somogyi<sup>10</sup>. Total protein was determined by the Kjeldahl method, and ash content of yeast as mentioned in AOAC<sup>1</sup>.

### Results

As the main object of this investigation was to compare the relative efficiency of the strains tested, to yield biomass and protein, results are presented mainly as follows:

$$\text{Sugar utilisation} = \frac{\text{gram sugar utilised}}{\text{gram total sugars}} \times 100$$

$$\text{Biomass production} = \frac{\text{gram dry yeast produced}}{\text{gram utilised sugar}} \times 100$$

**Biomass from molasses** — To assess the relative efficiency of growth on molasses, the three yeasts

under investigation together with *Saccharomyces cerevisiae* were grown in the 'bioflo' fermenter. Table 1 shows the results obtained (mean of three experiments at least). For convenience results obtained from earlier experiments<sup>6</sup> using a 14 liters fermenter are also shown.

Almost similar results were obtained in both fermenter types concerning *C. utilis* and *C. pelliculosa*. In the case of *S. cerevisiae* yield improved in the 'bioflo' experiments, yet in all cases it was the least efficient yeast. It was therefore not used in the following experiments.

**Use of bakers yeast effluent and vnesse as diluents for molasses** — Biomass production using molasses and combination of molasses and other raw materials was tried using *C. utilis* and *C. pelliculosa*. Experiments started with molasses diluted with water to 2.5% sugar, one run for preparing the starter under the same conditions of experiment then another two runs for results, using 30ml of the immediately preceding liquor as starter for every run. Change to molasses diluted with one of the other two raw materials then took place, allowing one run to accommodate yeast to new medium between every two treatments. Table 2 shows the results obtained. It is clear that the sugar utilised by both yeast in all treatments was about the same. *C. utilis* benefited from bakers yeast effluent and was harmed by the addition of vnesse, while *C. pelliculosa* was affected by both diluents with a much more pronounced harmful effect of vnesse. Slightly better yields were obtained using *C. pelliculosa* grown on either molasses or molasses and bakers yeast effluent.

**Comparison between either molasses or vnesse** — Vnesse with its low sugar content (0.65%) was tried alone and compared to molasses diluted with water to 1% sugar. This set of experiments was run using a starting volume of 90ml of water + 30ml of starter, thus enabling the use of the 'bioflo' temperature control instead of circulating water. Oxygen available at the start did not vary if the whole volume was taken into consideration

$$\left(30\text{ml} \times \frac{3.5}{1000} \text{ nMO}_2, \text{ and } 120\text{ml} \times \frac{0.85}{1000} \text{ nMO}_2\right).$$

This is justified by the fact that all oxygen in the whole volume is available to quantity of cells present from the early beginning. Table 3 shows these results.

In the experiments of Table 3, higher sugar percentages were utilised from molasses than from vnesse by all yeasts. It is clear from the results that *C. pelliculosa* was the best assimilator among yeast tested and gave the lowest yield from vnesse. *C. tropicalis* proved to be the best among yeasts tested on vnesse alone. This suggest that it is the least sensitive yeast to the inhibiting effect of vnesse.

Table 1

Efficiency of sugar utilisation  
and biomass production by different yeasts.

Yeast	<sup>a</sup> Sugar utilisation %		<sup>b</sup> Biomass production %	
	bioflo fermenter (1)	14 liters fermenter (2)	bioflo fermenter (1)	14 liters fermenter (2)
<i>S. cerevisiae</i>	80.4	78.0	48.1	43.3
<i>C. utilis</i>	86.2	88.8	52.8	51.2
<i>C. pelliculosa</i>	90.5	89.5	56.3	57.0

<sup>a</sup> gram sugar utilised/gram initial sugar × 100

<sup>b</sup> gram dry yeast/gram sugar utilised × 100

(1) Starting volume 90ml starter + 120ml medium exponentially fed (2.5% sugar).

(2) Starting volume 3 liters, exponentially fed with double strength medium to reach 6 liters at the end of fermentation (double strength medium = 5% sugar).

Table 2

Comparative productivity of molasses and molasses diluted other raw materials<sup>a</sup>.

Treatments <sup>b</sup>	<i>C. utilis</i>		<i>C. pelliculosa</i>	
	sugar utilisation %	biomass production %	sugar utilisation %	biomass production %
Molasses + water	91.7	62.5	92.1	67.2
Molasses + bakers yeast effluent	91.0	63.4	90.8	65.9
Molasses + vinese	91.0	55.7	93.1	38.6

<sup>a</sup> Experiments performed in 'bioflo' fermenter using 30ml as starting volume

<sup>b</sup> 2.5% initial sugar of molasses

Table 3

Comparison of biomass produced by different yeasts, using dilute molasses and vinese.

Yeast strain	Sugar utilisation %		Biomass production %	
	Molasses <sup>a</sup>	Vinese <sup>b</sup>	Molasses <sup>a</sup>	Vinese <sup>b</sup>
<i>C. utilis</i>	90.1	86.3	57.0	50.4
<i>C. pelliculosa</i>	92.2	90.6	62.7	45.8
<i>C. tropicalis</i>	92.1	88.8	60.0	54.3

<sup>a</sup> 1% initial sugar, salts added in proportion to sugar concentration

<sup>b</sup> 0.65% initial sugar, salts added in production to sugar concentration

Table 4

Protein and ash content of investigated yeasts.

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. utilis</i>	<i>C. pelliculosa</i>	<i>C. tropicalis</i>
Protein%	48.0	51.2	54.7	54.2
Ash%	5.8	8.1	7.4	9.2

The histogram (Fig. 1) illustrates the relative sensitivity of yeasts tested, and a comparison between the yield obtained on different raw materials.

To complete the evaluation of the yeasts tested in the present investigation, their protein and ash content were estimated and shown in Table 4, which indicates the superiority of *C. pelliculosa* in protein contents followed by *C. tropicalis*.

**Discussion**

The use of either bakers yeast effluent or vnesse (distillery slop) for the production of fodder yeast is possible in two ways: either straight or as a diluent for molasses. In the last case bakers yeast effluent gave the same or better growth for both *C. utilis* and *C. pelliculosa*, calculated on sugar basis. No inhibitory effect could be detected. On the contrary, some growth promoting substances may be present as evidenced by the little increase in *C. utilis* yield

obtained by using the bakers yeast effluent as a diluent for molasses. On the other hand, vnesse effected the yield markedly for both *C. utilis* and *C. pelliculosa* when used as a diluent. It may contain inhibitory substances that reduces efficiency in utilising the sugar available including that of molasses. *C. pelliculosa* is very much affected by this raw material. The use of vnesse alone to restrict its effect to its contents of sugar was tried. The results obtained with *C. utilis*, *C. pelliculosa* and *C. tropicalis* were less than those obtained with molasses alone but still were high and reached the limits of theoretical yields (on sugar basis) as will be discussed below. The best yield obtained was by using *C. tropicalis* which showed less sensitivity to vnesse, while *C. pelliculosa* was the most sensitive to it.

Bakers yeast effluent was not used alone in this investigation, yet the results obtained from its use as a diluent indicate that this material might be used alone safely.

It should be noted however that the yields

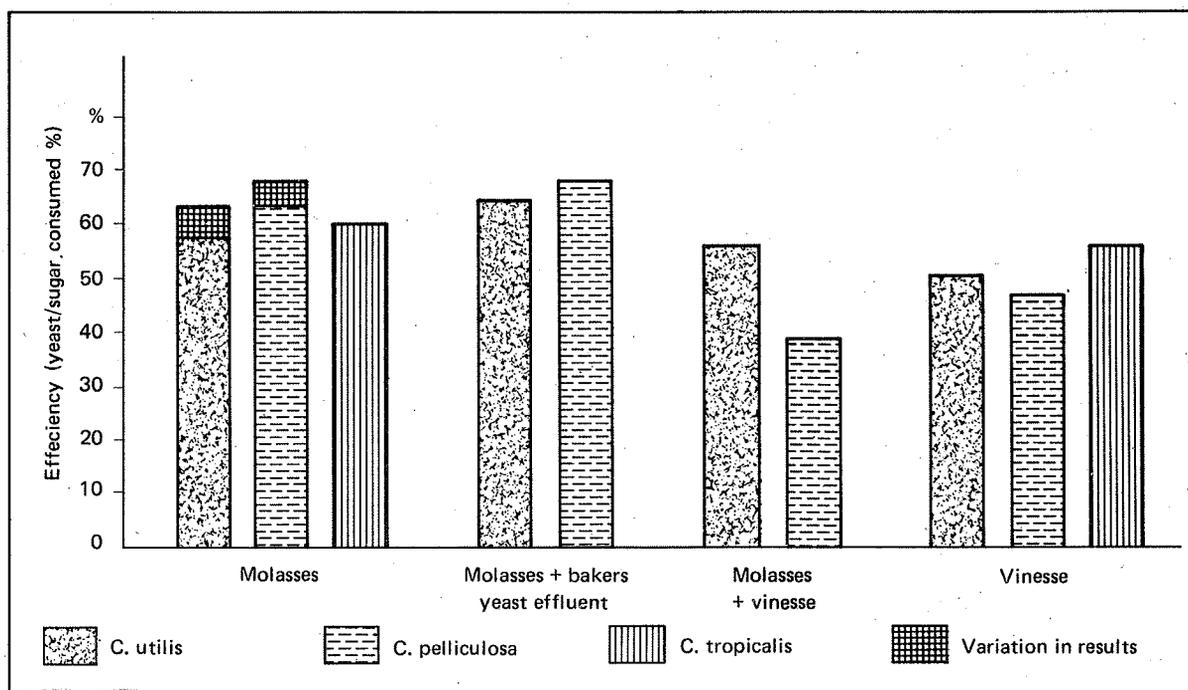


Fig. 1 - Efficiency of sugar conversion to biomass

obtained in this investigation were high and sometimes beyond the theoretical yields if sugar alone is considered<sup>8,11</sup>. The high yields may be attributed to assimilable carbon sources other than sugar in molasses and/or the use for the full automatic device for exponential adding of medium which is believed to be unavailable in almost all research laboratories with few exceptions<sup>2</sup>.

The consistency of results within one set of experiments was evident in this investigation, and even only 5% difference in efficiency was found between different sets of experiment growth conditions (Fig. 1). This is believed to be acceptable in experiments with such complexity of factors affecting the results. On the other hand, figures of the percentages of sugar utilised in different cases indicate the presence of nonfermentable sugars and other reducing materials.

Samples analysed for protein and ash content were taken from yeast propagated on molasses alone. Analysis showed that *C. tropicalis* and *C. pelliculosa* gave the highest percentages of protein. This result,

besides the productivity significance, also shows the superiority of *C. pelliculosa* for production of fodder yeast on molasses alone, molasses diluted with bakers yeast effluent, or bakers yeast effluent alone. When vinese is considered it should be used alone for growing *C. tropicalis*.

As the prices of molasses have been increasing progressively, the use of sugar containing effluents would reduce production costs from the raw material point of view. Higher yields are possible because of the little extra sugar and other utilisable materials found in it. If the effluents could be reused without the need for sterilisation, which is believed to be true in the case of vinese since it is heated enough in the distilling columns, the possibility of using this raw material is enhanced.

Finally, when vinese or bakers yeast affluent are disposed with less organic material, the BOD of the water (current or pool) in the disposal area will not be affected as much as when un-reused materials are disposed. This offers a good partial solution for environmental pollution in areas of such factories.

### References

1. A.O.A.C. — Official methods of analysis. A.O.A.C., Washington. 9th ed. 1960.
2. BURROWS, S. — Bakers yeast. In ROSE, A.H. & Harrison, J.S. (ed.) The yeast. Academic Press, London and New York, vol. 3, p. 349-420, 1970.
3. COOPER, C.M.; FERNSTROM, G.A. & MILLER, S.A. — Performance of agitated gas liquid contactors. *Ind. Eng. Chem.*, 36: 504-509, 1944.
4. ELNAWAWY, AMIN S. — Utilization of bagasse pith for the production of fodder yeast by the new isolate of *Candida pelliculosa*. *Antonie van Leuwenhook, Yeast Symposium*, 35, 1969.
5. ELNAWAWY, AMIN S.; FAHMY, M. & MALEK, Y. ABDEL. — Isolation and identification of a new strain of yeast suitable for growth on pentose substances. First Conference of Microbiology, Cairo, 1965.
6. ELNAWAWY, AMIN S. & FOUUDA, M.A. — Utilisation of Egyptian molasses in the production of single cell protein (SCP) — A comparative study on three different yeasts. *Agric. Res. Rev., Cairo*, 51:207-210, 1973.
7. ELNAWAWY, AMIN S.; FOUUDA, M.A. & AHMAD, A.S. — Utilisation of petroleum paraffinic fractions for the production of fodder yeast, 2: Growth of *C. tropicalis* on Morgan fractions. *Agric. Res. Rev., Cairo*, 51: 197-200, 1973.
8. HOSPODKA, J. — Industrial applications of continuous fermentation. In MALEK, I. & FENCL, Z. (ed.) "Theoretical and methodological basis of continuous culture of microorganisms" Academic Press, New York and London, p 495-645, 1966.
9. SHACKLADY, C.A.; VAN DER WAL, P. & VAN WEERDEN, E.J. — Further investigation on the use of hydrocarbon grown yeast in pig and poultry feeds. *GIAM III proceedings, Bombay*. p. 587-594, 1971.
10. SOMOGYI, M. — A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.*, 160: 61, 1945.
11. WHITE, J. — Yeast technology. John Wiley and Sons Inc. New York, 1954.

## A spontaneous Spo mutant of *Bacillus licheniformis* with increased respiratory metabolism

L. Rabinovitch, M. L. Palmeira & S. M. da Silva\*

### Summary

A spontaneous mutant strain Spo p-72 derived from *Bacillus licheniformis* 2390 has an increased global respiratory metabolism ( $QO_2$ ) as compared to the parental strain. Vegetative metabolism appeared altered as seen from the growth curves, in both complex and semi-defined media in which the mutant strain is less efficient, mainly in the first hours of growth.

### Resumo

*Mutante espontâneo oligoesporogênico (Spo) de Bacillus licheniformis com aumento do metabolismo respiratório*

Um mutante espontâneo oligoesporogênico (amostra Spo p-72) derivado de *Bacillus licheniformis* 2390, demonstrou aumento de seu metabolismo respiratório ( $QO_2$ ) global quando comparado à amostra parental. O metabolismo vegetativo se mostrou alterado, quando foram observadas as curvas de crescimento em meios complexo e de composição semi-definida, nos quais a amostra mutante é menos eficiente, principalmente nas primeiras horas do crescimento.

Alterations of both vegetative and respiratory metabolism have been found in oligosporogenic (Spo) mutants of *Bacillus*, which served to establish additional distinguishing marks between parental strains.

Such events were demonstrated for instance by Bott & Davidoff-Abelson (*J. Bact.*, 92:229-240 1966) with mutants of *B. subtilis* induced by acridine-orange. Concerning the respiratory metabolism, NADH<sup>+</sup> H<sup>+</sup> oxidase and glucose dehydrogenase, necessary for sporulation were both altered in all mutant strains. Previously, Szulmajster & Schaeffer (*Compt. Rend.*, 252:220-225, 1961) had pointed out that NADH<sup>+</sup> H<sup>+</sup> oxidase activity was clearly superior in sporogenic strains of *B. subtilis*.

The present communication reports some characteristics of an oligosporogenic mutant of *B. licheniformis* which has its vegetative and respiratory metabolism altered. The mutant strain Spo p-72 was obtained spontaneously from *B. licheniformis* 2390, which is able to sporulate in a very simple mineral synthetic medium, with glucose as sole carbon source and when Mn<sup>2+</sup> is present (Rabinovitch, L., *Rev. Bras. Farm.*, 51:205-208, 1970).

The Spo mutant's condition and its identity in relation to the parental strain were disclosed by means of colonial characteristics, respiratory and biochemical behaviour, and its capacity to produce spores. Specific biochemical behaviour was investigated according to Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (The Williams and Wilkins comp., pp. 613-634, 1957), and according to Lemille, de Barjac & Bonnefoi (*Ann. Inst. Pasteur*, 116:808-819, 1969) with both parental and mutant strains being placed in the group I. Sporulation frequency was determined as the ratio of the number of survivors from heating and the viability before heating (85°C for 20 minutes), from cultures grown 120hr without shaking. The sporulation frequency of strain 2390 is  $8.5 \times 10^{-1}$ , whereas in Spo p-72 is less than  $10^{-7}$ . Furthermore, the mutant is not able to produce endotrophic spores in a non-nutritive buffered medium containing mineral salts (Rabinovitch, L. & Silva S. M. da, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 71:149-155, 1973). Spo mutant does not show auxotrophism when cultured in a minimal mineral medium containing  $5.5 \times 10^{-2}$  M of glucose. With regard to checking the block possible site in different stages of sporogenesis, according to

\* Department of Microbiology and Immunology, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.



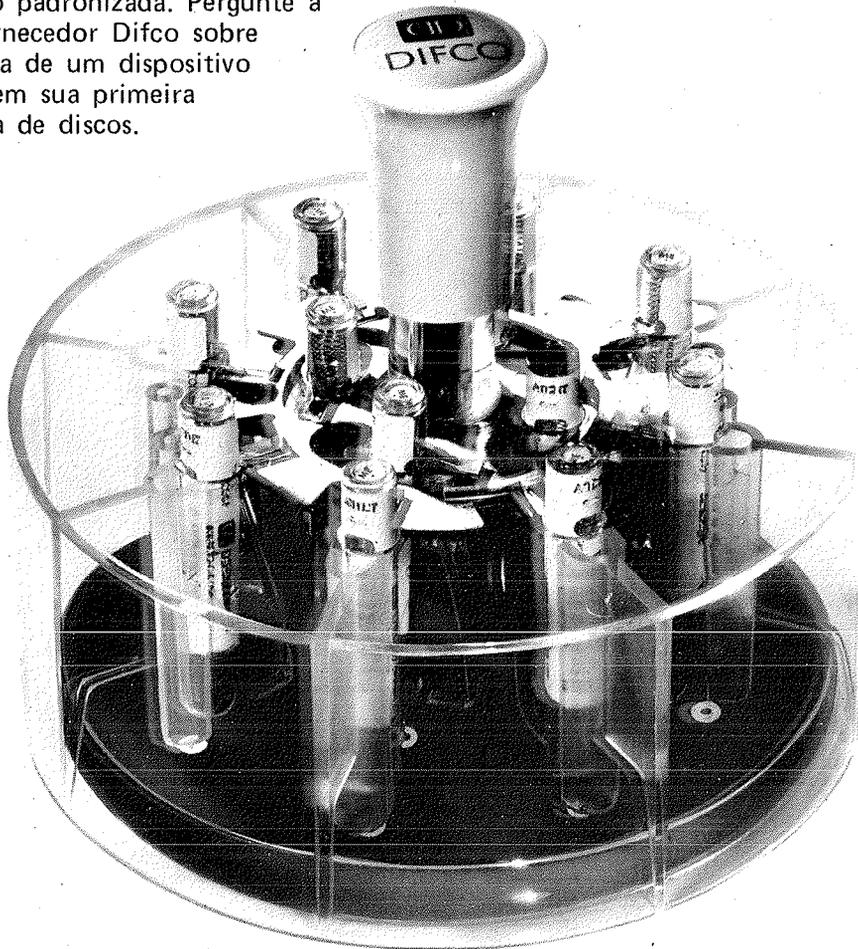


# Por que nossos antibiogramas são os melhores?

O sistema *Dispens-O-Disc* da Difco oferece vantagens inigualáveis a seu laboratório para a realização de antibiogramas:

- discos em magazines individuais que funcionam como o próprio dispositivo e dispensam pinças ou adaptadores para utilização;
- coleção completa de discos e concentrações, inclusive Bactrim, Rifampicina e antimicrobianos mais recentes;
- dispositivos para 8 e 12 magazines, que permitem colocar os discos sobre a superfície do agar segundo posição padronizada. Pergunte a seu fornecedor Difco sobre a oferta de um dispositivo grátis em sua primeira compra de discos.

Se se preocupa com a qualidade de seus antibiogramas e valoriza seu tempo, não duvide — Difco lhe oferece o melhor sistema para antibiogramas e o processo mais econômico para seu laboratório.



**DIFCO LABORATORIES**  
Detroit, Michigan 48232, USA

Para informações adicionais,  
entre em contato conosco:

**DIFCO LABORATORIES**  
Caixa Postal 3072  
01000 São Paulo SP