Volume 7 Número 3 Jul.–Set. 1976

Revista de Microbiologia

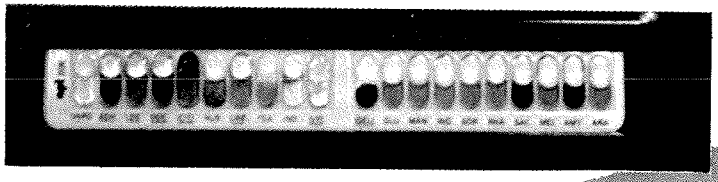
Regina

Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo – Brasil

SOMOS PARA MOPESNEGER NÃO

api system

abriu o caminho da estandardização na identificação bacteriológica.

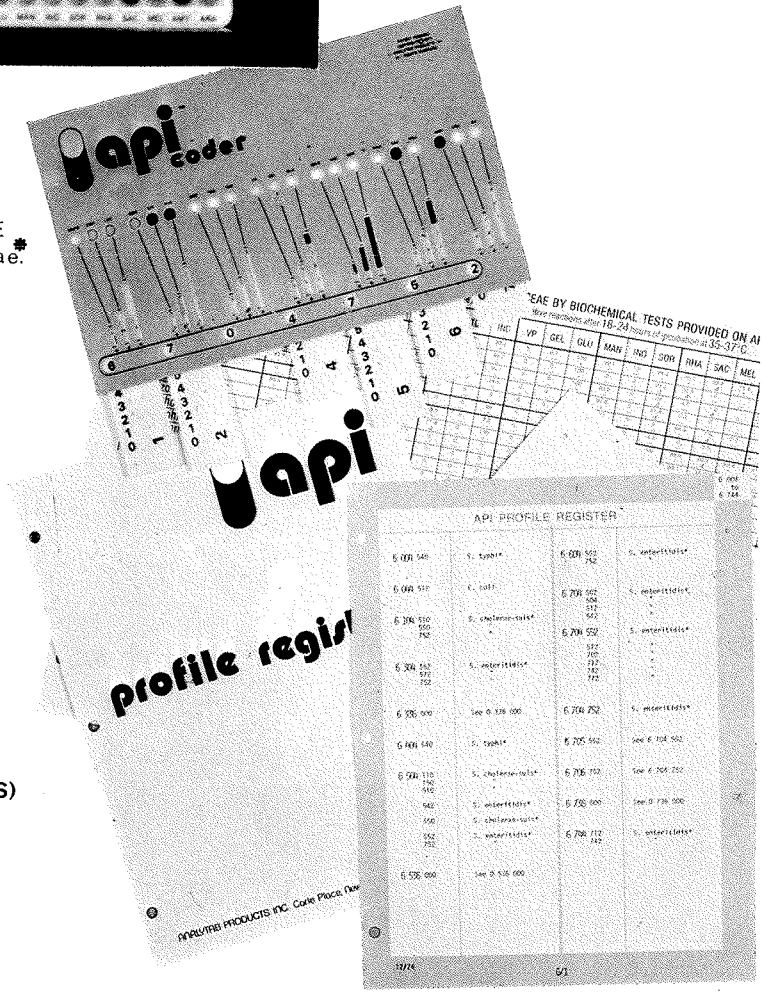


API 20 E e o SISTEMA DE LEITURA CODIFICADA põem à disposição dos laboratórios mais de 25.000 cepas registradas de ENTEROBACTERIACEAE e outros GRAM (−) não-Enterobacteriacea e.* Esse é o resultado de vários anos de colaboração entre utilizadores, centros de referência e os serviços de pesquisa API na França e na América. E, amanhã, esse número crescerá ainda mais com a sua participação.

*Pseudomonas, Aeromonas, Víbrio, Moraxela, etc.

Sempre com o mesmo princípio de microtécnica padronizada API SYSTEM identifica também:

- **os germes anaeróbios (API 20 ANAERÓBIOS)**
- **os agentes das principais micoses encontradas em clínica (API 20 CÂNDIDA)**
- **germes os mais diversos (API 50 PESQUISA, API 50 LACTOBACILLUS)**
- **ou apenas as Enterobacteriaceae (API 10 SCREEN)**



BIOLAB-MÉRIEUX PRODUTOS PARA LABORATÓRIOS LTDA.

Rua do Resende, 96-A – 2.º andar – Tels.: 221-4089 e 242-0050
RIO DE JANEIRO, RJ. – 20.000 – ZC-06

SÃO PAULO – BRASÍLIA – PORTO ALEGRE – RECIFE – BELO HORIZONTE

REVISTA DE MICROBIOLOGIA - SBM
Av. Prof. Lineu Prestes, 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 Flavio Alterthum e Sergio O.P. da Costa

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, Seymor 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 Mariuce 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).

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 (mμ) 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 in- de milimicro (mμ); e Angstroms (A; 10^{-10}m). Partes por milhão (ppm) devem ser expressas como microgramos por mililitros (μg/ml) ou microlitros por litro (μ litros/litro). A Revista se reserva o direito de adaptar os manuscritos ao estilo adotado.

NOMENCLATURA 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.

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
Depto. de Microbiologia – ICB II – USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 – Cid. Universitária
CEP 05508-900 – São Paulo - SP - BRASIL
Site: www.revmicro.cjb.net

Revista de Microbiologia

Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia

Volume 7 Julho-Setembro 1976 Número 3

Rev. Microbiol. (S. Paulo), 7(3)

CONTEÚDO – CONTENTS

Artigos originais

Comparação das propriedades de interferon de células L estimuladas por diferentes indutores. II. Filtração em gel e centrifugação isopícnica [Comparison of the interferon properties of L cells stimulated by different inducers. II. Gel filtration and isopicnic centrifugation] – Romain Rolland Golgher, Paulo Cesar Peregrino Ferreira, Maria de Lourdes Petrillo Peixoto & José Mário da Silveira Mezencio 55

Atividade da nitrogenase na rizosfera de gramíneas tropicais forrageiras [*Nitrogenase activity in the roots of tropical forage grasses*] – Maria Cristina P. Neves, John M. Day, Adilson M. Carneiro & Johnna Dobereiner 59

Métodos de contagem de colônias em superfície e em profundidade como técnicas de referência para avaliação quantitativa de bacteriúria [*Surface and pour-plate colony counting as reference methods for quantitative evaluation*] – Alba Lúcia Solino Noleto, Alberto Strozemberg & Italo Suassuna 66

Sociedade Brasileira de Microbiologia

Sócios Patrocinadores

BIOLAB-MÉRIEUX – Produtos para Laboratórios Ltda.

Eli Lily do Brasil Ltda.

Indústria Química e Farmacêutica Schering S.A.

Comparação das propriedades de interferon de células L estimuladas por diferentes indutores. II. Filtração em gel e centrifugação isopícnica*

Romain Rolland Golgher, Paulo Cesar Peregrino Ferreira**, ***,
Maria de Lourdes Petrillo Peixoto**** & José Mário da Silveira Mezencio****

Resumo

Os interferons de células L, induzidos pelo complexo de ácido poliinosínico e ácido policitidílico (poli I:C) adjuvado por dietilaminoetil (DEAE) – dextrana ou pelo vírus da doença de Newcastle inativado pela luz ultravioleta (NDV-UV), apresentarm o mesmo perfil de eluição em Sephadex G-100. As densidades de flutuação dos dois interferons em gradientes de CsCl revelaram um mesmo valor ou seja, 1,32g/cm^3. Estes interferons, produzidos por um cultivo celular homogêneo, têm muitas características em comum em relação à sua síntese e às propriedades de suas moléculas, sugerindo que as células L tenham um único cistron para a codificação de interferon.

Summary

Comparison of the interferon properties of L cells stimulated by different inducers. II. Gel filtration and isopicnic centrifugation

Interferons induced in L cells by polyinosinic-polycytidylic acid complex (poli I:C) mixed with diethyl-aminoethyl (DEAE) – dextran or by ultraviolet – inactivated Newcastle disease virus (NDV-UV) have the same elution profile in Sephadex G-100. The buoyant density in CsCl gradients of both interferons showed a value of 1,32g/cm^3. These interferons, produced from a homogeneous tissue culture line, share many common characteristics regarding their synthesis and molecular properties, which suggests that L cells have only one cistron coding for interferon.

Introdução

A capacidade de uma célula animal para sintetizar mais de um tipo de interferon é ainda uma questão aberta. O estudo de várias propriedades do interferon proveniente de um cultivo celular homogêneo (células L) estimuladas pelo NDV-UV (9), assim como a demonstração de que estas células, em contato com poli I:C adjuvado com DEAE-dextrana, produziam interferon (5), possibilitou comparar as características destas duas substâncias e, desta forma, contribuir para esclarecer se a resposta celular frente a indutores de interferon pode ser múltipla.

Em trabalho anterior (6), a cinética de produção e a inibição da síntese pela actinomicina D dos interferons mencionados foram abordadas. Neste artigo são relatados os resultados da filtração em gel de Sephadex G-100 e da centrifugação isopícnica em cloreto de césio.

Material e Métodos

A manutenção dos cultivos celulares, o preparo dos estoques de vírus e sua titulação, a dosagem de interferon e outros detalhes foram descritos em artigo anterior (6).

Obtenção de interferon – Células L, confluentes, em garrafas redondas drenadas, foram infetadas com 0,6ml de NDV-UV (20 segundos). Depois de uma hora a 37°C, acrescentou-se 9,4ml de meio de crescimento-meio basal de Eagle, com soro de cavalo ou bezerro (10%), bicarbonato de sódio (0,12%), L-glutamina (2,9%) e 100 unidades de penicilina/ml e 100 microgramas de estrepetomicina/ml. Os fluidos foram coletados após 24 horas de incubação a 37°C, concentrados por ultrafiltração cerca de 20 vezes, submetidos à diálise contra tampão pH2 e pH7 (9) e mantidos a 4°C até sua utilização.

Para o interferon induzido por poli I:C, foram

* Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciência Biológicas da UFMG, Belo Horizonte MG.
** Endereço atual – Departamento Autônomo de Saúde, Florianópolis, SC.
*** Bolsista da CAPES
**** Bolsista do CNPq

adicionados 100 microgramas do composto, misturado com 5mg de DEAE-dextrana, em 0,6ml de meio de crescimento, a garrafas redondas com monocamadas de células L. Decorridas quatro horas a 37°C, o excesso de líquido foi desprezado e as células de cada garrafa foram lavadas com 25ml de solução de Hanks. Acrescentou-se 10ml de meio de crescimento e 24 horas após a indução, o subrenadante foi colhido e manipulado conforme acima.

Filtração em gel de Sephadex G-100 — Uma coluna de Sephadex G-100, de 1,5 por 90cm, em que o gel foi equilibrado com salina tamponada com fosfato 0,01M; pH7,2 (STF) foi utilizada, tendo-se o cuidado de passar os dois tipos de interferon sucessivamente na mesma coluna. A cromatografia foi realizada à temperatura ambiente, com um fluxo de 20ml/h e a eluição foi feita com STF. O volume das frações foi de 6ml, recebendo cada uma 0,5% (concentração final) de albumina plasmática bovina.

As amostras foram esterilizadas pela exposição à luz ultravioleta por dois minutos, no mesmo aparelho utilizado para inativação de NDV (9). Os títulos de interferons permanecem inalterados com este tratamento. Os materiais foram conservados a 4°C até sua titulação.

Centrifugação isopícnica em cloreto de césio — A 5ml de uma preparação concentrada de interferon, o CsCl foi adicionado até a quantidade de 1,32g/cm^3. Parafina líquida (0,3ml) foi acrescentada no topo de cada tubo, para evitar a evaporação e estes foram submetidos a 276.000 X *g* num rotor SW-50 Spinco, a 4°C. Após 72 horas, interrompia-se a centrifugação e coletavam-se frações de 20 gotas. O índice refração das alíquotas foi determinado em refratômetro Abbe-3L Bausch-Lomb e por intermédio de tabelas (11), fez-se a transformação daquele para concentração de CsCl. Volume conhecido do restante de cada fração foi diluído em STF, com 0,5% de albumina plasmática bovina, esterilizado em luz ultravioleta e permanecia a 4°C até a dosagem de interferon.

Resultados

Filtração em Sephadex G-100 — 3ml de interferon induzido por NDV-UV, contendo 120.000 unidades, foram aplicados à coluna de Sephadex G-100, verificando-se após a eluição, uma recuperação de 70% da atividade. O perfil obtido está representado na Fig. 1.

Do interferon induzido por poli I:C, foram utilizadas 59.000 unidades em 3ml, e recuperou-se 65% da atividade, e o seu comportamento na coluna encontra-se na Fig.1.

Como se pode notar, não houve uma coincidência dos picos, fato provavelmente explicado pelo método

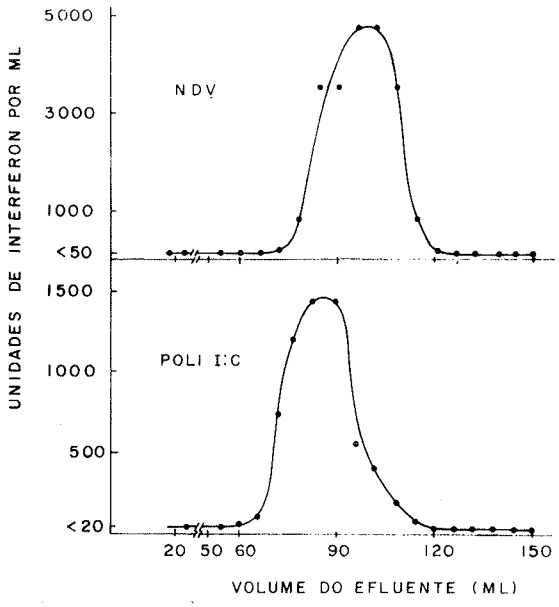


Fig. 1 — Perfis cromatográficos da atividade biólogica dos interferons de células L induzidos por NDV ou poli I:C em Sephadex G-100.

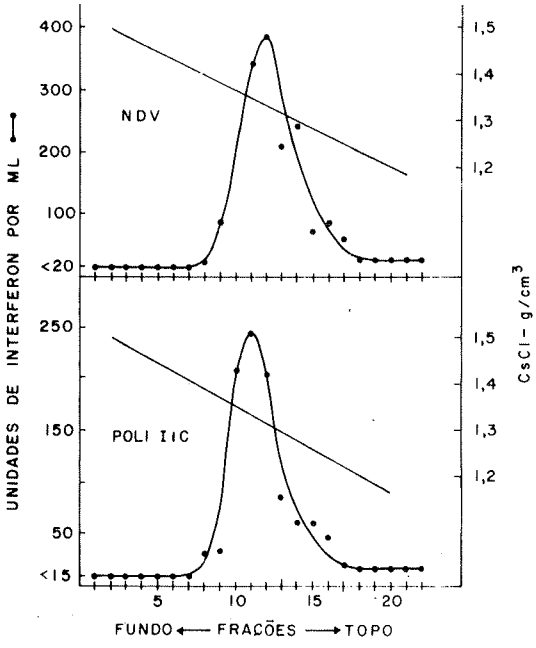


Fig. 2 — Determinação da densidade de flutuação em CsCl dos interferons de célula L induzidos por NDV ou poli I:C.

de dosagem de interferon, em que a diferença de uma diluição está dentro do erro experimental(5). O volume do efluente, em ambos os casos, foi o mesmo, e o peso molecular dos interferons é praticamente igual, com a possível discrepância de 10%(1).

Centrifugação isopícnica em CsCl — Com a ultracentrifugação e procedimentos posteriores não houve perda significativa do título (cerca de 80% da atividade foi recuperada) com ambos os interferons. Os resultados obtidos estão expostos na Fig. 2. A densidade de flutuação em CsCl dos dois interferons foi de 1,32g/cm^3.

Discussão

Não foram encontradas diferenças quanto ao comportamento dos interferons de células L, induzidos por NDV-UV ou por poli I:C, em filtração em gel de Sephadex G-100. Isto indica um peso molecular para ambos os interferons de cerca de 23.000 daltons (9). Stewart e colaboradores mostraram que o interferon de células L, produzido por NDV, ou os interferons de cultivos primários de rim de camundongo, estimulados por NDV ou poli I:C, tinham peso molecular idêntico (13). No entanto, em células L-929, o peso molecular de interferon induzido por NDV-UV foi de 38.000 daltons, ao passo que as células que entraram em contato com poli I:C liberaram um interferon com 150.000 daltons, que era dissociável a pH3,5, em componentes com 38.000 daltons (10). Esta aparente discrepância com as nossas experiências, nas quais o interferon estimulado por poli I:C não foi submetido a pH baixo, talvez possa ser explicada pela amostra de células L utilizada. Além das diferenças de peso molecular, as células L-929, expostas a poli I:C, liberaram um interferon cuja síntese foi mais resistente à actinomicina D do que a do interferon estimulado por NDV (4). Na nossa amostra celular, o efeito do antimetabólito foi o mesmo (6).

A heterogeneidade dos interferons sintetizados "in vivo" ou "in vitro" por populações celulares de órgãos diferentes, de uma espécie animal, é fato que tem sido muitas vezes comprovado (3). Como as células de um animal são portadoras dos mesmos genomas, haveria a possibilidade de que uma célula fosse capaz de sintetizar mais de um tipo de interferon. Evidências experimentais neste sentido foram obtidas quando células "in vitro" foram estimuladas por diversos indutores e verificou-se que as curvas de liberação de interferon no meio, assim como sua sensibilidade de produção a inibidores foram diferentes, dependendo do indutor empregado (2, 4, 7, 8, 13, 14).

No sistema experimental que empregamos, os interferons induzidos por NDV-UV e poli I:C mostraram cinética de produção e sensibilidade de síntese à actinomicina D comparáveis (6), e as suas moléculas têm uma notável semelhança, apresentando peso molecular e densidade de flutuação em CsCl idênticas; sua carga elétrica é igual, como pôde ser demonstrada pelo comportamento em cromatografia em CM-Sephadex C-25 (Golgher e Paucker, dados não publicados), assim como o perfil em focalização de ponto isoelétrico (12). Eles devem ainda partilhar de sítio(s) ativo(s), já que têm, pelo menos, uma função biológica-anti-vírica-comum.

Nossos achados sugerem que um só cistron codifique para a síntese de interferon em células L. As evidências acima referidas, através das quais foi possível verificar diferenças no comportamento celular frente a indutores de interferon não são, entretanto, definitivas, por várias razões. Muitas vezes, os cultivos celulares eram primários e, por isto, poderiam ser heterogêneos, contendo mais de um tipo de célula. A adição de DEAE-dextrana a poli I:C modificava a cinética de liberação de interferon e a sensibilidade de sua síntese à actinomicina D (15). Interferons com curva de produção diferente foram indistingüíveis antigenicamente (Vilcek, Havell, Moses e Berman, em impressão) e podiam ter peso molecular igual (13). Tais diferenças, conseqüentemente, poderiam refletir apenas que a fase inicial do processo de indução fosse diversa, vindo a ver desreprimido o(s) mesmo(s) gene(s) (8, 15) (Vilcek, Havell, Moses e Berman, em impressão).

Tendo em vista que as experiências com curva de produção e o emprego de inibidores fornecem dados não conclusivos, um maior número de cultivos celulares homogêneos, capazes de serem estimulados por mais de um indutor, deverão ter estudadas as propriedades moleculares de seus interferons, a fim de se comprovar se uma célula pode formar mais de um tipo de interferon.

Agradecimentos

Os autores agradecem a João Rodrigues dos Santos, Maria Lúcia Trindade e Bernadete de Jesus Martins a cooperação técnica e aos prof. Zigman Brener e José Noronha Peres a revisão do manuscrito, e também à SOMAI S.A., por parte dos ovos embrionados utilizados neste trabalho.

Esta pesquisa foi auxiliada pelo CNPq (TC 10836), Conselho de Pesquisas da UFMG, Convênio BNDE/FUNTEC 132 e pela CAPES.

Referências Bibliográficas

1. ANDREWS, P. — Estimation of the molecular weights of proteins by sephadex gel-filtration. *Biochem. J.*, 91:222-233, 1964.
2. BAUSEK, G. H. & MERIGAN, T. C. — Simultaneous viral and nonviral interferon production in human cell cultures. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 133:982-985, 1970.
3. FANTES, K. H. — Purification and physicochemical properties of interferons, pp. 171-200. *In*: FINTER, N. B., ed-Interferon and interferon inducers, 2nd ed. Amsterdam, North-Holland Publishing Co, 1973.

4. FINKELSTEIN, M. S.; BAUSEK, G. H. & MERIGAN, T. C. — Interferons inducers in vitro: difference in sensitivity to inhibitores of RNA and protein synthesis. *Science*, 161:465, 1968.

5. GOLGHER, R. R. — Efeito bloqueador do interferon de células L sobre sua síntese. Tese de doutoramento, 108 pp., 1971.

6. GOLGHER, R. R.; PEIXOTO, M. L. P.; MEZENCIO, J. M. S. & FERREIRA, P. C. P. — Comparação das propriedades de interferon de células L estimuladas por diferentes indutores. I. Cinética de liberação e sensibilidade à actinomicina D. *Rev. Microbiol.*, 7:31-34, 1976.

7. LONG, W. F. & BURKE, D. C. — Interferon production by double-stranded RNA: a comparison of induction by a synthetic double-stranded polynucleotide. *J. gen. Virol.*, 12:1-11, 1971.

8. MOSES, L. W. & VILCEK, J. — Interferon induction in rabbit cells irradiated with UV-light. *J. Virol.*, 13:646-651, 1974.

9. PAUCKER, K.; BERMAN, B. J., GOLGHER, R. R. & STANCEK, D. — Purification, characterization, and attempts at isotopic labeling of mouse interferon. *J. Virol.*, 5:145-152, 1970.

10. PITHA, P. M.; MARSHALL, L. W. & CARTER, W. A. — Interferon: the dissociation of rIn • rCn induced proteins by protonation. *J. gen. Virol.*, 21:169-174, 1973.

11. SOBER, H. A. — Hand book of Biochemistry, 2nd ed. The Chemical Rubber Co. Cleveland, 1970.

12. STANCEK, D.; GRESSNEROVA, M. & PAUCKER, K. — Isoeletric components of mouse, human and rabbit interferons. *Virology*, 41:740-750, 1970.

13. STEWART, W. E., II; GOSSER, L. B. & LOCKART, R. Z., JUN. — Distinguishing characteristics of the interferon responses of primary and continous mouse cell cultures. *J. gen. Virol.*, 13:35-50, 1971.

14. VILCEK, J. — Cellular mechanisms of interferon production. *J. gen. Physiol.*, 56:76-89s, 1970.

15. VILCEK, J.; BARMAK, S. L. & HAVELL, E. A. — Control of interferon synthesis: effect of diethyl-aminoethyl-dextran on induction by polyinosinic-polycytidylic acid. *J. Virol.*, 10:614-621, 1972.

Atividade da nitrogenase na rizosfera de gramíneas tropicais forrageiras

Maria Cristina P. Neves, John M. Day, Adilson M. Carneiro & Johnna Dobereiner

Resumo

A fixação de nitrogênio, na rizosfera de algumas gramíneas tropicais forrageiras, foi avaliada pelo método de redução de acetileno. Os resultados oscilaram muito entre os locais de coleta, mas indicam uma importância econômica em várias espécies. A atividade máxima da nitrogenase obtida (médias de seis repetições de amostras de raízes, e expressas em n-moles de C_2H_4 por grama de raiz seca e por hora) foi 954 para *Pennisetum purpureum*, 730 para *Brachiaria mutica*, 341 para *Digitaria decumbens*, 299 para *Panicum maximum*, 283 para *Paspalum notatum*, 269 para *Cynodon dactylon*, 41 para *Melinis minutiflora* e 29 para *Hyparrhenia rufa*.
Diferenças significativas entre ecotipos de *P. notatum* com relação à ocorrência e fixação de nitrogênio pelo *Azotobacter paspali*, indicam possibilidades de seleção de plantas com o objetivo de incentivar a fixação de nitrogênio pelas bactérias na raiz. Tem também importância agronômica os efeitos dos fertilizantes. Em blocos intactos de solo e *Paspalum*, 20ppm de amônio inibiram a atividade da nitrogenase dentro de duas horas e 20ppm de nitrato, dentro de quatro horas. Entretanto, depois de uma semana estes efeitos desapareceram. No campo, a adição de 20kg de nitrato de amônio por hectare, aplicado cada duas semanas não afetou a atividade da nitrogenase em *P. purpureum* e *D. decumbens*.

Summary

Nitrogenase activity in the roots of tropical forage grasses

Evaluation of the nitrogen fixation, in the roots of tropical forage grasses by the acetylene reduction method. Values varied considerably from distinct collection sites. Maximum nitrogenase yield (average from six analyses with root samples, expressed in nmoles C_2H_4g dry roots h) observed: 954 for *Pennisetum purpureum*, 730 for *Brachiaria mutica*, 341 for *Digitaria decumbens*, 299 for *Panicum maximum*, 283 for *Paspalum notatum*, 269 for *Cynodon dactylon*, 41 for *Melinis minutiflora*, and 29 for *Hyparrhenia rufa*. Significant differences among the ecotypes of *P. notatum*, with regard to the occurrence and fixation of nitrogen by *Azotobacter paspali* suggest the possibility of plant selection to improve nitrogen fixation by root associated bacteria. Fertilizers also played in the process. In intact soil blocks and *Paspalum* 20 parts/10^6 ammonium inhibited nitrogenase activity within 2 hours; 20 parts/10^6 nitrate did it in four hours, but all the effects disappeared after one week. In field conditions 20kg NH_4NO_3/ha caused no inhibition in the nitrogenase activity after top dressing in two-weeks periods in *P. purpureum* and *D. decumbens*.

Introdução

Ao contrário dos valores relativamente baixos encontrados para a fixação de nitrogênio em clima temperado, sob o clima tropical a fixação de nitrogênio na raiz de gramíneas pode ter importância econômica (1, 7, 11). Isto possivelmente se liga à capacidade das gramíneas tropicais de aproveitar mais energia luminosa do que necessitam, através da via fotossintética C-4 (via de ácidos dicarboxílicos; 9), que as torna capazes de usar mais eficientemente altas temperaturas e intensidades luminosas. Porém, a ocorrência e a fixação de nitrogênio pelas bactérias na raiz das gramíneas é influenciada por inúmeros fatores. Huser (10) notou que, quando a relação carbono/nitrogênio é baixa, quase nenhum nitrogênio é fixado, daí a importância das gramíneas de via C-4 que, supõem-se, terão maiores possibilidades, através da exudação de açúcares, de aumentar a relação C/N. Por outro lado, os fertilizantes fosfa-

* Apresentado na GIAM IV — Quarta Conferência sobre os Impactos Globais da Microbiologia Aplicada, São Paulo, Julho 1973. Trabalho da Seção de Solos, EMBRAPA, km 47 Via Campo Grande ZC-26, 20000 Rio de Janeiro RJ.

tados podem aumentar o número de *Azotobacter* sp. (8) e a atividade da nitrogenase na rizosfera de milho (2). Também a umidade parece favorecer a a ocorrência de *Derxia* sp. (3).

A ocorrência de *A. paspali* é limitada à rizosfera de poucas variedades de *P. notatum* (5) e é específico para a rizosfera e rizoplan de variedades tetraplóides nativas. Isto sugere uma estreita relação entre a bactéria e a planta superior. Quando mudas são transplantadas para novo campo, passam-se meses até que a associação torne a se estabelecer (6). Isto vem demonstrar que o genótipo da planta é tão decisivo quanto as características do solo.

Neste trabalho foi feita uma avaliação da atividade da nitrogenase na raiz das gramíneas forrageiras mais importantes na região e da influência que genótipos de plantas e fertilizantes possam ter.

Material e Métodos

O trabalho pode ser dividido em quatro partes: um levantamento preliminar da ocorrência de fixação de nitrogênio em plantas colhidas no campo, dois experimentos sobre o efeito da adubação nitrogenada e um sobre o efeito de ecotipos e cultivares na fixação de nitrogênio. A fixação de nitrogênio foi avaliada em todos os trabalhos pelo método de redução de acetileno (4).

Levantamento — Foram coletadas no campo, com pastagem já formada, amostras de raízes das seguintes gramíneas: pangola (*D. decumbens*), angola (*Brachiaria mutica*), *B. decumbens, B. ruziziensis, Brachiaria* sp., *Brachiaria* sp. cv. tanergrass, bermuda suwanee (*Cynodon dactylon*), gordura (*Melinis minutiflora*), jaraguá (*Hyparrhenia rufa*), colonião (*Panicum maximum*) e elefante (*Pennisetum purpureum*). Cada espécie foi coletada em diversos locais, com o intuito de se verificar a flutuação normal da fixação que pudesse ocorrer. Em cada local foram coletadas seis amostras de raízes e três de solo abaixo da vegetação.

As raízes retiradas do solo foram imediatamente mergulhadas em água. Foram cortadas aproximadamente 0,5g de raiz, colocadas em frascos de 28ml, vedados com rolhas de borracha perfuráveis. O ar nos frascos foi substituído por uma mistrua de N_2:O_2 na proporção de 96:4, e os frascos foram pré-incubados até o dia seguinte, na temperatura ambiente. Após este período, foram injetados de 8 a 10% de acetileno. O mesmo tratamento, com exceção da lavagem, foi dado ao solo da rizosfera. O etileno produzido pela atividade da nitrogenase foi avaliado em amostras consecutivas de 0,5ml, num cromatógrafo de gás Perkin Elmer (F 11) com coluna Poropak N de 2m por 5mm, a 100°C, nitrogênio como gás de arraste (25ml/min) e ionização de chama de hidrogênio. Misturas de etileno e ar conhecidas foram usadas para calibrar e todos os valores foram corrigidos para contaminação com etileno do acetileno usado. O acetileno também foi medido em todas as amostras para servir de testemunha para erros de amostragem ou injeção.

A medida do etileno produzido foi feita três a quatro horas após a injeção de acetileno, no caso das raízes, e de 8 a 10 horas, no caso dos solos. Com as amostras de solo também foram feitas determinações de umidade e capacidade de campo.

Efeito de genótipos da planta na fixação de nitrogênio — Foi instalado um experimento de campo, num solo "gray" hidromórfico arenoso, da série Ecologia, sobre o efeito de diferentes cultivares de *P. notatum* na ocorrência e atividade da nitrogenase de *A. paspali*, com quatro repetições e seis tratamentos.

Os cultivares usados foram Pensacola Argentina 50, Pensacola Flórida 48, híbrido Tiphen 53, híbrido Pensacola 55, batatais Matão 61 e batatais Km 47 T_7, sendo os tipos 48, 53, 61 e T_7 já conhecidos por estimular o crescimento de *A. paspali*, enquanto os dois outros, 50 e 55, são menos favoráveis (dados não publicados).

Foi feita adubação básica com cerca de 500kg/ha de superfosfato simples (8,73% de P). Foram tomadas amostragens após um e quatro meses, para medida da atividade da nitrogenase segundo o método descrito anteriormente e contagem de colônias de *A. paspali*. Para a contagem, foi usado um meio de cultura com a seguinte composição: 20,0g de agar-agar, 20,0g de açúcar, 0,5ml de K_2HPO_4 solução 10%, 2,0ml $CaCl_2$ solução 1%, 2,0ml de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ solução 10%, 2,0ml $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ solução 0,1%, 1,5ml KH_2PO_4 solução 10%, 1ml $FeCl_3$ solução 1%, 5ml de azul de bromotimol solução 0,5% alcoólica, 1g de $CaCO_3$ e água destilada na quantidade suficiente para completar um litro. A inoculação das placas de Petri foi feita com 20mg de solo do "rizoplan" peneirado a 0,5mm e pulverizado sobre a placa. As placas assim preparadas foram incubadas a 34 graus centígrados e após 24 horas foram contadas as colônias de *Azotobacter chroococcum*, que foram raros, e, após 48 horas, as de *A. paspali*.

No fim de quatro meses, foi feito o primeiro corte para determinação da produção de forragem e análise do teor de nitrogênio pelo método Kjeldahl.

Efeito da adubação nitrogenada em plantas de Pennisetum purpureum e Digitaria decumbens crescendo no campo — Foi instalado um experimento de campo, num solo "gray" hidromórfico arenoso da série Ecologia, convenientemente preparado. O delineamento experimental foi de blocos partidos, com cinco repetições e duas parcelas por bloco, correspondendo a duas espécies de forrageiras estudas e cada parcela dividida em 16 subparcelas de 1,5m por 1,5m cada. Oito épocas de corte e dois níveis de nitrogênio, 0kg e 20kg de N/ha, foram distribuídos

ao acaso nessas 16 subparcelas. A primeira época de colheita para medida da atividade da nitrogenase foi feita dois meses após o plantio das mudas. As colheitas subseqüentes foram feitas com um intervalo de 14 dias. As adubações, com Nitrocálcio, da Petrobrás (28% de N), foram feitas duas semanas antes de cada colheita em todas as subparcelas sorteadas para nitrogênio. Assim, enquanto as subparcelas da primeira medida receberam apenas 20kg de N/ha, aquelas da oitava época de colheita receberam 160kg de N/ha, pois foram adubadas com 20kg de N em todos os cortes anteriores. Como adubação básica, todas as subparcelas receberam 100kg de P_2O_5 e 100kg de K_2O por hectare. O plantio foi feito colocando-se quatro mudas por subparcela, com espaçamento de 1m entre as mudas. Nas colheitas, foram tiradas as raízes das plantas de cada subparcela, num total de quatro frascos com raízes por subparcela. As raízes colhidas receberam o mesmo tratamento descrito anteriormente.

Efeito de fertilizantes nitrogenados em blocos de P. notatum — Foi feito um experimento usando-se 12 vasos de Leonard invertidos, contendo blocos intactos de solo e plantas de *P. notatum*. Estes blocos foram tirados, introduzindo-se a garrafa cortada no solo (15cm aproximadamente) e retirando-se assim o bloco de solo e planta, o mais intacto possível. A garrafa foi então colocada dentro de outra, contendo 5cm de água para impedir trocas gasosas. Os tratamentos incluiram duas fontes de nitrogênio, o nitrato e o amônio, e uma testemunha sem nitrogênio, com quatro repetições cada um. Foram injetados 50ml de acetileno e tomada uma amostra de uma hora para determinação da taxa inical de redução de acetileno, segundo a qual os vasos foram reunidos em grupos de quatro, de modo formarem repetições uniformes. Foram aplicados 20ppm de nitrogênio em solução e tirada uma amostra de zero hora de nitrogênio em todos os blocos. Durante as 24 horas que seguiram a aplicação de nitrogênio, foram tiradas oito amostras e, no término das medidas, foram retiradas as rolhas. Os vasos foram mantidos ao ar livre, protegidos do sol pela sombra de uma árvore, para evitar o aquecimento demasiado. Depois de sete dias, novamente foram injetados 50ml de acetileno e medida a redução durante 24 horas.

Resultados e discussão

Na tabela 1 estão apresentados os resultados de um primeiro levantamento da ocorrência de fixação de nitrogênio, ou mais precisamente, da atividade da nitrogenase de microrganismos nas raízes de várias gramíneas forrageiras tropicais colhidas no campo. Observa-se uma variação muito grande entre sítios e plantas, mas mesmos assim são notáveis os valores altos obtidos, uma vez que, até então, os mais altos valores mencionados, de plantas colhidas no campo, foram em torno de 100n-moles de C_2H_4/g, de raízes de *H. rufa* em savanas da Costa do Marfim (1), em medições *in situ*. Outro fator notável na tabela é a atividade tão mais alta em raízes lavadas do que no solo da rizosfera, que na maioria dos casos foi quase nula. Já havia sido demonstrado, em trabalhos anteriores com *P. notatum*, que, ao contrário das idéias clássicas de rizosfera, o sítio da fixação de nitrogênio está concentrado quase que exclusivamente nas raízes, não sendo removido por lavagem em água. Devido à variabilidade e insuficiente número de sítios analisados, é difícil concluir sobre diferenças entre espécies. A espécie que mostrou maior número de amostras com atividade acima de 100 foi *B. mutica* (capim Angola) na qual também a atividade das amostras individuais, dentro de cada sítio, foi a mais constante. Por outro lado, parece que a umidade do solo tem papel importante, sendo que todos os valores altos foram obtidos com mais de 50% da capacidade do campo, e apesar de não terem sido feitas medidas da umidade em todas as amostras, lembramos que o capim Angola é planta típica de má drenagem e portanto a umidade do solo em todas as amostras foi mais alta que mas demais espécies.

É difícil transformar os dados da atividade da nitrogenase em raízes extraídas do solo em kg de n/ha, uma vez que não se conhece ainda nada sobre o ciclo diurno e muito menos sobre o ciclo anual destas espécies. Em outras espécies, como *P. notatum* (J. Dobereiner, IV GIAM, 1973) e gramíneas das savanas da Costa do Marfim (1), têm sido observados dois picos de atividade de nitrogenase, um diurno e outro noturno. Todavia, admitindo-se que, com raízes extraídas, é feita uma avaliação da atividade média ou residual mantida pelas reservas nas raízes, e tomando-se a relação teórica de três moles de acetileno para um de nitrogênio e ainda, um peso médio de 5.000kg de raízes por hectare (13), obtém-se um fator de conversão de n-moles/g de raízes por hora em g de N/ha por dia igual a 1.1. Com estes cálculos, valores de até 817g de N/ha fixados por dia, mesmo durante a época de crescimento mais ativo do ano, não são negligenciáveis e indicam a grande importância que estes estudos possam vir a demonstrar nas regiões de clima tropical. Cálculos equivalentes, feitos com os valores obtidos com o solo, tomando-se como base $2 \cdot 10^6$ kg de solo por hectare, indicam como valor máximo 156g N/ha por dia, num pasto antigo de *D. decumbens*, valor este, mesmo assim, ainda abaixo do correspondente fixado nas raízes.

Uma vez demonstrada a possibilidade de fixação de nitrogênio na rizosfera ou talvez melhor, em associações gramíneas-bactérias, torna-se importante definir as condições que levam a fixações elevadas e estudar práticas agronômicas de incrementá-las. O papel decisivo do genótipo da planta na manutenção de uma flora abundante de *A. paspali* já foi demonstrado (5). Na tabela 2 são apresentados os resultados de um outro experimento, confirmando

Tabela 1.

Atividade da nitrogenase na raiz e no solo de diversas gramíneas forrageiras e umidade do solo em percentagem da capacidade de campo.

Gramíneas	Local	Atividade na raiz (n-moles C_2H_4/g · h[a]	Atividade no solo (n-moles C_2H_4/g · h[b]	Umidade do solo
Brachiaria mutica	Agrostologia	156,50	—	—
	Agrostologia	166,93	—	—
	lago	370,36	0	—
	Experimentação	730,15	0	—
	Santa Mônica	690,09	0	59,4
	aterro	182,61	0	—
B. ruziziensis	Agrostologia	10,90	0	23,6
B. decumbens	Agrostologia	18,82	0	28,7
B. sp.	Agrostologia	26,45	0	25,5
B. sp. cv. *tanergrass*	Agrostologia	148,90	—	—
	Agrostologia	74,60	0	22,3
	Agrostologia	4,98	—	—
Cynodon dactylon	Agrostologia	16,87	0	15,1
	Santa Mônica	268,59	0,068	55,8
Digitaria decumbens	Agrostologia	99,93	0	10,3
	Agrostologia	341,50	0	25,8
	Santa Mônica	214,09	0,349	59,0
	galpão B	20,94	0	—
	Experimentação	65,28	0	—
Hyparrhenia rufa	Horto	21,07	0	—
	Horto	29,07	0,147	—
	Experimentação	23,86	0	—
	Experimentação	18,81	0,133	—
	aterro	16,82	0	—
	aterro	21,76	0	—
Melinis minutiflora	Agrostologia	12,52	0,033	—
	Agrostologia	41,06	0,187	—
	Agrostologia	19,73	—	—
Panicum maximum	Agrostologia	67,50	—	—
	Agrostologia	120,27	—	—
	Agrostologia	23,91	0	—
	bananal	299,35	0	—
	bananal	43,72	0	19,9
	Experimentação	60,48	0,148	—
Pennisetum purpureum	Experimentação	13,51	0,085	—
	aterro	21,79	0	—
	Agrostologia	166,37	—	—

a — Médias de seis repetições
b — Médias de três repetições

diferenças significativas entre cultivares e ecotipos da mesma espécie, também para a atividade da nitrogenase e para a produção de proteína total. Diferenças da atividade da nitrogenase entre cultivares de *P. purpureum* também já foram demonstradas (H. De-Polli, dados não publicados). Todos estes resultados mostram as possibilidades de se selecionar tipos de gramíneas forrageiras mais propícias à fixação de nitrogênio, seleção esta praticamente oposta à feita usualmente que visa maior resposta ao nitrogênio mineral. A maior atividade da nitrogenase nas raízes dos dois tipos mais primitivos de *P. notatum*, os "batatais", dão prova disto.

Outro fator agronômico importante a ser observado é o da adubação. Não temos ainda dados sobre efeitos da adubação fosfatada, mas pelos resultados na Figura 1 parece ser favorável, pois, principalmente com *Pennisetum*, valores mais altos que os observados no levantamento, foram obtidos neste experimento. Surpreende o fato da adubação nitrogenada não ter afetado a fixação de nitrogênio, mesmo quando foram aplicados 20kg de N/ha a cada duas semanas, que mais para o fim da época representavam adubações pesadas. Isto mostra que, na prática, será possível complementar a fixação de nitrogênio pelas bactérias por adubações baixas. Ainda na Fig. 1 pode-se observar as variações da atividade da nitrogenase durante o período de fevereiro a junho. Sendo de novembro a março a época chuvosa nesta região, quando então se observa crescimento mais rápido das plantas, não é de surpreender que a atividade da nitrogenase também seja mais

Tabela 2.

Diferenças entre cultivares e ecotipos de *Paspalum notatum* na capacidade de associação com *Azotobacter paspali*[a]

Cultivar ou ecotipo	Forma da folha	Número de microcolônias de *A. paspali*/g de solo do rizoplan		Atividade da nitrogenase (n-moles C_2H_4/g) raízes secas • hora	Assimilação de N na parte aérea, g/m²	Produção de forragem seca g/m²
		1 mes	4 meses	4 meses[b]	4 meses[b]	4 meses[b]
T_7 Batatais km 47	larga	2 325	9 950	39,8	17,11	829
61 Batatais Matão	larga	3 272	13 050	21,0	11,41	592
48 Pensacola Flórida	fina	37	2 900	10,3	12,78	620
53 Híbrido Tiphen	média	1 170	1 350	11,4	21,60	1 010
50 Pensacola Argentina	fina	50	320	12,2[c]	6,57	303
55 Híbrido Pensacola	fina	12	37	6,7	7,37	402

a) Dados obtidos num experimento de campo com seis tratamentos e quatro repetições completamente casualisadas. O experimento foi plantado em novembro de 1972, tendo sido feito um corte quatro meses após e amostragens nas datas indicadas.

b) A diferença entre cultivares na atividade da nitrogenase, na assimilação de nitrogênio e na produção de forragem foi significativa (P = 0,05).

c) O cultivar Pensacola Argentina 50 inicialmente se mostrou amarelado igual ao Híbrido Pensacola 55, começando a recuperar-se após três meses e ficando sem sintomas de deficiência de nitrogênio após quatro meses (N% = 2,11% do número 50 contra 1,86% do número 55).

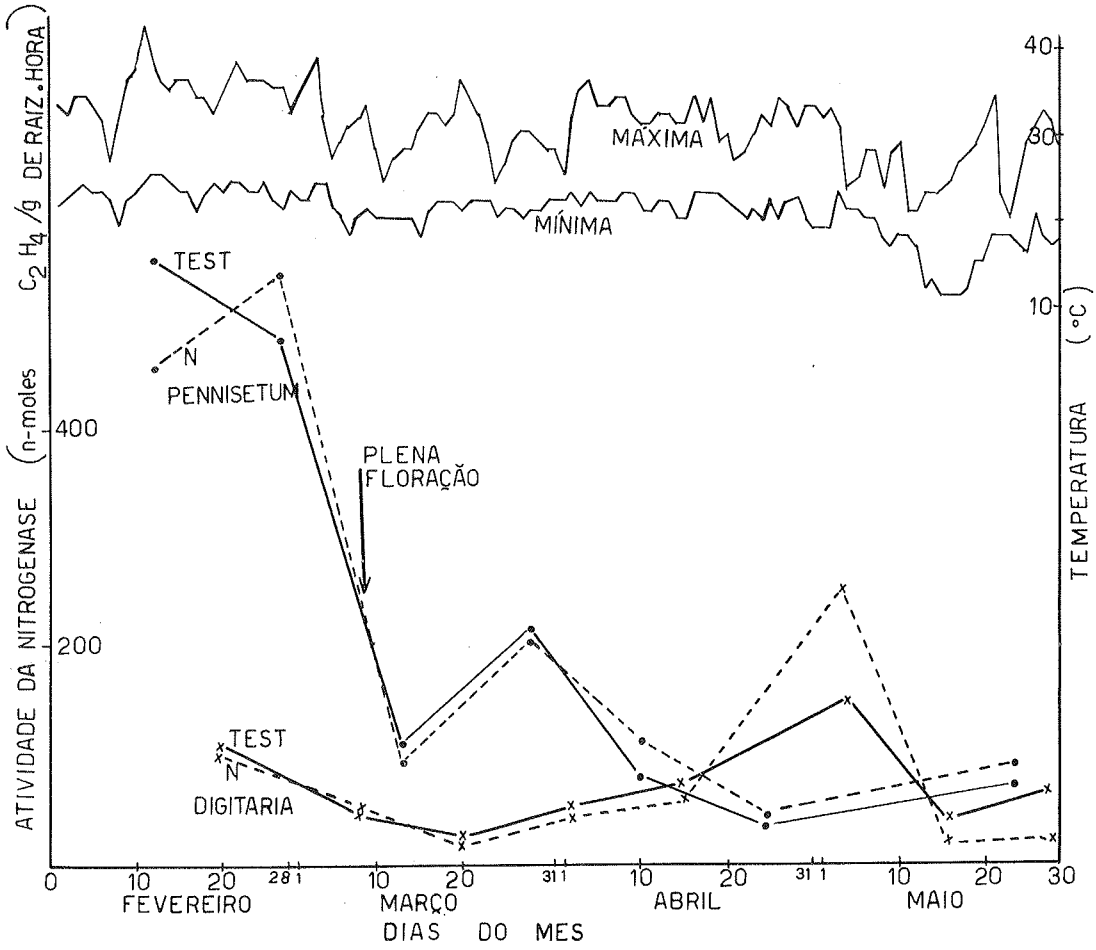


Fig. 1 — Variações da atividade da nitrogenase nas raízes de *P. purpureum* e *D. decumbens* cultivadas no campo, durante o período de quatro meses, com e sem adubação nitrogenada. Os pontos são médias de 20 repetições, sendo quatro amostras de cada uma das cinco parcelas. A atividade da nitrogenase foi medida após pré-incubação durante uma noite em pO_2 de 0,4atm e 3-5 horas após a injeção de acetileno. Para adubação nitrogenada, vide Material e Método.

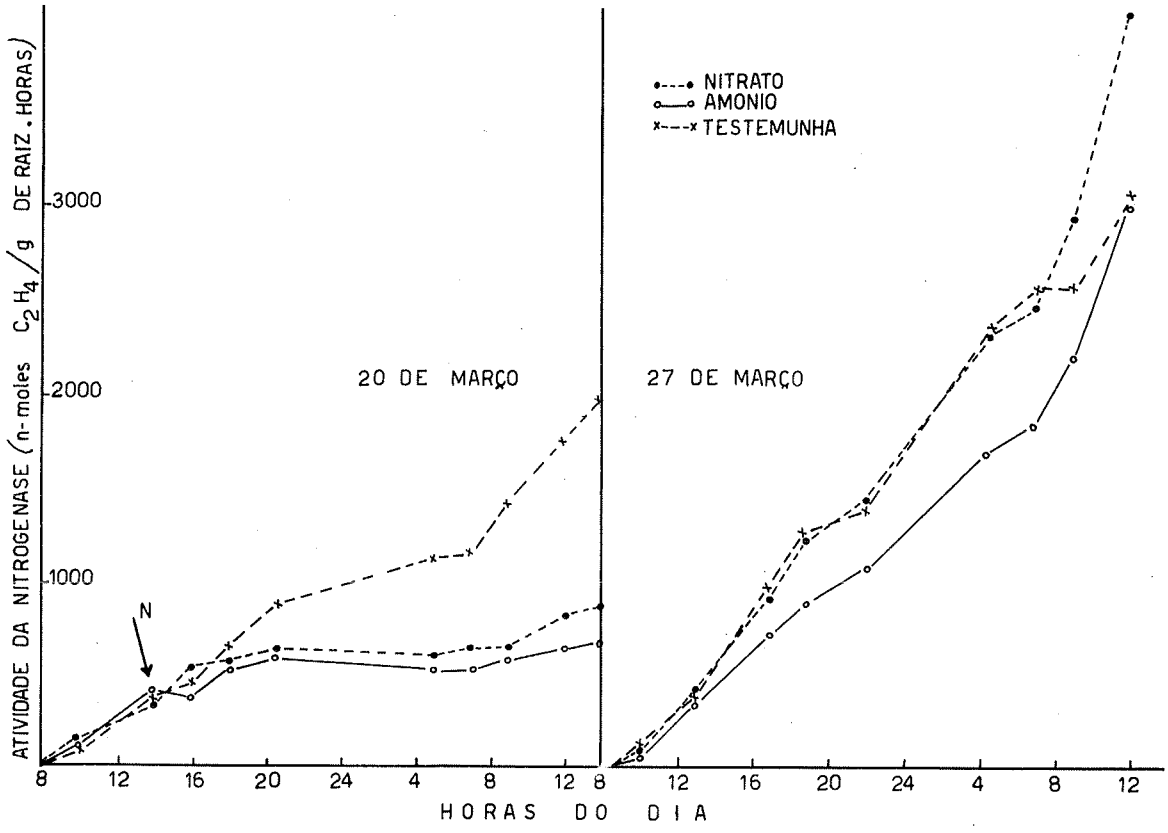


Fig. 2 — Efeito do nitrato e amônio sobre a atividade da nitrogenase em sistemas intactos de *P. notatum* em vasos de Leonard. Os vasos foram mantidos sob uma atmosfera de 10% de acetileno durante 24 horas, tratamento este repetido uma semana depois. Após a aplicação de 20ppm de N_2 em solução na hora assinalada, foram tomadas amostras períodicas. Os pontos são médias de quatro vasos de Leonard.

elevada nesta época. Na época da floração, em *Pennisetum* houve uma queda brusca desta atividade, havendo alguma recuperação quando, em abril e princípio de maio, as temperaturas noturnas ainda estavam elevadas. Após a entrada das noites mais frias, na segunda quinzena de maio, a atividade das duas espécies ficou muito baixa. Isto indica que, durante a época de crescimento vegetativo e rápido das gramíneas, há considerável fixação de nitrogênio, enquanto que, durante a época da floração e principalmente durante a estação seca e fria, esta fixação é mínima. Isto vem de encontro com observações de Rocha & Aronovich (12), que demonstraram ser difícil haver respostas economicamente justificáveis para a aplicação de adubos nitrogenados no verão, enquanto tal adubação, na entrada da época seca, em muito aumenta a produção de leite, pagando em menos de dois meses a adubação.

Na Fig. 2 podem ser vistos mais detalhes sobre os efeitos dos íons nitrato e amônio separadamente, na associação de *P. notatum* com *A. paspali*. O amônio inibiu a atividade da nitrogenase dentro de duas horas, enquanto que o nitrato somente teve efeito após quatro horas. Ambos os tratamentos reduziram a atividade durante as primeiras 24 horas a menos 30%, mas após uma semana o efeito do nitrato tinha desaparecido e o do amônio reduziu a atividade a 80%.

5. Bibliografia

1. BALANDREAU, J. & VILLEMIN, G. — Fixation Biologique de l'azote moleculaire en savane de Lamts (Basse Cote D'Ivoire) resultats preliminaires. *Rev. Ecol. Biol. Sol* (no prelo), 1973.

2. BALANDREAU, J. & DOMMERGUES, Y. — Assaying nitrogenase (C_2H_2) activity in the field. Proc. IBP-Simpósio Uppsala 1972.

3. CAMPÊLO, A.B. & DOBEREINER J. — Ocorrência de *Derxia* sp. em solos de alguns estados brasileiros. *Pesq. Agropec. Bras.*, 5:327-332, 1970.

4. DILLWORTH, M.H. — Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. *Bioch. Biophys. Acta.*, 127:285-294, 1966.

5. DOBEREINER, J. — Further research on *Azotobacter paspali* and its variety specific occurence in the rhizosphere of *Paspalum notatum* Flugge. *Centralbl. Bact. Parasitenk,* II 124:224-230, 1970.

6. DOBEREINER, J. & CAMPÊLO, A.B. — Non-symbiotic nitrogen fixinf bacteria in tropical soils. *Pl. Soil,* volume especial, 457-470, 1971.

7. DOBEREINER, J.; DAY, J.M. & DART, P.J. — Nitrogenase actyvity in the rhizosphere of sugar cane and some other tropical grasses. *Pl. Soil,* 37:191-196, 1972.

8. FLORENZANO, G.; BALLONI, W. & MATERASSI, R. — Influences of fertilizers on the rhizosphere effect. II Colóqui o Latino Americano de Biologia do Solo (Santa Maria-Brasil), 1968.

9. HATCH, M.D. & SLACK, C.R. — Photosynthetic CO_2-fixation pathways. *Ann. Rev. Plant. Phys.,* 21:141-162, 1970.

10. HUSER, R. — Zur Mikrobiologischen Luftstickstoff--Binding in Buchenstreu und Buchenmull. *Pl. Soil,* 23:236-246, 1965.

11. RINAUDO, G.; BALANDREAU, J. & DOMMERGUES, Y. — Algal and bacterial non-symbiotic fixation in paddy soils. *Pl. Soil* volume especial 471-479, 1971.

12. ROCHA, G.L da & ARONOVICH, S. — Informe regional sobre problemas, atividades e programas recentes de desenvolvimento no campo dos pastos e plantas forrageiras. *Zootecnica (São Paulo)*, 10:15-62, 1972.

13. THROUGHTON, A. — The underground organs of herbage grasses. *Bull.* 44 *Commonwealth Bur. Past. Field Crops.* 1-163, 1957.

Métodos de contagem de colônias em superfície e em profundidade como técnicas de referência para avaliação quantitativa de bacteriúria*

Alba Lúcia Solino Noleto,
Alberto Strozemberg &
Italo Suassuna

Resumo

Análise estatística de algumas variáveis que influem na contagem de bactérias, a fim de definir o grau de exatidão e reprodutibilidade de alguns métodos usados correntemente. Usando-se as mesmas diluições de culturas de bactérias, não houve diferença entre as contagens em superfície e em profunidade em placas de Petri. Alças calibradas para descarregar 0,01 ml de inóculo foram menos precisas que pipetas.

Summary

Surface and pour-plate colony counting as reference methods for quantitative evaluation

A statistical analysis of some variables affecting bacterial plate counts to define the degree of accuracy and reproductiveness of usual methods currently used. By using the same dilutions from pure bacterial cultures differences between pour-plate and surface colony counts, in Petri dishes were not found. Calibrated loops were less precise than pipetes for delivering the 0,01 ml inoculum.

Introdução

As técnicas para determinação do número de bactérias viáveis não apresentam o grau de precisão desejável, sendo encontradas variações mesmo sob as melhores condições de experiências.

Snyder(12) estudou as principais fontes de erro na contagem bacteriológica em placas, assinalando as seguintes: a) erro na preparação da suspensão diluída; b) variação da distribuição de organismos, nas alíquotas utilizadas; c) fatores que influenciam o desenvolvimento das células inoculadas, em colônias visíveis.

A soma das variações, devidas a estes três fatores, pôde ser estimada pela variabilidade que se observa em placas reduplicadas. O autor recomenda o uso, de uma maneira mais geral, do método de semeadura em superfície, por ser mais fácil de ser utilizado, com maior número de placas.

Crone(3) estudou o método de semeadura em superfície de placas, observando o efeito de vários meios de cultura e os cuidados na seleção do líquido diluente. Placas de agar-sangue, de idade e lotes diferentes, apresentam pouca influência na contagem. A irregularidade no volume do líquido, removido pela alça que servia para semear, não parece acarretar variabilidade na contagem. Com suspensões que tenham sido preparadas em menos de cinco minutos, a contagem de bactérias entéricas e causadoras de intoxicações alimentares foi um pouco maior em placa de agar-sangue, do que em meio especial, usado para o isolamento de patogênicos intestinais.

A contagem bacteriana total foi estudada por Ishida & Kurokawa (6). Realizaram considerações estatísticas sobre estas contagens, demonstrando que a distribuição binomial negativa tem aplicação muito maior para a distribuição de pequenos números de células bacterianas, por quadrado de campo microscópico, do que a distribuição de Poisson. No método modificado proposto ("ratio method"), uma suspensão celular padronizada e corada, da mesma espécie de células a serem coradas, foi usada como referência.

Hedberg(4) realizou o estudo quantitativo de população bacteriana mista, diferenciando as espécies bacterianas presentes e, ao mesmo tempo, revelando

*Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Centro de Ciências da Saúde, Bloco I, Ilha do Fundão, 20.000 Rio de Janeiro RJ.

a sensibilidade antimicrobiana da flora mista. Utilizando o método de plaqueamento em superfície, a sensibilidade da flora mista foi mais clara e rapidamente demonstrada, do que por meio de sub-cultura, usando discos de antibióticos, revelando assim a boa dispersão dos inóculos.

Um estudo comparativo da contagem bacteriana em superfície e profundidade ("pour-plate") foi realizado por Soestbergen & Lee(13). O método de cultivo em profunidade foi escolhido para contagem bacteriana a partir de líquidos, porém apresenta desvantagem de consumir mais tempo, reduzir o crescimento de aeróbios obrigatórios na profunidade do agar e apresentar o perigo de matar organismos mais sensíveis ao calor. O valor numérico significativo foi consideravelmente maior (teste t) para a semeadura em superfície do que para a semeadura em profundidade, embora as amostras fossem tomadas da mesma suspensão bacteriana.

A freqüência de colônias nas placas (contagem de colônias) é teoricamente determinada pela distribuição de Poisson. A variância da amostra, contada por semeadura em superfície, foi numericamente maior do que a variância da amostra semeada em profundidade.

A contagem bacteriana na urina foi originalmente desenvolvida com utilização da técnica de diluição por semeadura em profunidade, por Marple e outros autores.(7, 8, 10)

Devido a técnica em "pour-plate" ser muito elaborada, outros autores têm sugerido técnicas mais simples, que apresentam resultados semelhantes.

Hoeprich propôs a utilização de alças padronizadas, constituídas de 3,5% de ródio e 96,5% de platina, uma com 4mm de diâmetro e a outra com 1,45mm de diâmetro, para inoculação em superfície, em placa de agar.

Considerando as diversas variáveis que influem na determinação do número de bactérias viáveis, tivemos por objetivo verificar as variações na contagem de colônias, em função do uso de semeaduras em superfície ou em profunidade, com o emprego de pipetas ou alças calibradas.

Material e Métodos

Amostras bacterianas — Foram utilizadas amostras de: *Escherichia coli* (amostra SE-33, isolada de material clínico, Laboratório de Enterobactérias, Instituto de Microbiologia, UFRJ) e, em ensaios iniciais, amostras de *Klebsiella pneumoniae, Enterobacter cloacae, Staphylococcus aureus, Streptococcus faecalis.*

Meios de cultura — Foi utilizado o meio designado B_1, descrito por Bier[1] para a microbiota mais exigente da cavidade oral:

Extrato de levedura (BBL)	2,0g
"Proteose peptone" (Difco)	10,0g
"Phytone" (BBL)	3,0g
Glicose (Fisher)	5,0g
Fosfato dipotássico (Fisher)	2,5g
"Beef Heart Infusion" (Difco)	1000,0ml

Métodos de inoculação — (a) inoculação com alça calibrada para 0,01ml (Arthur Thomas, 1968:7433-A. Inoculating Loops, Platinum-Rhodium Fused Loop, 4mm inside diameter of B & S gauge Nº 19 platinum-rhodium wire with shank 15mm); e (b) distribuição de 0,1ml do inóculo com pipeta sorológica de 1ml, dividda em 0,1ml.

Os dois métodos de inoculação (alça calibrada e pipeta) foram realizados em: (a) *superfície* — as placas foram preparadas e deixadas em repouso, até perderem toda a água de condensação. O meio fundido, mantido a aproximadamente 50°C, foi distribuído nas placas, incubadas a 37°C até o dia seguinte. O inóculo por toda a superfície da placa; e (b) *em profundidade* ("pour-plate") — o inóculo era colocado em tubos de 16 × 160mm contendo o meio de cultura, fundido e resfriado a 48°C. Após homogeneização, o conteúdo dos tubos era despejado em placas, deixando solidificar, e incubado a 37°C.

Em todas as combinações de semeadura, com alça ou pipeta, em superfície ou em profunidade, foram feitas repetições em paralelo das condições de inóculo, para avaliação estatística dos resultados.

Inicialmente, em diversos ensaios, foram empregadas as espécies bacterianas anteriormente citadas (*Escherichia coli, K. pneumoniae, E. cloacae, S. aureus,* e *S. faecalis*) verificando-se a semelhança de resultados. Em face a essas comparações só a amostra de *Escherichia coli* passou a ser empregada, visando a apuração das variações de contagens de colônias.

De uma cultura de 24 horas de *E. coli*, em caldo, foram realizadas diluições em solução salina a 0,85% e, a partir das diluições 10^{-6} e 10^{-7}, foram realizadas 10 semeaduras em profundidade e em superfície, como descrito acima.

De 10 séries de diluições, paralelamente executadas a partir de um único cultivo de 24 horas de *E. coli*, em caldo, foram realizadas as semeaduras a partir das diluições 10^{-6} e 10^{-7} em superfície e em profundidade como descrito acima.

Resultados

Coeficiente de variações de métodos de contagem em placa

Os processos de inoculação e contagem de colônias em placas, utilizando-se os métodos de semeadura com alça calibrada e pipeta, em superfície e em

profundidade, foram estudados com o objetivo de se determinar, entre as quatro combinações, qual apresentaria a menor dispersão em torno da média, indicando maior segurança de medida.

As quatro combinações possíveis correspondem a: (a) semeadura em superfície: A – com alça e B – com pipeta; e (b) em profunidade: C – com alça e D – com pipeta.

Cálculo do coeficiente de variação

(a) Contagem de colônias de *Escherichia coli*, a partir das mesmas diluições, de acordo com métodos de inoculação (Tabela 1).
(b) Contagem de colônias de *Escherichia coli*, a partir de 10 séries de diluições paralelamente executadas a partir de um único cultivo (Tabela 3).

Tomando para análise os coeficientes de variação expressos na Tabela 2, designados A_1, B_1, C_1, e D_1, e, na Tabela 4, designados A_2, B_2, C_2 e D_2, verifica-se que as séries de amostras A_2, B_2, C_2 e D_2 (série de diluições diferentes) apresentam, nos quatro casos, coeficientes de variação maiores, em comparação com os valores correspondentes A_1, B_1, C_1 e D_1 (mesmas diluições).

Nota-se que, nas medições por alça, o coeficiente de variação é sempre maior que nas por pipeta. Verifica-se, ainda, que as contagens em superfície e em profunidade apresentam coeficientes de variação da mesma ordem de grandeza.

Para determinar se havia diferença significativa das variâncias entre os resultados se superfície e em profundidade, foi aplicado o teste de Snedcor(11).

Testes de igualdade de variâncias

Deseja-se testar a hipótese nula (Ho) contra uma das alternativas (H_1).

Ho: $\sigma_1^2 = \sigma_2^2$

H_1: $\sigma_1^2 \lesseqgtr \sigma_2^2$

Tabela 1

Contagem de colônias de *Escherichia coli* a partir das mesmas diluições de acordo com o método de inoculação.

Inoculação	Diluição	PROCESSOS DE SEMEADURA			
		SUPERFÍCIE		PROFUNDIDADE	
		A_1 Alça (0,01ml)	B_1 Pipeta (0,1ml)	C_1 Alça (0,01ml)	D_1 Pipeta (0,1ml)
1ª	10^{-6}	12×10^6	50×10^6	8×10^6	75×10^6
	10^{-7}	1×10^7	7×10^7	1×10^7	7×10^7
2ª	10^{-6}	4×10^6	45×10^6	$- \times 10^6$	57×10^6
	10^{-7}	3×10^7	4×10^7	2×10^7	12×10^7
3ª	10^{-6}	9×10^6	56×10^6	8×10^6	57×10^6
	10^{-7}	2×10^7	9×10^7	1×10^7	8×10^7
4ª	10^{-6}	4×10^6	58×10^6	7×10^6	60×10^6
	10^{-7}	2×10^7	7×10^7	9×10^7	7×10^7
5ª	10^{-6}	8×10^6	67×10^6	10×10^6	52×10^6
	10^{-7}	$- \times 10^7$	4×10^7	1×10^7	10×10^7
6ª	10^{-6}	4×10^6	74×10^6	9×10^6	45×10^6
	10^{-7}	$- \times 10^7$	10×10^7	1×10^7	7×10^7
7ª	10^{-6}	4×10^6	60×10^6	7×10^6	58×10^6
	10^{-7}	2×10^7	7×10^7	6×10^7	$- \times 10^7$
8ª	10^{-6}	6×10^6	56×10^6	5×10^6	42×10^6
	10^{-7}	1×10^7	51×10^7	1×10^7	7×10^7
9ª	10^{-6}	1×10^6	50×10^6	10×10^6	43×10^6
	10^{-7}	1×10^7	9×10^7	5×10^7	8×10^7
10ª	10^{-6}	$- \times 10^6$	54×10^6	9×10^6	63×10^6
	10^{-7}	$- \times 10^7$	6×10^7	1×10^7	7×10^7

Tabela 2

Cálculo do coeficiente de variação dos valores apresentados na tabela 1.

	Processos de Semeadura*			
	A_1	B_1	C_1	D_1
Média da leitura das amostras ($\overline{X}$)	$5{,}3 \times 10^6$	57×10^6	$7{,}4 \times 10^6$	$55{,}2 \times 10^6$
Variância (S^2)	$12{,}2 \times 10^{12}$	$72{,}4 \times 10^{12}$	$7{,}38 \times 10^{12}$	$108{,}07 \times 10^{12}$
Desvio padrão (S)	$3{,}4 \times 10^6$	$8{,}5 \times 10^6$	$2{,}7 \times 10^6$	$10{,}19 \times 10^6$
Coeficiente de variação (cv)	0,64	0,15	0,37	0,18

*Segundo a Tabela 1.

Tabela 3

Contagem de colônias de *Escherichia coli* a partir de dez séries de diluições paralelamente executadas a partir de um único cultivo.

Inoculação	Diluição	PROCESSOS DE SEMEADURA			
		SUPERFÍCIE		PROFUNDIDADE	
		A_2 Alça (0,01ml)	B_2 Pipeta (0,1ml)	C_2 Alça (0,01ml)	D_2 Pipeta (0,1ml)
1ª	10^{-6}	40×10^6	58×10^6	$>300 \times 10^5$	193×10^6
	10^{-7}	8×10^7	96×10^7	120×10^6	97×10^7
2ª	10^{-6}	21×10^6	$>300 \times 10^6$	$>300 \times 10^6$	$>300 \times 10^6$
	10^{-7}	6×10^7	83×10^7	75×10^7	90×10^7
3ª	10^{-6}	53×10^6	349×10^6	$>300 \times 10^5$	$>300 \times 10^6$
	10^{-7}	9×10^7	75×10^7	98×10^6	59×10^7
4ª	10^{-6}	11×10^6	$>300 \times 10^6$	$>300 \times 10^5$	$>300 \times 10^6$
	10^{-7}	6×10^7	85×10^7	134×10^6	75×10^7
5ª	10^{-6}	33×10^6	$>300 \times 10^6$	$>300 \times 10^5$	$>300 \times 10^6$
	10^{-7}	1×10^7	80×10^7	60×10^6	66×10^7
6ª	10^{-6}	48×10^6	$>300 \times 10^6$	$>300 \times 10^5$	$>300 \times 10^6$
	10^{-7}	5×10^7	137×10^7	185×10^6	109×10^7
7ª	10^{-6}	202×10^6	$>300 \times 10^6$	$>300 \times 10^5$	$>300 \times 10^6$
	10^{-7}	2×10^7	143×10^7	118×10^6	131×10^7
8ª	10^{-6}	50×10^6	$>300 \times 10^6$	$>300 \times 10^5$	$>300 \times 10^6$
	10^{-7}	7×10^7	145×10^7	118×10^6	148×10^7
9ª	10^{-6}	250×10^6	$>300 \times 10^6$	$>300 \times 10^5$	$>300 \times 10^6$
	10^{-7}	2×10^7	83×10^7	213×10^6	81×10^7
10ª	10^{-6}	90×10^6	$>300 \times 10^6$	$>300 \times 10^5$	$>300 \times 10^6$
	10^{-7}	5×10^7	84×10^7	36×10^6	80×10^7

Tabela 4

Cálculo do coeficiente de variação dos valores representados na tabela 3.

	Processos de Semeadura			
	A_2	B_2	C_2	D_2
Média da leitura das amostras ($\overline{X}$)	$79{,}8 \times 10^6$	$101{,}1 \times 10^7$	$115{,}7 \times 10^6$	$93{,}6 \times 10^7$
Variância (S^2)	$6509{,}7 \times 10^{12}$	$814{,}8 \times 10^{14}$	$2895{,}30 \times 10^{12}$	$807{,}60 \times 10^{14}$
Desvio padrão (S)	$80{,}6 \times 10^6$	$28{,}5 \times 10^7$	$53{,}8 \times 10^6$	$28{,}4 \times 10^7$
Coeficiente de Variação (cv)	1,01	0,28	0,46	0,30

Tabela 5a

Contagem de colônias de *Escherichia coli* a partir das mesmas diluições.

Inoculação	Diluição	SUPERFÍCIE		PROFUNDIDADE	
		A_3 Alça (0,01ml)	B_3 Pipeta (0,1ml)	C_3 Alça (0,01ml)	D_3 Pipeta (0,1ml)
1ª	10^{-6}	78×10^6	$>300 \times 10^6$	39×10^6	$>300 \times 10^6$
	10^{-7}	5×10^7	48×10^7	5×10^7	70×10^7
2ª	10^{-6}	48×10^6	$>300 \times 10^6$	30×10^6	$>300 \times 10^6$
	10^{-7}	2×10^7	17×10^7	2×10^7	87×10^7
3ª	10^{-6}	23×10^6	$>300 \times 10^6$	38×10^6	$>300 \times 10^6$
	10^{-7}	2×10^7	53×10^7	5×10^7	44×10^7
4ª	10^{-6}	67×10^6	$>300 \times 10^6$	22×10^6	$>300 \times 10^6$
	10^{-7}	2×10^7	67×10^7	4×10^7	16×10^7
5ª	10^{-6}	43×10^6	82×10^6	23×10^6	$>300 \times 10^6$
	10^{7}	9×10^7	55×10^7	4×10^7	51×10^7
6ª	10^{-6}	62×10^6	$>300 \times 10^6$	34×10^6	$>300 \times 10^6$
	10^{-7}	4×10^7	67×10^7	2×10^7	44×10^7
7ª	10^{-6}	35×10^6	$>300 \times 10^6$	34×10^6	$>300 \times 10^6$
	10^{-7}	4×10^7	33×10^7	10×10^7	40×10^7
8ª	10^{-6}	54×10^6	$>300 \times 10^6$	60×10^6	$>300 \times 10^6$
	10^{-7}	6×10^7	47×10^7	40×10^7	29×10^7
9ª	10^{-6}	24×10^6	$>300 \times 10^6$	52×10^6	$>300 \times 10^6$
	10^{-7}	6×10^7	35×10^7	7×10^7	66×10^7
10ª	10^{-6}	26×10^6	$>300 \times 10^6$	25×10^6	$>300 \times 10^6$
	10^{-7}	33×10^7	60×10^7	6×10^7	50×10^7

Tabela 5b

Contagem de colônias de *Escherichia coli* a partir das mesmas diluições.

Inoculação	Diluição	SUPERFÍCIE		PROFUNDIDADE	
		A_4 Alça (0,01 ml)	B_4 Pipeta (0,1ml)	C_4 Alça (0,01ml)	D_4 Pipeta (0,1ml)
1ª	10^{-6} 10^{-7}	150×10^6 12×10^7	$>300 \times 10^6$ 139×10^7	106×10^6 7×10^7	$>300 \times 10^6$ 127×10^7
2ª	10^{-6} 10^{-7}	67×10^6 3×10^7	$>300 \times 10^6$ 96×10^7	56×10^6 3×10^7	$>300 \times 10^6$ 82×10^7
3ª	10^{-6} 10^{-7}	71×10^6 18×10^7	$>300 \times 10^6$ 78×10^7	99×10^6 16×10^7	$>300 \times 10^6$ 113×10^7
4ª	10^{-6} 10^{-7}	81×10^6 4×10^7	$>300 \times 10^6$ 122×10^7	125×10^6 113×10^7	$>300 \times 10^6$ 94×10^7
5ª	10^{-6} 10^{-7}	34×10^6 8×10^7	$>300 \times 10^6$ 103×10^7	70×10^6 6×10^7	$>300 \times 10^6$ 118×10^7
6ª	10^{-6} 10^{-7}	121×10^6 18×10^7	$>300 \times 10^6$ 100×10^7	85×10^6 7×10^7	$>300 \times 10^6$ 115×10^7
7ª	10^{-6} 10^{-7}	95×10^6 1×10^7	$>300 \times 10^6$ 109×10^7	38×10^6 7×10^7	$>300 \times 10^6$ 106×10^7
8ª	10^{-6} 10^{-7}	111×10^6 3×10^7	$>300 \times 10^6$ 101×10^7	58×10^6 11×10^7	$>300 \times 10^6$ 96×10^7
9ª	10^{-6} 10^{-7}	110×10^6 2×10^7	$>300 \times 10^6$ 91×10^7	36×10^6 6×10^7	$>300 \times 10^6$ 110×10^7
10ª	10^{-6} 10^{-7}	35×10^6 13×10^7	$>300 \times 10^6$ 77×10^7	50×10^6 11×10^7	$>300 \times 10^6$ 75×10^7
11ª	10^{-6} 10^{-7}	36×10^6 9×10^7	$>300 \times 10^6$ 92×10^7	83×10^6 8×10^7	$>300 \times 10^6$ 82×10^7

Tomando-se um determinado nível de significância, retiramos duas amostras de tamanho *n* de duas populações associadas a dois universos normais com variâncias desconhecidas σ_1^2 e σ_2^2, que poderão ser estimadas através de:

$$S^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^{n} (x_i - x)^2$$

A variável aleatória de Snedcor $F = \frac{S_1^2}{S^2}$ tem distribuição F com n - 1 graus de liberdade no numerador e denominador, a qual pode ser encontrada utilizando tabelas conhecidas.

Se $\frac{S_1^2}{S_2^2}$ $F\alpha; \gamma; \gamma$, aceitamos a hipótese nula (Ho), num nível de significância α. Se $\frac{S_1^2}{S_2^2} > F\alpha, \gamma, \gamma$, rejeita-se Ho num nível de significância α, definindo-se que $\sigma_1^2 > \sigma_2^2$, na medida que sempre se coloca no numerador o maior valor dentre S_1^2 e S_2^2.

Assim, A_1 e C_1: $F = \frac{12,2}{7,38} = 1,65$

B_1 e D_1: $F = \frac{103}{72,4} = 1,43$

A_2 e C_2: $F = \frac{12,2}{7,38} = 1,65$

B_2 e C_2: $F = \frac{814,8}{807,6} = 1,01$

Nos 4 testes: $\frac{S_1^2}{S_2^2} < F_{0,05,9,9}$

$F_{0,05,9,9} = 3,18$

Aceita-se a hipótese de variâncias, o que significa que não se pode determinar que haja uma diferença

Tabela 6a

Cálculo do coeficiente de variação dos valores apresentados na tabela 5a.

	Processos de Semeadura			
	A_3	B_3	C_3	D_3
Média da leitura das amostras ($\overline{X}$)	$46{,}0 \times 10^6$	$47{,}2 \times 10^7$	$35{,}7 \times 10^6$	$49{,}7 \times 10^7$
Variância (S^2)	$333{,}2 \times 10^{12}$	$200{,}96 \times 10^{14}$	$137{,}41 \times 10^{12}$	$379{,}41 \times 10^{14}$
Desvio padrão (S)	$19{,}2 \times 10^6$	$14{,}9 \times 10^7$	$11{,}72 \times 10^6$	$19{,}4 \times 10^7$
Coeficiente de variação (cv)	0,41	0,31	0,33	0,39

Tabela 6b

Cálculo do coeficiente de variação dos valores apresentados na Tabela 5b.

	Processos de Semeadura			
	A_4	B_4	C_4	D_4
Média da leitura das amostras ($\overline{X}$)	$82{,}8 \times 10^6$	$100{,}7 \times 10^7$	$73{,}3 \times 10^6$	$101{,}6 \times 10^7$
Variância (S^2)	$1355{,}24 \times 10^{12}$	$296{,}74 \times 10^{14}$	$760{,}92 \times 10^{12}$	$256{,}09 \times 10^{14}$
Desvio padrão (S)	$36{,}8 \times 10^6$	$17{,}1 \times 10^7$	$27{,}5 \times 10^6$	$16{,}02 \times 10^7$
Coeficiente de variação (cv)	0,44	0,17	0,37	0,16

significativa em relação às variâncias, nos processos de superfície e profundidade.

As restrições apresentadas para esses cálculos foram as seguintes: (a) pequena amostragem; e (b) considerações de universos normais, que fossem coerentes com o tipo de trabalho realizado.

Ampliou-se o número de experiências (Tabela 5a e 5b), realizadas a partir das mesmas diluições, originárias de um só cultivo, que, como havia sido demonstrado, apresentam coeficiente de variação menor em relação aos valores obtidos para a série de diluições diferentes.

Variável aleatória de Snedcor

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

$$A_3 \text{ e } C_3: \quad F = \frac{333{,}2}{137{,}4} = 2{,}42$$

$$B_3 \text{ e } D_3: \quad F = \frac{375{,}4}{200{,}36} = 1{,}87$$

Nos dois casos: menor que $F_{tabelado} = 3{,}18$. Não há diferença significativa.

$$A_4 \text{ e } C_4: \quad F = \frac{1355{,}24}{760{,}926} = 1{,}78$$

$$B_4 \text{ e } D_4: \quad F = \frac{296{,}74}{256{,}09} = 1{,}16$$

Menor que $F_{tabelado} = 3{,}18$. Não há diferença significativa.

O maior número de experiências confirmou que o método de semeadura com pipeta apresenta um desvio padrão menor do que o método de semeadura com alça, não havendo, porém, diferença significativa entre os métodos de semeadura em superfície ou profundidade (Tabelas 6a e 6b).

Com base nesses resultados, o método de semeadura em superfície, com pipeta, poderá ser escolhido como método de referência. Uma vez que as contagens em superfície e em profundidade apresentaram coeficiente de variação de mesma ordem de grandeza, seria válida qualquer uma das alternativas. O método de semeadura em superfície apareceu de realização mais fácil, desde que exige menor número de manipulações, assim como a avaliação das colônias em superfície apresenta maior facilidade em relação aquelas que se desenvolvem em profundidade.

Discussão

Com a finalidade de selecionar o método de semeadura que oferecesse o mínimo de variabilidade e, conseqüentemente, a melhor reprodutibilidade, empregamos o processo de inoculação e contagem de colônias em placas, utilizando métodos de semeadura com alça calibrada e com pipeta, em superfície e em profundidade do agar.

Os métodos apresentados nas tabelas 1, 3 e 5 foram submetidos à análise estatística. Conforme se pode observar nas tabelas 2, 4, 6a e 6b, o coeficiente de variação nas medições por alça foi sempre maior que por pipeta e as contagens em superfície e em profundidade apresentavam o coeficiente de variação da mesma ordem de grandeza. Por essa análise, o método de semeadura por pipeta foi escolhido, enquanto que a opção de semeadura, em superfície ou profundidade ainda não havia sido definida.

Aplicou-se o teste de igualdade de variâncias, verificando-se que não havia diferença significativa entre os dois métodos. Escolhemos o método de semeadura em superfície devido a sua maior reprodutibilidade e facilidade na contagem das colônias, concordando inteiramente, nesse particular, com as verificações bastante anteriores de Snyder(12).

Clark(2) comparou os resultados das contagens bacterianas em relação aos métodos de semeadura na superfície e em profundidade de agar, utilizando, como material de exame, gelo, água de lavagem e de superfície de frangos de um grande abatedouro. Quatro placas foram preparadas para cada método, a partir de diluições sucessivas de 1/10, sendo que duas das placas foram incubadas a 22-25°C por 48 horas, a fim de se determinar a contagem total, e outras duas foram mantidas a 0°C, por 21 dias, para determinar a contagem de psicrotolerantes. A contagem em superfície foi 69% mais alta do que nas amostras obtidas pelo método de semeadura em profundidade, nas duas temperaturas de manutenção. Para temperaturas iguais ou inferiores a 25°C, o método de semeadura em superfície do meio, em placa, deu resultados maiores do que para semeadura em profundidade do agar em placa, ao contrário dos nossos resultados, em que não houve diferença significativa entre os dois métodos, usando-se temperatura a 37°C, vez que, provavelmente, nos nossos resultados não houve perigo de destruição de bactérias psicrófilas, habitualmente não encontradas no material clínico.

Soestbergen & Lee(13) compararam os resultados obtidos com *Escherichia coli* mantida em caldo nutritivo e semeada em superfície de agar. O inóculo de 0,1ml era descarregado através de uma pipeta capilar 100μl. A variância de amostragem, na contagem a partir de superfície, foi significativamente maior e a média também numericamente maior do que para contagem da amostra semeada em profundidade. A menor média de contagem em profundidade é provavelmente devida à perda da viabilidade de algumas bactérias ao entrarem em contato com o agar aquecido. O número de organismos perdidos foi calculado em 2,7% da média da contagem total, com coeficiente de variação de 66%. Após semeadura em superfície, os microrganismos permaneceram na superfície da pipeta e a perda na contagem total da placa foi de 3,9% da contagem média, com um coeficiente de variação de 90%, o que foi provavelmente a razão da menor precisão de contagem em superfície, quando comparada com a contagem em profundidade no agar. Em nossa experiência essa diferença não foi observada talvez porque, ao usarmos pipetas sorológicas de 1ml, tivesse sido mais fácil descarregar o inóculo de 0,1ml em comparação com pipeta capilar em que parte do inóculo não é semeado.

Referências Bibliográficas

1. BIER, L.C. — Isolamento de *Odontomyces viscosus* e *Rothia dentocariosa* do sulco gengival humano. Tese de Doutoramento, UFSM, Rio Grande do Sul. 1970.
2. CLARK, D.S. — Comparison of pour surface plate methods for determination of bacterial counts. *Canad. J. Microbiol.*, 13:1409-1412, 1967.
3. CRONE, P.B. — The counting of surface colonies of bacteria. *J. Hyg.*, 46:426-430, 1948.
4. HEDBERG, M. — Quantitative study of bacteria in mixed populations. A surface-plating method for enumerating, identifying, and determining antimicrobial susceptibility *Am. J. Clin. Path.*, 41:332-336, 1964.
5. HOEPRICH, P.D. — Culture of the urine. *J. Lab. Clin. Med.*, 56:899-907, 1960.
6. ISHIDA, S. & KUROKAWA, M. — Statistical consideration on sampling errors in total bacterial cell count. *Japan. J. Med. Sc. & Biol.*, 17:73-86, 1964.

7. KAITZ, A.T. & WILLIAMS, E.J. – Bacteriuria and urinary tract infections in hospitalized patients. *New Engl. J. Med.*, 262:425-430, 1960.

8. KASS, E.H. – Chemoterapeutic and antibiotic drugs in the management of infections of the urinary tract. *Am. J. Med.*, 18:764-781, 1955.

9. MARPLE, C.D. – Frequency and character of urinary tract infection in an unselected group of women. *Ann. Int. Med.*, 14:2220-2222, 1941.

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

11. SNEDCOR, G.W. & COCHRAN, W.G. – Statistical methods. 6th. Ed. Iowa State University. 1967.

12. SNYDER, T.L. – The relative errors of bacteriological plate counting methods. *J. Bacteriol.*, 54:641-654, 1947.

13. SOESTBERGEN, A.A. van & LEE, C.H. Pour-plates or streak plates? *Appl. Microbiol.*, 18:1092-1093, 1969.