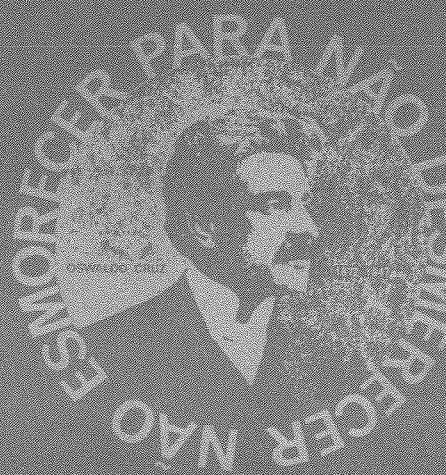


Volume 8 Número 2 Abr.-Junh. 1977

Revista de Microbiologia

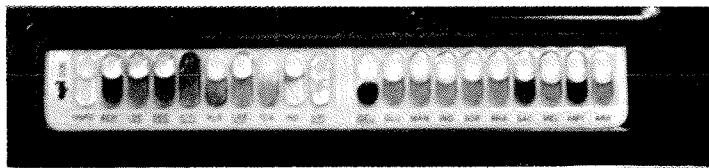
Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo - Brasil





api system

**abriu o caminho da estandardização
na identificação bacteriológica.**



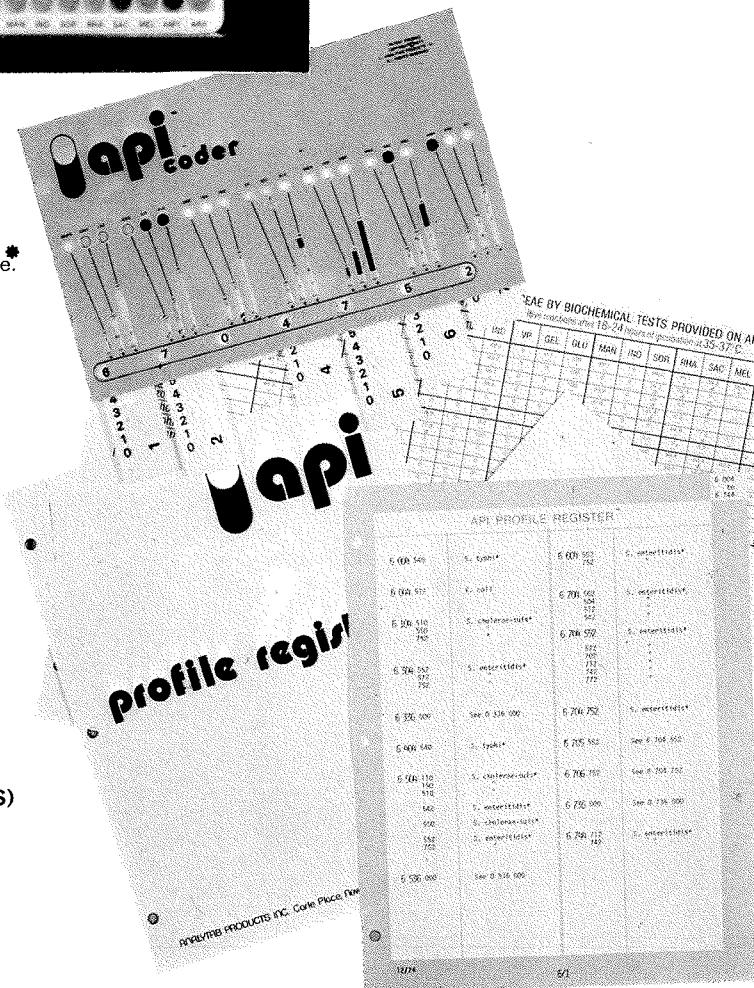
API 20 E e o SISTEMA DE LEITURA CODIFICADA põem à disposição dos laboratórios mais de 25.000 cepas registradas de ENTEROBACTERIACEAE e outros GRAM (-) não-Enterobacteriaceae. Esse é o resultado de vários anos de colaboração entre utilizadores, centros de referência e os serviços de pesquisa API na França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

* Pseudomonas, Aeromonas, Vibrio, 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

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 Flávio Alterthum e Sérgio Olavo P. da Costa

Aquisição por não-membros Assinatura anual para quatro números: Cr\$ 200,00 para o Brasil; US\$ 20.00 (via marítima) ou US\$ 25.00 (via aérea) para o Exterior. Números avulsos: Cr\$ 50,00 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. César Martins de Oliveira, 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. Jobim, Jandira Planet do Amaral, João Xavier Viana, José Noronha Peres, José Oliveira de Almeida, Lúcio P. de Carvalho Lima, Luiz Siqueira Carneiro, Milton Fontes Magarão, Oswaldo G. de Lima, Otávio Barachini, Otto G. Bier, Paulo de Góes, Raymundo A.C. Moniz de Aragão, 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 Golher (Belo Horizonte). PARÁ: Zéa Constante Lins (Belém). PARAÍBA: Maria Marluce Melo Vasconcelos de Castro (João Pessoa). PARANÁ: Alceu Schwab (Curitiba) e Luiz Parelha Ruiz (Londrina). PERNAMBUCO: Diva Montenegro Melo de Azevedo (Recife) e Marcelo Magalhães (Recife). RIO GRANDE DO NORTE: Maria Raquel dos Santos (Natal). RIO GRANDE DO SUL: Sérgio Job Jobim (Porto Alegre) Newton Neves da Silva (Porto Alegre) e Tabajara Gaúcho da Costa (Santa Maria). RIO DE JANEIRO: Cláudio Armando Jürgensen (Nilópolis). SANTA CATARINA: Aquiles A. Cordova Santos (Florianópolis). SÃO PAULO: Deise Pasetto Falcao (Araraquara), Flávio Althertum (São Paulo), Augusto Cesar Montelli (Botucatu) Izabel Yoko Ito (Ribeirão Preto) 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" (2^a edição, AIBS, 1964). Os símbolos genéticos devem seguir, essencialmente, as recomendações de Demerec & col. (*Genetics*, 54: 61, 1966). Abreviaturas 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 (μμ). Comprimentos devem ser expressos em micrômetro (μm; 10⁻⁶ m), ao invés de micro (μ); nanômetro (nm; 10⁻⁹ m), ao invés 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" (7^a ed., 1957) obedecida. Se o Autor divergir dessa nomenclatura, seu julgamento será respeitado, mas a classificação correspondente ao Manual de Bergey deverá ser mencionada a seguir, entre parênteses, à primeira vez em que o nome figurar no texto e no resumo. Quando um nome novo for proposto para um microrganismo, será solicitada a opinião de uma autoridade internacional em taxonomia.

FORMA DO MANUSCRITO — Os trabalhos devem ser datilografados em papel branco, comum, tamanho ofício, em espaço duplo ou triplo, deixando-se o mínimo de 3 cm de margens laterais, superior e inferior. Títulos de capítulos de primeira ordem devem ser centrados, incluídos essencialmente pela ordem: **Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos, Referências Bibliográficas**. Os de subcapítulos devem ser junto à margem esquerda. 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 seção **Referências Bibliográficas**, as citações devem ser por ordem alfabética de autor (ou da mesma combinação de autores) e, para um mesmo autor, em ordem cronológica, numeradas sequencialmente. Os artigos em periódicos devem ser citados na seguinte ordem: nome(s) do(s) autor(es) em maiúsculas, título do trabalho, nome do periódico (abreviado de acordo com o World Medical Periodicals), número do volume, número do fascículo (quando desejado; colocado entre parênteses), número da primeira e da última página do artigo, e ano da publicação.

Exemplo:

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

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

Citações de livros devem ter a seguinte ordem: autor(es), título, edição, local, editores e data. Exemplo:

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 árabe e datilografadas em páginas separadas. Os dados devem ser arranjados de maneira que colunas de material idêntico sejam lidas perpendicular e não transversalmente. Cabeçalhos e legendas devem ser suficientemente claros e compreensíveis, sem necessidade de consulta ao texto. São permitidas notas explanativas de rodapé indicadas por asteriscos, mas não descrições pormenorizadas dos experimentos. Materiais e métodos utilizados para a obtenção dos resultados devem ser incluídos na seção 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
Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia
Volume 8 Abril-Junho 1977 Número 2
Rev. Microbiol. (S. Paulo), 8(2)

CONTEÚDO – CONTENTS

Artigos originais

Acumulações limosas na indústria de chapas de fibras de madeira: I. Natureza da flora microbiana [<i>Slime accumulations in fiberboard industries. I. Nature of microbial population</i>] — Augusto Ferreira da Eira, Paulo de Campos Torres de Carvalho, José Santo Goldoni & Eneida de Assumpção	31
Relative heterothallism in <i>Aspergillus nidulans</i> — I.R. Baracho & J.L. Azevedo	36
Isolation and identification of menaquinone and acylglycerols in the acetone-soluble lipids from <i>Nocardia rhodochrous</i> — Celio Lopes Silva & Thuioshi Ioneda	39
Dupla redutase na determinação da verdadeira qualidade do leite de consumo [<i>Double reductase in the determination of the real milk quality</i>] — Alexandre Mello Filho, Jair Agostinetti Gentilini, Antonio José Xavier & Luiz Celso de Castro	43
Relacionamento antigênico entre <i>Yersinia pestis</i> e outras enterobactérias [<i>Non-reciprocal relationships between Yersinia pestis and other enterobacteria</i>] — Marly Paiva Nunes, Ítalo Suassuna & Ivone Rocco Suassuna	46

Nota breve

Fixação e coloração de flagelados do gênero <i>Tritrichomonas</i> [<i>Fixation and staining of flagellate cells of Tritrichomonas</i>] — G.A. De Carli, J. Guerrero, Zilma Freire & E. Nunes	53
--	----

Sociedade Brasileira de Microbiologia

Sócios Patrocinadores

BIOLAB-MÉRIEUX – Produtos para Laboratórios Ltda.

Coca-Cola Indústrias Ltda. – Rio de Janeiro

Eli Lily do Brasil Ltda.

Indústria Química e Farmacêutica Schering S.A.

Acumulações limosas na indústria de chapas de fibras de madeira: I. Natureza da flora microbiana*

Augusto Ferreira da Eira**; Paulo de Campos Torres de Carvalho***;
José Santo Goldoni** & Eneida de Assumpção****

Resumo

Estudo da natureza da população microbiana das acumulações limosas em indústrias de chapas de fibras da madeira. Isolamento de microrganismos, a partir de amostras limosas de coloração clara, intermediária e escura, com emprego da metodologia convencional de diluições em série, em meio de "água servida"-agar; incubação, contagem de microrganismos e repicagem, ao acaso, de 820 culturas resultantes dos isolamentos; purificação e agrupamento das culturas e identificação de acordo com suas características microscópicas e fisiológicas. As análises de população microbiana revelaram variações muito acentuadas entre os diferentes tipos de limo e em diferentes épocas de amostragens. Várias espécies dos gêneros *Trichosporon*, *Kluyveromyces* e *Penicillium* foram mais freqüentemente isoladas; espécies de *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Candida*, *Endomycopsis*, *Hansenula*, *Trichoderma*, *Sporobolomyces* e outros, bem como algumas bactérias não identificadas, foram menos freqüentes; *Trichosporon cutaneum* (de Beurn, Gougerot et Vaucher) Ota foi o microrganismo mais freqüentemente recuperado das acumulações limosas (25% do total de isolamentos).

Summary

Slime accumulations in fiberboard industries. I. Nature of microbial population

Study of the nature of the microbial population of slime accumulations in fiberboard industries. Isolation of microorganisms, from slime samples of light, intermediate, and dark color, with the dilution plate method and culture medium made of waste water-agar; incubation and microorganism countings, with 820 colonies randomly transferred to pure culture. Strains grouped according to their cultural characteristics and identified according to their microscopic and fisiologic characteristics. The analysis of the microbial population showed marked variations among the different types of slime and the different time of sampling; several species of the genera *Trichosporon*, *Kluyveromyces* and *Penicillium* were most frequently isolated whereas *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Candida*, *Endomycopsis*, *Hansenula*, *Trichoderma*, *Sporobolomyces* and others as well as a few unidentified bacteria were less frequent; *Trichosporon cutaneum* (de Beurn, Gougerot et Vaucher) Ota was the most frequently isolated microrganism from the slime accumulations (25% of the cases).

Introdução

As instalações da Duratex S.A., Indústria e Comércio em Botucatu e Jundiaí, Estado de São Paulo, como ocorre em outras indústrias produtoras de chapas de fibras da madeira de *Eucalyptus* spp, vêm apresentando um problema de acumulações limosas nos sistemas de recirculação da "água servida". As acumulações exibem consistência membranosa, viscosa ou limosa e com leve odor sulfídrico. Ao atingirem certas dimensões, desprendem-se das máquinas e entram no sistema de recir-

culação de água, ou caem diretamente sobre o colchão de polpa, provocando manchas depreciadoras da qualidade das chapas. Além dos prejuízos diretos à qualidade do produto, devem ser somados os prejuízos de paralização periódica da indústria, para eliminação das acumulações limosas.

Não foram encontrados relatos sobre a ocorrência de acumulações limosas em indústrias de chapas de fibras de madeira. Muitos autores estudaram a natureza e o

* Pesquisa subvencionada pela Duratex S.A. Indústria e Comércio; parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor.

** Respectivamente, Departamento de Fitotecnia e de Tecnologia dos Produtos Agropecuários da Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu — UNESP.

*** Departamento de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola da E.S.A. "Luiz de Queiroz" — USP; Piracicaba SP.

**** Engº Agrº aluna do Curso Pós-Graduado de Microbiologia da E.S.A. "Luiz de Queiroz" — USP.

controle da microflora das indústrias de papel e celulose (3, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 23, 28, 29, 30, 37 e 38), enquanto outros se dedicaram ao estudo da natureza e controle da microflora deterioradora da madeira e cavacos empilhados (4, 19, 20, 24, 25, 32, 34 e 35).

A natureza da flora microbiana causadora do limo, nas indústrias de celulose e papel, depende do tipo de indústria, controles de operação, estações do ano e características das matérias-primas não fibrosas adicionadas ao processo (14). Diferentes bactérias, fungos, actinomicetos, algas e protozoários têm sido encontrados nesses sistemas, variando, qualitativa e quantitativamente, entre locais, na mesma indústria, na dependência dos nutrientes disponíveis, pH, temperatura, oxigenação e do número de recirculações da água (36).

As bactérias têm sido apontadas como as principais responsáveis por acumulações limosas (16). Com efeito, espécies dos gêneros *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Chromobacterium*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Paracolobacterium*, *Proteus* e *Pseudomonas* têm sido, freqüentemente, isoladas por vários autores (6, 10, 11, 12, 13, 16, 28, 29, 30 e 38). A formação de materiais capsulares, resultantes do metabolismo em alguns organismos desses gêneros, tem sido enfocada como responsável pelo aspecto viscoso do limo das indústrias de papel e celulose (6, 8, 13 e 30).

Representantes de inúmeros gêneros de fungos têm sido relatados como associados aos sistemas de recirculação de água, sendo citados, como freqüentes, os gêneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Polyporus*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Hormodendron*, *Torula* e outros *Deuteromycetes*. Como infreqüentes, leveduras dos gêneros *Trichosporon*, *Candida* e *Rhodotorula* (37). Por outro lado, estudos sobre a natureza da flora microbiana das acumulações limosas de indústrias de papel e celulose dos Estados Unidos, entre 1959 e 1961, mostraram uma flutuação acentuada na população (16). No decorrer das épocas de amostragem os gêneros *Sporotrichum*, *Geotrichum*, *Phialophora* e *Trichosporon pullulans* foram os mais freqüentes dentre os fungos e *Pseudomonas*, *Flavobacter* e *Aerobacter*, entre as bactérias. Foram isolados, em menor freqüência, membros dos gêneros *Nectria*, *Cephalosporium* e *Candida* bem como muitas leveduras não identificadas (17 e 18).

Para estudar a natureza da flora microbiana de indústrias de celuloses e papel, de maneira geral, têm sido utilizados meios de cultura artificiais (11, 12 e 37) e alguns meios seletivos, como o utilizado para bactérias sulfato-redutoras (12 e 27). Alguns autores (16 e 17), além do meio natural de "água-branca"-agar, utilizaram meios artificiais, com rosa-de-bengala, com a finalidade de inhibir o crescimento de bactérias.

Os microrganismos das acumulações limosas têm sido isolados pelo método de diluições em série, conforme as recomendações da Technical Association of Pulp and Paper Industry, e por plaqueamento em estrias

(6, 7, 12, 16, 37 e 38).

No presente trabalho, é apresentado o estudo da microflora associada às acumulações limosas de indústria de chapas de fibras da madeira, face à sua natureza complexa e pouco conhecida.

Material e Métodos

As amostras de material limoso foram coletadas nas instalações da Duratex S.A., Indústria e Comércio, em Botucatu, em diferentes locais de ocorrência de limo, relacionados sempre ao sistema de recirculação de "água servida" e formação do colchão de polpa.

As amostras foram coletadas e acondicionadas em frascos esterilizados de 250 ml, sempre quando as acumulações limosas atingiam crescimento capaz de causar problemas à indústria, fato que geralmente ocorria a partir do 10º dia após as limpezas periódicas da máquina formadora do colchão. No laboratório, as amostras foram classificadas, segundo sua tonalidade, em *limo claro*, *intermediário* e *escuro*, de acordo com as tabelas internacionais de cores da ISCC — NBS (Inter Society Color Council and National Bureau of Standards) e, sua correspondência com a escala de MUNSELL (Musell soil color chart), conforme segue:

Intervalos das Tonalidades

Tonalidades das amostras	Escala ISCC — NBS(*)	Escala de MUNSELL(**)
Limo Claro	de 80 gy. yBr. a 77 m.y. Br.	de 9.5 YR 4.6/2.1 a 9.5 YR 4.4/3.9
Limo Intermediário	de 58 m. Br. a 56 deep Br.	de 5.6 YR 3.5/3.9 a 5.6 YR 2.4/5.2
Limo escuro	de 78 d.y. Br. a 65 br. black	de 9.4 YR 2.3/3.3 a 7.8 YR 0.6/0.9

(*) AMERICAN SOCIETY OF PHOTOGRAHMETRY. Manual of color aerial photography, 550 p. Menasha, Wisconsin, George Banta Co., 1968.

(**) MUNSELL BOOK OF COLOR, 160 p. Baltimore, Maryland, Munsell Color Company Inc., 1966.

Amostras de limo de cada tonalidade foram homogeneizadas em liquidificador por 30 segundos e, a seguir, diluídas em série, com plaqueamento das diluições 10^{-5} a 10^{-8} . Foi utilizado o meio de "água servida"-agar, que consiste na própria água de recirculação do sistema industrial, com cerca de 1% de carboidratos totais e pH aproximado de 3,6. Para evitar a hidrólise do agar e obter um meio límpido, a "água servida" foi filtrada em velas porosas de gesso e, após a autoclavagem, o pH foi corrigido para o valor inicial.

As placas foram incubadas a 27°C durante três dias e, finalmente, procedeu-se à contagem do número de colônias. Foram repicadas, ao acaso, 10% das colônias ocorrentes em placas contendo entre 100 e 300 colônias e a totalidade das colônias nas placas contendo entre uma e 30 colônias. Essas colônias foram transferidas para meio líquido de extrato de malte e levedura (22), com pH 3,6 e incubadas a 27°C durante quatro dias, após o que foi feita a purificação das colônias. As culturas puras foram repicadas em meio de malte, extrato de levedura, glucose e agar, para serem agrupadas em tipos culturais e, posteriormente, conservadas em meio de "água servida"-agar (15).

Para a identificação dos fungos, excluídas as leveduras, foram utilizadas as características culturais e microscópicas citadas por vários autores (2, 5, 21, 31 e 37). As leveduras foram identificadas de acordo com seus padrões culturais, microscópicos e fisiológicos (22). As bactérias não foram identificadas para o presente trabalho.

Resultados e Discussão

As análises da população microbiana dos materiais limosos apresentaram os resultados relatados nas Tabelas n.ºs. 1 e 2.

Tabela 1

População microbiana de amostras de acumulações limosas, coletadas em indústrias de chapas de fibras de madeira.

Amostra	População microbiana/ml de limo		
	Limo Claro	Limo Intermediário	Limo Escuro
1	$2,4 \times 10^7$	$37,3 \times 10^7$	$8,6 \times 10^7$
2	$5,7 \times 10^7$	$2,3 \times 10^7$	$3,4 \times 10^7$
3	$2,4 \times 10^7$	$7,7 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$
Média	$3,5 \times 10^7$	$15,8 \times 10^7$	$4,3 \times 10^7$
TOTAL	322	319	179

A separação dos materiais limosos pelas tonalidades visou observar possíveis variações na natureza da flora microbiana, considerando que determinadas tonalidades de limo predominaram sob diferentes condições (15). Embora os dados não sejam conclusivos, uma vez que foram analisadas amostras compostas de cada tonalidade, os gêneros *Kluyveromyces* e *Penicillium* foram mais freqüentes nos limos escuros.

O isolamento de microrganismos, a partir de materiais limosos de indústrias de celulose e papel, tem sido feito através do método de diluições em série, com a utilização de meios artificiais seletivos ou não (11, 12, 16, 17, 27 e 35). Neste trabalho, utilizou-se o meio natural de "água servida"-agar para todos os isolamentos de microrganismos dos materiais limosos, bem como na conservação de culturas puras em micoteca. Em ambos os casos existem desvantagens: a utilização de meios artificiais, de composição muito rica e acentuadamente diversa das

Tabela 2

Microrganismos isolados de acumulações limosas.

Microrganismo	Frequência de isolados			Total	% *
	Limo Claro	Limo Intermediário	Limo Escuro		
<i>Trichosporon cutaneum</i>	117	75	15	207	25,24
<i>T. fermentans</i>	—	—	2	2	0,24
<i>T. inkin</i>	3	1	1	5	0,61
<i>T. pullulans</i>	12	10	1	23	2,80
<i>Trichosporon</i> spp	35	18	4	57	6,95
<i>Candida curvata</i>	1	—	1	2	0,24
<i>Candida</i> spp	26	2	7	35	4,27
<i>Endocomycopsis bispora</i>	1	—	—	1	0,12
<i>Endocomycopsis</i> spp	—	1	—	1	0,12
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	—	—	1	1	0,12
<i>Cryptococcus</i> spp	2	3	—	5	0,61
<i>Hansenula anomala</i>	7	—	1	8	0,98
<i>Kluyveromyces bulgaricus</i>	1	3	6	10	1,22
<i>K. drosophilorum</i>	1	3	—	4	0,49
<i>K. marxianus</i>	27	56	30	113	13,78
<i>K. phaseolosporus</i>	8	35	24	67	8,17
<i>K. vanudenii</i>	11	10	8	29	3,54
<i>Kluyveromyces</i> spp	18	16	28	62	7,56
<i>Pichia</i> sp	2	—	2	4	0,49
<i>Rhodotorula glutinis</i>	—	1	—	1	0,12
<i>R. rubra</i>	—	3	—	3	0,37
<i>Torulopsis</i> sp	8	4	12	24	2,93
Leveduras não micelianas	7	—	3	10	1,22
Leveduras pseudo-micelianas	4	1	—	5	0,61
Leveduras micelianas	—	1	1	2	0,24
<i>Penicillium</i> spp	12	41	18	71	8,66
<i>Aspergillus niger</i>	2	16	3	21	2,56
<i>Aspergillus</i> spp	1	2	1	4	0,49
<i>Beauveria</i> sp	—	—	1	1	0,12
<i>Cephalosporium</i> spp	—	2	—	2	0,24
<i>Cladosporium</i> sp	—	—	1	1	0,12
<i>Graphium</i> sp	—	1	—	1	0,12
<i>Isaria</i> sp	—	1	—	1	0,12
<i>Mucor</i> sp	—	—	1	1	0,12
<i>Paecilomyces</i> sp	1	2	—	3	0,37
<i>Steccherinum</i> spp	3	1	1	5	0,61
<i>Trichoderma viride</i>	1	5	—	6	0,73
Outros fungos	5	1	1	7	0,85
Bactérias não classificadas	6	4	5	15	1,83
TOTAL	322	319	179	820	—

* Porcentagem sobre o total de microrganismos agrupados.

condições naturais, pode levar ao isolamento de microrganismos pouco envolvidos no problema em estudo e, em contraposição, os meios naturais estão sempre sujeitos a variações em sua composição, o que torna extremamente difícil o estudo de floras microbianas complexas (1, 9 e 26).

Confrontos entre a utilização de meios artificiais e meio natural de "água branca", no isolamento de microrganismos de acumulações limosas na indústria de celulose e papel, mostraram que esses meios apresentaram resultados similares no tocante aos tipos de microrganismos isolados, exceto pelo maior número de bactérias isoladas em meio natural (16). Esses resultados, apontados como evidência da importância das bactérias nas formações limosas da indústria de celulose e papel (6, 16 e 30), não foram confirmados no presente trabalho, onde as bactérias ocorreram como apenas 1,8% da frequência, apesar da utilização de meio natural de "água

servida". Entretanto, as observações microscópicas (15) mostraram que, em alguns locais de amostragem e para materiais limosos de coloração clara, ocorreram quantidades apreciáveis de bactérias, formando cadeias de bacilos e aglomerados mucilaginosos, fato que deverá merecer maior ênfase na continuação desta pesquisa.

Finalmente, levando-se em conta o conceito de meios enriquecidos, isto é, meios em que determinados requisitos nutricionais de um microrganismo ou grupos de microrganismos são deliberadamente favorecidos, o meio natural (no caso, "água servida") certamente deve conter propriedades nutricionais seletivas, que determinam o estabelecimento da flora limosa em seu "habitat", inimitáveis por qualquer meio artificial (26 e 33).

As análises de população, nas acumulações limosas, denotaram variações entre as diferentes tonalidades de limo e no decorrer das épocas de amostragem. A inconsistência nos dados da análise da população poderia ser atribuída a numerosos fatores como: locais de amostragem na indústria, controle de operações dos sistemas industriais, estações do ano, temperatura dos "habitats" de formação limosa, tipo e qualidade de polpa, pH, oxigenação e muitos outros fatores que traduzem as freqüentes mudanças das condições ambientais da indústria (8, 14, 16, 30, 36 e 37).

O estudo da natureza da microflora limosa, efetuado através do isolamento de microrganismos pelo método de diluições, denotou que a flora microbiana do limo é constituída, predominantemente, por fungos relacionados às leveduras micelianas. Dentre estes, *Trichosporon cutaneum* (de Beurm, Gougerot et Vaucher) Ota, foi isolado em maior freqüência (25,3% do total), seguido

de outras espécies do gênero *Trichosporon* não identificadas. Dentre as leveduras não micelianas, várias espécies do gênero *Kluyveromyces* apresentaram, somadas, a mesma freqüência do gênero *Trichosporon*. Várias espécies não identificadas do gênero *Penicillium* foram, entre os fungos filamentosos, isoladas em maior freqüência. O confronto desses resultados com os da literatura (37) apresenta certas discordâncias quanto às freqüências de microrganismos isolados de amostras de polpa e papel segundo as quais o gênero *Trichosporon* é apontado como infreqüente e vários Deutromycetes (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium* e outros) como os mais freqüentemente isolados. Por outro lado, várias espécies dos gêneros *Geotrichum*, *Oidium*, *Monilia*, *Oospora* e *Sporotrichum*, isolados em elevada freqüência em diferentes locais (16, 17, 28, 29, 30 e 37), não passam de sinonímia de *Trichosporon cutaneum*, segundo Lodder (22). Se a essa discussão somar-se a elevada freqüência de isolamento nos gêneros *Sporotrichum*, *Geotrichum* e *T. pululans*, obtida numa série de amostras limosas de indústrias de celulose e papel dos Estados Unidos (16), poder-se-ia supor que a microflora encontrada naquelas indústrias apresenta muita semelhança com a flora limosa de indústrias de chapas de fibra da madeira.

Agradecimentos

Os autores expressam seus agradecimentos ao Engº Agrº Onaur Ruano e aos bolsistas da Duratex, Benedito Tadeu Calsolari e Agenor Martinho Correa, pela colaboração prestada na fase experimental.

Referências Bibliográficas

1. ALEXANDER, A. — Introduction to soil microbiology, 472 p. New York, John Wiley and Sons Inc., 1961.
2. ALEXOPOULOS, C.J. — Introductory mycology, 613 p. New York London-Sydney, John Wiley & Sons Inc., 1966.
3. ALPER, N. — Paper manufacture under near sterile conditions. *Tappi* (N.Y.), 43: 181A-183A, 1960.
4. ASSARSSON, A. — Reactions during chip storage and how to control them. *Pulp Pap. Mag. Can.*, 70: T323-T328 (*Chem. Abstr.* 71:12170 q), 1969.
5. BARNET, H.L. — Illustrated genera of imperfect fungi, 225 p. 2th ed. Minneapolis, Minn., Burgess Publishing Co., 1960.
6. BECKWITH, T.D. — The bacteriology of pulp slime. *J. Bacteriol.* 22:15-22, 1931.
7. BREWER, D. — Studies on slime accumulation in pulp and paper mills. I. Some fungi isolated from mills in New Brunswick and Newfoundland. *Can. J. Bot.*, 36:941-946, 1958.
8. CASEY, J.P. — Pulp and paper: chemistry and chemical technology, vol. II, 668 + 147 p. 2th ed. New York, Interscience Publisher, Inc., 1960.
9. COCHRANE, V.W. — Physiology of fungi, 524 p. New York, John Wiley & Sons, Inc., 1958.
10. CONKEY, J.H. & CARLSON, J.A. — An examination of Methods for testing biostatic Agents. *Tappi* (N.Y.), 45:514-523, 1962.
11. CONKEY, J.H. & CARLSON, J.A. — Relative toxicity of biostatic agents suggested for use in the Pulp and Paper Industry. *Tappi* (N.Y.), 46:23A-39A, 1963.
12. COSTER, E. — The slime problem in the paper industry caused by micro-organisms. *Appita* (Sydney), 21: 132-138, 1968.
13. DELAPORTE, A.V. & VLASSOF, L.T. — Fresh water quality — its effect on product quality in the pulp and paper industry. II. Some biological aspects of water quality. *Tappi* (N.Y.), 43:189A-191A, 1960.
14. DIEHM, R.A. — Microbiología de la pulpa y del papel, In LIBBY, C.E. — Ciencia y tecnología sobre pulpa y papel. Tomo II: Papel, 514 p. 2th ed. Mexico, Espanha, Argentina e Chile, Comp. Editorial Continental S.A., 1969.
15. EIRA, A.F. — O problema de acumulações limosas de origem microbiana em indústrias de chapas de fibras da madeira. Dissertação de Mestrado, E.S.A. "Luiz de Queiroz" — USP Piracicaba. 80 p. (mimeografado), 1975.
16. EVELEIGH, D.E. & BREWER, D. — Ecological observations on the fungi and bacteria in slime accumulations in a paper mill. *Can. J. Bot.*, 42:35-43, 1964a.

17. EVELEIGH, D.E. & BREWER, D. — Nutritional requirements of the microflora of a slime accumulation in a paper mill. *Can. J. Bot.*, 42:341-350, 1964b.
18. EVELEIGH, D.E. & BREWER, D. — Interrelationships between microorganisms in an accumulation of slime in a paper mill. *Can. J. Bot.* 43:519-526, 1965.
19. GREAVES, H. — The bacterial factor in wood decay. *Wood. Sci. Technol.* (N.Y.), 5:6-16 (*For. Abstr.* 33: 7054), 1971.
20. KNUT, D.T. — Bacteria associated with wood products and their effects on certain chemical and physical properties of wood. Abstr. of thesis, in *Dissert. Abstr.* 25:2175 (*For. Abstr.*, 26:5935), 1964.
21. LACAZ, C.S.; MINAMI P.S. & PURCHIO A. — O grande mundo dos fungos, 255 p. São Paulo, Edit. U.S.P. e Polígono, 1970.
22. LODDER, J. — The Yeasts: a taxonomic study, 1385 p. Amsterdam-London, North-Holland Publis. Comp., 1970.
23. MARTIN, R.B. — Sterilization and deodorization. In: Water technology in the pulp and paper industry. *Tech. Ass. Pulp Pap. Ind.* (N.Y.), *Tappi Monogr. Ser.* n° 18, 170 p., 1957.
24. MERRIL, W. & FRENCH, D.W. — Decay of wood by *Alternaria* and *Penicillium*. *Phytopathology*, 54:867-868, 1964.
25. MERRIL, W. & FRENCH, D.W. — Decay in wood and wood fiber products by *Sporotrichum pruininosum*. *Mycologia*, 58:592-596, 1966.
26. POCHON, J. & BARJAC, H. — Traté de microbiologie des sols: applications agronomiques, 685 p. Paris, Dunod Ed., 1958.
27. POSTAGE, J.R. — Versatile medium for the enumeration of sulfite-reducing bacteria. *Appl. Microbiol.* 11:265-267, 1963.
28. SANBORN, J.R. — Development and control of microorganisms in a pulp and paper mill system. *J. Bacteriol.* 26:373-378, 1933.
29. SANBORN, J.R. — Slime-producing coliform and coliform-like bacteria. *J. Bacteriol.*, 48:211-217, 1944.
30. SANBORN, J.R. — Slime control in the pulp and paper industry, 132 p. New York, Lockwood Trade Journal Co., 1965.
31. SILVEIRA, V.D. — Lições de micologia, 301 p. 3^a ed. Rio de Janeiro, Livraria José Olympio, 1968.
32. SHIELDS, J.K. — Brown-stain development in stored chips of spruce and balsam fir. *Tappi* (N.Y.), 53:455-457, 1970.
33. STANIER, R.Y.; DOUDOROFF, M., & ADELBURG, E.A. — Mundo dos micróbios, 741p. São Paulo, Edgard Blücher Ltda e USP, 1969.
34. STRANKS, D.W. — *Trichoderma viride* enzymic degradation of wood structure. *Bi-Mon Res. Notes* (Can.), 26:23-24, 1970.
35. TANSEY, M.R. — Isolation of thermophilic fungi from selfleated, industrial, wood chip piles. *Amer. J. Bot.*, 57:747 (*For. Abstr.*, 32:3403), 1970.
36. TORGESEN, D.C. — Fungicides — An advanced treatise, 697 p. N.Y. and London, Academic Press, 1967.
37. WANG, C.J.K. — Fungi of pulp and paper in New York, 115 p. State Univ. College of Forestry at Syracuse University, 1965.
38. WOLFSON, L.L. & MICHALSKI, R.J. — The incidence and effects of the anaerobic bacteria, *Clostridium*, in paper mill systems. *Tappi* (N.Y.), 47:197-199, 1964.

Relative heterothallism in *Aspergillus nidulans*

I. R. Baracho & J. L. Azevedo*

Resumo

Heterotalismo relativo em Aspergillus nidulans

Estudo de heterotalismo relativo, por meio de cruzamentos dialélicos. Seis diferentes linhagens de *Aspergillus nidulans* foram cruzadas em todas as combinações possíveis e as proporções de cleistotécios híbridos determinadas em cada cruzamento. Os resultados mostraram que o heterotalismo relativo não é um fenômeno comum a todos os cruzamentos e que a tendência ao cruzamento cariogâmico preferencial pode ser geral ou específica.

Summary

Study of relative heterothallism through diallel crosses. Six different strains of *Aspergillus nidulans* were crossed in all possible combinations and the proportions of hybrid cleistothecia were determined for each cross. The results show that relative heterothallism is not a common phenomenon to all crosses and that the tendency to preferential cross-karyogamy could be general or specific.

Introduction

Heterothallism, discovered by Blakeslee (4), plays an important role in fungi sexual process. In this respect, fungi are divided in two categories: homothallic, those with self-fertile mycelia, and heterothallic, those with unisexual mycelia. To indicate heterothallism, the symbols + (plus) and - (minus) were created and are now known as mating-type factors or incompatibility factors. After this discovery, the study of the problem of mycelia sexuality has increased in complexity and several kinds of homothallism and heterothallism were described.

Among the types of heterothallism, one is the "relative heterothallism" observed by Hemmons & col. (8) in *Aspergillus nidulans*. Through the study of twenty-two different mutant strains of this fungus they have found that in ten of them, the proportions have shown a cross-karyogamy of 100%. Since the strains used were self-fertile, it was shown by this way, preferential, cross-karyogamy, designated "relative heterothallism", which was then defined by the emergence of hybrid ascospores in a proportion above 50%, in certain strain combinations (10).

The appearance of hybrid ascospores in a proportion which differs significantly from 50% and above this percentage cannot be casual since in a heterokaryon where the frequency of nucleus A is p and the frequency of nucleus B is q ($q = 1 - p$), the frequency of cross-karyogamy ($A \times B$) would be $2pq$ which would reach a maximum value of 50% when $p = q$. In this way, the frequency of hybrid ascospores above 50% shows the existence of preferential karyogamy.

Relative heterothallism is a phenomenon largely found in certain fungi (2, 9). However, the ways by which the preferential karyogamy is reached has not yet been described. Some genetics inferences could perhaps be obtained through analysis of diallel crosses. Since such method has not yet been applied to the study of preferential karyogamy, the present study was aimed to carry out an analysis of the relative heterothallism through diallel crosses in strains of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*.

* Departamento de Genética e Evolução, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Estado de São Paulo, Brasil.

Material and Methods

Minimal medium (MM) was Czapec-Dox medium with 1% (w/v) glucose. Complete medium (CM) was a complex medium containing yeast extract, hydrolyzed casein, hydrolyzed nucleic acids, vitamins, etc (10). Solid media contained 2% agar. The strains of *A. nidulans* all derived from Glasgow stocks, were kept at 5°C on CM slants. They were purified at six — month intervals by single colony isolation and auxanographic characterization. The following strains were used: Strain A: *yA*₂, *nicA*₂, *riboD*₅; strain B: *yA*₂, *wA*₃, *sC*₁₂; *pyroA*₄; strain C: *anA*₁, *biA*₁; strain D: *biA*₁, *methG*₁, *fIA*₁; strain E: *adG*₁₄, *yA*₂, *coA*; strain F: *su, adE*₂₀, *AcrA*₁, *lysB*₅, *chaA*, *pabaA*₁, *yA*₂, *adE*₂₀. Mutant alleles in this study determined the phenotypes: *yA*₂, yellow conidia; *wA*₃ (epistatic to *y/y*⁺), white conidia; *chaA*, chartreuse conidia; *coA*, compact colonies; *fIA*₁, fluffy mycelium; *adG*₁₄ and *adE*₂₀, *anA*₁, *biA*₁, *lysB*₅, *methG*₁, *nicA*₂, *pabaA*₁, *pyroA*₄, *riboD*₅, *sC*₁₂, requirements, respectively, for adenine, aneurine, biotin, lysine, methionine, nicotinic acid, ρ — aminobenzoic acid, pyridoxine, riboflavin and thiosulfate; *AcrA*₁, resistance to acriflavine; *su, adE*₂₀, suppressor of adenine requirement caused by *adE*₂₀. Origin and location of the mutants can be found in Barratt, Johnson & Ogata (3), Ball and Azevedo (1), and Clutterbuck (5). General techniques of genetic analysis were those of Pontecorvo & col. (10). The 6 strains were crossed in all possible combinations (15 crosses). Approximately the same number of spores from each strain was inoculated in test tubes with liquid MM plus 2% CM. After 2 days incubation the mycelial mat formed was transferred to dishes of solid MM (plus 0.02, μ g/ml biotin for the cross C × D).

Cleistothecia were obtained after 10 days of incubation and cleaned of Hulle cells and adherent conidia. Each cleistothecium was crushed into a test tube with saline (0.9%) and the ascospores were freed into the saline. After appropriate dilution they were plated onto CM plates. Such plates were incubated for three days at 37°C and on the basis of the colour or morphology of the resulting colonies the cleistothecium was classified as selfed or hybrid.

Statistical analysis of the data was carried out following the method suggested by Griffing(7). The mathematical model in this is as follows: $x_{ij} = u + g_i + g_j + s_{ij} + e_{ij}$ in which u is the general mean, g_i and g_j the effects of the general combining ability, s_{ij} the effect of the specific combining ability so that $s_{ij} = s_{ji}$ and e_{ij} is the exponential error from the observations of the order ij . The restriction are $\sum g_i = 0$ and $\sum s_{ij} = 0$ (for each j).

Results and Discussion

The number of selfed and hybrid cleistothecia within each cross (Table 1) did permit the obtention of the transformed values for the proportions of hybrid cleistothecia

for each cross (Table 2). For the variance analysis such proportions were transformed in angle = $\text{arc sen } \sqrt{P\%}/100$. Table 3 shows the variance analysis for the general combining ability (g.c.a.) and specific combining ability (s.c.a.). The variance of the residue used in this case was 821/N (6). Table 4 presents the effects of the g.c.a. for each strain which would permit to assess which strain had a positive or negative contribution common to all crosses with the other strains. Table 5 presents the data which permitted the comparison of the relative importance of the effects of s.c.a. High values (positive or negative) of such effects indicate whether data from one cross are relatively higher or not than the expected value on the basis of the g.c.a. Finally, Table 6 gives the variance of the effects of the g.c.a. and s.c.a. associated to each strain. Such data permitted an evaluation of strains taking in account, comparatively, values for g.c.a. and s.c.a.

The mean of hybrid cleistothecia (47.51) did not differ statistically from the maximum expected value. Considering all studied cleistothecia, the proportion of hybrid cleistothecia did not exceed 50%, indicating that rela-

Table 1

General results of the crosses. Number of selfed and hybrid cleistothecia within each cross

Crosses	Number of cleistothecia	
	Selfed	Hybrid
A × B	9	3
A × C	8	4
A × D	8	4
A × E	12	0
A × F	2	10
B × C	11	1
B × D	2	10
B × E	7	5
B × F	12	0
C × D	2	10
C × E	2	10
C × F	4	8
D × E	0	12
D × F	1	11
E × F	1	11

Table 2

Transformed values of the proportion of hybrid cleistothecia for each cross

Strains	B	C	D	E	F
A	30.00	35.24	35.24	0.00	65.88
B		16.64	65.88	40.16	0.00
C			66.67	65.88	54.70
D				90.00	73.15
E					73.15

tive heterothallism is not a phenomenon common to all crosses. However, the variance analysis (Table 3) indicated a difference among strains regarding the proportion of hybrid cleistothecia. Certain strains combinations gave higher or lower results than the expected, on basis of the g.c.a.

Since the mean did not differ from 45, the g.c.a. can give an estimation of the preferential cross-karyogamy, once it can show the contribution of the strain when it is crossed with all others. This result and the positive values found (Table 4) are an indication of the behaviour of each nucleus and shows also the tendency of each nucleus to present or not preferential cross-karyogamy with nuclei of different genotypes. Strains D, E and F presented a positive effect regarding the g.c.a. (Table 4). On the other hand, strains A and B presented a negative effect in this respect; they contribute to a lower mean of hybrid cleistothecia. This fact can be explained by an unequal proportion of nuclei of both types in the heterokaryon or, to a tendency of nuclei of both strains to self-karyogamy. Strain C did not present a significative effect on the g.c.a.

The s.c.a. can give an indication of the specific preferential cross-karyogamy once it can show which crosses presented an increased or decreased proportion of hybrid cleistothecia on basis of the g.c.a. These values permitted to show which pairs of strains presented a positive complementation (Table 5).

Table 3

Variance analysis for general combining ability (g.c.a.) and specific combining ability (s.c.a.)

SOURCE	D.F. ^a	M.S. ^b	F
General combining ability (g.c.a.)	5	1142.8228	16.7038**
Specific combining ability (s.c.a.)	9	551.818	8.0655**
Error		68.4166	

a Degrees of freedom

b Mean square

c Significant at 1% level

Finally, a comparative analysis of g.c.a. and s.c.a. could be carried out (Table 6). In such respect it was shown that strain D ($biA_1; methG_1; f/A_1$) is the one which presented a general tendency to preferential karyogamic cross which is more distinguishable in relation to the specific preferential cross-karyogamy. In the cases of strains E and F the values of the preferential cross-karyogamy are highly affected by the values of the specific preferential cross-karyogamy.

Table 4

Effects of the general combining ability (g.c.a.) for each strain

Strain	Effects of the g.c.a.
A	- 17.79
B	- 21.21
C	0.40
D	23.35
E	7.92
F	7.32

Table 5

Effects of the specific combining ability (s.c.a.) for each cross

Strains	B	C	D	E	F
A	21.50	5.13	- 17.83	- 37.63	28.83
B		- 10.80	16.23	5.95	- 33.63
C			4.59	10.06	- 0.54
D				11.23	- 5.05
E					10.39

Table 6

Variance of the effects associated to each strain

Strain	Variance of the General Effects	Variance of the Specific Effects
A	302.23	712.10
B	435.61	450.86
C	- 14.09	15.07
D	530.97	137.19
E	48.47	395.35
F	39.62	372.66

References

1. BALL, C. & AZEVEDO, J.L. — A fluffy mutant in *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus News letter*, 5:9, 1964.
2. BARACHO, I.R. — Contribuição do estudo de corpos de frutificação em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter — M.S. Thesis — University of São Paulo. p. 57, 1968.
3. BARRAT, R.W.; JOHNSON, G.B. & OGATA, W.N. — Wild type and mutant stocks of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 52:233-246, 1965.
4. BLAKESLEE, A.F. — Sexual reproduction in the *Mucoraceae* — *Proc. Acad. Art. and Sci.*, 40:205-319, 1904.
5. CLUTTERBUCK, J. — *Aspergillus nidulans*. In Handbook of Genetics (R.C. King, Editor) — Academic Press, New York, 1974.
6. FISHER, R.A. — Contributions to Mathematical Statistics — John Wiley and Sons. New York, 1950.
7. GRIFFING, B. — Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. *Aust. J. Biol. Sci.*, 9:463-493, 1956.
8. HEMMONS, L.M.; PONTECORVO, G. & BUFTON, A.W.S. — Peritheium analysis in *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 6:135, 1952.
9. OLIVE, L.S. — Heterothallic behavior in the *Aspergillaceae*. *Mycologia*, 46:254-255, 1954.
10. PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; MACDONALD, K.D. & BUFTON, A.W.J. — The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genet.*, 5:142-238, 1953.

**Isolation and identification of menaquinone and acylglycerols
in the acetone-soluble lipids from *Nocardia rhodochrous****

Celio Lopes Silva & Thuioshi Ioneda

Summary

Ethyl ether-soluble and acetone-soluble lipid contents in *Nocardia rhodochrous* grown on glycerol were determined. Ketones, menaquinone and acylglycerols were detected in the acetone-soluble lipids. Alkaline hydrolysis of triacylglycerol and monoacylglycerol showed that the former contains only palmitic acid type fatty acids while the last exhibited only nocardomycolic acids with the chain-length centered in forty carbon atoms. Monoacylglycerol from *N. rhodochrous* showed slightly higher migration than 1-monopalmitin on thin-layer chromatography.

Resumo

Isolamento e identificação de menaquinona e acilgliceróis nos lipídios solúveis de Nocardia rhodochrous

Os conteúdos de lipídios solúveis em éter etílico e em acetona foram determinados, em *Nocardia rhodochrous* cultivado em glicerol. Cetonas, menaquinonas e acilgliceróis foram encontrados em lipídios solúveis em acetona. A hidrólise alcalina do triacilglicerol e do monoacilglicerol mostrou que o primeiro contém ácidos graxos do tipo palmítico, ao passo que o monoacilglicerol exibiu somente ácidos nocardomicólicos, com a cadeia carbônica constituída de aproximadamente quarenta átomos de carbono. Monoacilglicerol de *N. rhodochrous* apresentou migração ligeiramente maior que 1-monopalmitina, na cromatografia em camada delgada.

Introduction

Lipid content in *Nocardia* has been shown to range from 43% in *N. asteroides* 9969 (4) to 20.5 and 15.5% in *N. brasiliensis* 705 and *N. asteroides* 318, respectively (8). Differences in the yield of acetone-soluble lipids of several strains of *Nocardia* have been observed (8). From *N. lurida* 95% of acetone-soluble lipids were recovered while *N. asteroides* 443-2 gave only 61% of these lipids (2).

Occurrence of acylglycerols in *N. brasiliensis* (4) and in other strains of *Nocardia* (12) has been reported, however no specification of the class they belonged was described.

In this paper we report the extraction and fractionation procedures of lipids, and the identification of menaquinone, triacylglycerol and monoacylglycerol from acetone-soluble lipids of *N. rhodochrous*.

Materials and Methods

Chemicals — Triolein (trioleoylglycerol), from Calbiochem, San Diego, U.S.A.; monopalmitin (1-palmitoylglycerol), from Applied Science Laboratories, Inc., U.S.A., palmitic acid, from Sigma Chemical Co., Saint Louis, U.S.A., corynomycolic acid (2-tetradecyl-3-hydroxy octadecanoic acid), palmitone (hentriacontan-16-one), methyl corynomycolate and methyl palmitate were prepared as described previously (6). Menaquinone of *Corynebacterium diphtheriae* was isolated from acetone-soluble lipids (1, 9).

Analytical procedures — Column chromatography was carried out on washed-silicic acid (Carlo Erba, Italy) and on washed-aluminium oxide (Merck, Darmstadt, Germany). Silicic acid was washed as follows: 100 g of adsorbent were suspended in 500 ml of 1N HC1,

* Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo, Caixa Postal 20780, São Paulo SP, Brasil
Supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (Project BIOQ/FAPESP).

left for fifteen minutes, then filtered through Whatman nº 1 filter paper layered on a Büchner funnel. This procedure was repeated once, and further washing was performed with distilled water and with ethanol. Activation was carried out at 110°C for 24 h. Aluminium oxide was purified as follows: 100 g were soaked in 500 ml of 10% acetic acid for one hour. The supernatant was discarded and 300 ml of 10% acetic acid were added. After thirty minutes the supernatant was discarded and the adsorbent washed with distilled water until neutrality, then with methanol. Finally it was dried at 110°C for 24 h. Thin-layer chromatography was performed on silica gel H (Merck, Darmstadt, Germany).

The following solvent systems were used: (A) n-hexane-ethyl ether-acetic acid (70:5:1, v/v/v); (B) n-hexane-ethyl ether-acetic acid (70:30:1, v/v/v); and (C) n-hexane-ethyl ether-acetone-acetic acid (70:30:11:1, v/v/v/v). Lipids were located by exposing the plates to iodine vapours. Spray reagents for phosphorus (7, 11) and for sugars were also used. Sugars were detected by spraying the plate with 0.4% anthrone in n-hexane-benzene (1:1, v/v) followed by 50% (v/v) sulphuric acid in water and heating the plate for about five minutes at 110°C.

Ascending paper chromatography was performed on Whatman paper nº 1, using the following solvent systems: (D) 1-butanol-pyridine-water (6:4:3, v/v/v); (E) 1-propanol-ethyl acetate-water (7:1:2, v/v/v); and (F) 1-butanol-acetic acid-water (120:30:50, v/v/v). Paper chromatograms were stained with silver nitrate-sodium hydroxide dip reagent (10). Neutralisation equivalent was determined by microtitration with an ethanolic potassium hydroxide solution calibrated with palmitic and corynomycolic acids (1 mg/ml in benzene) using 1% ethanolic phenolphthalein as indicator.

Organism and lipid fractionation — *Nocardia rhodochrous* was the generous gift of Dr. J. Rozanis, University of Western Ontario, London, Canada. The cells were grown in a static two liters Erlenmeyer flasks during 12 days at 37°C, in a liquid medium containing 1.5% glycerol, 1% yeast extract and 0.1% sodium chloride. The cells were collected by centrifugation, washed three times with distilled water, and finally suspended in two volumes of a mixture of ethyl ether-ethanol (1:1, v/v) and stirred for 30 minutes. Then solvents were filtered through a sintered glass filter and the cells were again extracted twice. All the filtrates were pooled and concentrated on a rotary evaporator. A re-extraction was performed by adding one volume of 1M sodium chloride and five volumes of ethyl ether. The ethyl ether extract was washed with 1M sodium chloride, dried over anhydrous sodium sulphate, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was extracted four times with boiling acetone and the precipitate was removed by centrifugation; the acetone-soluble lipids were dried under vacuum, and these lipids (2g) were applied to a column (2.5 x 24 cm) of silicic acid (column nº 1).

The column was eluted with 300 ml each of the following solvents: chloroform, 1% (v/v) ethanol in chloroform, 10 and 50% (v/v) methanol in chloroform. Purification of the components of the chloroform eluate was achieved by preparative thin-layer chromatography in solvent A. The 10% (v/v) methanol in chloroform eluate was further purified on a column (1.5 x 22.5cm) of silicic acid (column nº 2), and elution was performed with 120ml each of the following solvents: chloroform, 3 and 10% (v/v) methanol in chloroform; fractions of 20ml were collected.

Alkaline hydrolysis — Mild alkaline hydrolysis of triacylglycerol was carried out as previously described (5). Alkaline hydrolysis of monoacylglycerol was carried out in 3 ml of 95% ethanol and 0.15ml of 33% potassium hydroxide under reflux for 2 h (7). The reaction mixture was neutralized with 10 ml Amberlite IR-120 (H⁺). Water was added, and extraction of the fatty acid moiety was performed with ethyl ether.

Results

About 10.9% (6.8g) of ethyl ether-soluble lipids were recovered from 63g (dry cell weight) of *Nocardia rhodochrous* grown on glycerol. Fractionation of the ethyl ether-soluble lipids with acetone gave about 55% of acetone-soluble lipids.

When acetone-soluble lipids were applied to the column of silicic acid, 67.5, 8, 22.5 and 3% of solvent-free material were eluted with chloroform, 1% (v/v) ethanol in chloroform, and 10 and 50% (v/v) methanol in chloroform, respectively (Table 1). The chloroform eluate exhibited three major components by thin-layer chromatography (Fig. 1, sample 1) with Rf values of 0.24, 0.52 and 0.82. These Rf values corresponded to those of trioleoylglycerol, menaquinone and palmitone, respectively. The triacylglycerol fraction released fatty acids of the palmitic acid type after alkaline hydrolysis (Fig. 2, sample 3).

Table 1

Fractionation of the acetone-soluble lipids from *Nocardia rhodochrous* on a column of silicic acid

Eluate number	Eluent % of methanol in chloroform	Residues from eluates (mg)	Compounds in each eluate detected by thin-layer chromatography ^(a)
1	0	1350	Ketone, menaquinone, triacylglycerol, unidentified components
2	0 ^(b)	160	mycolic acids, C ₁₆ type fatty acids
3	10	450	monoacylglycerol
4	50	60	not identified

(a) The compounds were detected in each of the eluates by thin-layer chromatography on silica gel H. Eluate number 1 was analysed in solvent A and the eluate number 2, 3 and 4 were analysed in solvent B.

(b) This eluate contains 1% (v/v) ethanol in chloroform.

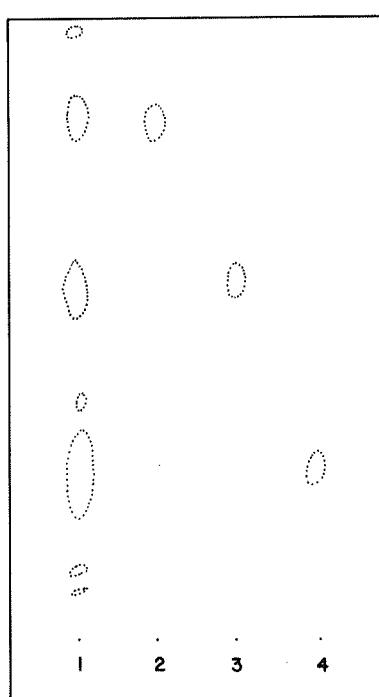


Fig. 1 — Thin-layer chromatography of the acetone-soluble lipids from *Nocardia rhodochrous*. The plate was developed in solvent A. (1) chloroform eluate from purification of acetone-soluble lipids on column of silicic acid; (2) palmitone; (3) menaquinone from *Corynebacterium diphtheriae*; (4) trioleoylglycerol. Lipids were detected by exposing the plate to iodine vapours.

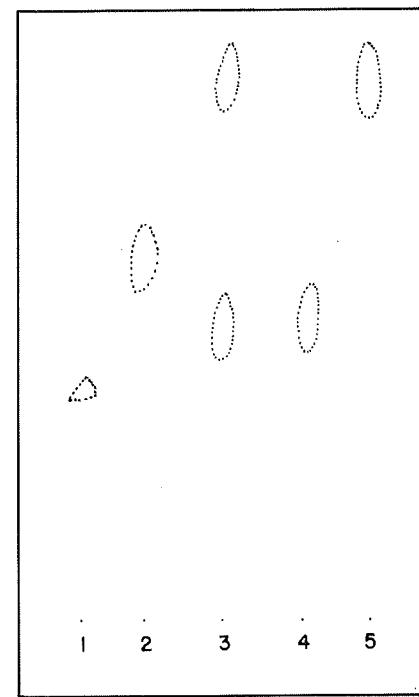


Fig. 2 — Thin-layer chromatography of the fatty acid moiety released from triacylglycerol of *Nocardia rhodochrous* after alkaline hydrolysis (sample 3). Chromatography was carried out on a silica gel H plate in solvent C. (1) corynomycolic acid; (2) methyl corynomycolate; (4) palmitic acid and (5) methyl palmitate. Lipids were detected by exposing the plate to iodine vapours.

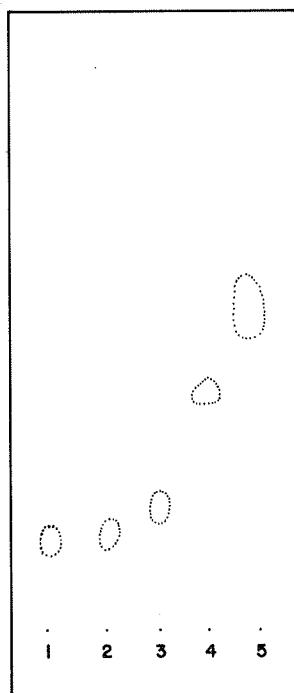


Fig. 3 — Thin-layer chromatography of the monomycoloylglycerol isolated from *Nocardia rhodochrous*: (sample 3). Chromatography was carried out on a silica gel H plate in solvent C. (1) 1-monopalmitin; (2) monomycoloylglycerol from *Corynebacterium ovis* (unpublished results); (4) corynomycolic acid; (5) palmitic acid. Lipids were detected by exposing the plate to iodine vapours.

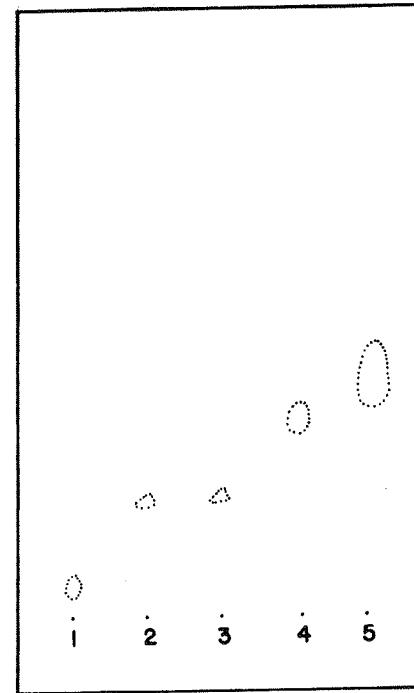


Fig. 4 — Thin-layer chromatography of the fatty acid moiety released from monoacylglycerol of *Nocardia rhodochrous* after alkaline hydrolysis (sample 3). Chromatography was carried out on a silica gel H plate in solvent B. (1) monoacylglycerol from *N. rhodochrous*; (2) corynomycolic acid; (4) palmitic acid, and (5) methyl corynomycolate. Lipids were detected by exposing the plate to iodine vapours.

The water-soluble moiety exhibited only glycerol by paper chromatography in solvents D, E and F. The 1% (v/v) ethanol in chloroform eluate showed two components with the R_f values of palmitic and corynomycolic acids.

The 10% (v/v) methanol in chloroform eluate exhibited two components, one of them remaining in the origin and the other with a R_f equal to 0.04; however none of these reacting with reagent for phosphorus or with anthrone. After purification, the last component exhibited a R_f value slightly higher than that of the monoacylglycerol in solvent C (Fig. 3, sample 3).

Thin-layer chromatography of the fatty acids released from the purified monoacylglycerol exhibited only hydroxylated fatty acids (Fig. 4, sample 3). This fatty acid moiety showed neutralisation equivalent to 625. Glycerol was the sole water-soluble constituent detected by paper chromatography in solvent D, E and F.

Discussion

The quantity of ethyl ether-soluble lipids recovered from *Nocardia rhodochrous* (10.9%) was low when compared with that of *N. asteroides* 9969 (43%) (4). A difference in lipid content between *N. asteroides* 9969 and *N. asteroides* 318 (15.5%) had been described (8). Fractionation of ethyl ether-soluble lipids from *N. rhodochrous* with acetone gave about 55% of acetone-soluble lipids which have shown as less the one described for *N. asteroides* 9969 (82%).

Purification of acetone-soluble lipids by column and thin-layer chromatography gave components which were

identified as ketones, menaquinone, triacylglycerol and monoacylglycerol.

Menaquinone was further demonstrated to contain eight isoprene units in the polyisoprenoid side chain (detailed characterization of the compound will be described elsewhere). Therefore the menaquinone from *Nocardia* differed from that isolated from *Mycobacterium* (3), which contains nine isoprene units in the side chain. It is suggestive that the structure of menaquinone may have a taxonomical value for the organisms of the genus *Nocardia* and *Mycobacterium*.

Tryacylglycerol isolated from *N. rhodochrous* exhibited only palmitic acid type fatty acids while monoacylglycerol released only nocardomycolic acids. The neutralisation equivalent of the fatty acid moiety of monoacylglycerol was between 608 and 636, calculated for the mycolic acids, C₄₀H₈₀O₃ and C₄₂H₉₄O₃, respectively (5). These results show that *N. rhodochrous* grown on glycerol produced two classes of acylglycerols: one containing fatty acid moiety of the palmitic acid type fatty acids (tryacylglycerol) and other containing mycolic acids (monoacylglycerol). Thus the cells may have one mechanism for the acylation of glycerol with palmitic acid type fatty acids and other for the acylation of glycerol with mycolic acids.

Acknowledgements

We wish to express our sincere thanks to Mrs. L.Y. Ioneda for her skilled technical assistance. We are indebted to Drs. J. Nicolau and F.G. Nóbrega for reading the manuscript.

References

- BISHOP, D.H.L.; PANDYA, K.P. & KING, H.K. — Ubiquinone and vitamin K in bacteria. *Biochem. J.*, 83:606-614, 1962.
- BORDET, C. & MICHEL, G. — Étude des acides gras isolés de plusieurs espèces de *Nocardia*. *Biochim. Biophys. Acta*, 70:613-626, 1963.
- DUNPHY, P.J.; GUTNICK, D.L.; PHILLIPS, P.G. & BRODIE, A.F. — A new natural naphthoquinone in *Mycobacterium phlei*. Cis-dihydromenaquinone-9, structure and function. *J. Biol. Chem.*, 243:398-407, 1968.
- GUINAND, M. & MICHEL, G. — Structure d'un peptidolipide isolé de *Nocardia asteroides*, la peptidolipine N.A. *Biochim. Biophys. Acta*, 125:75-91, 1966.
- IONEDA, T.; LEDERER, E. & ROZANIS, J. — Sur la structure des diesters de tréhalose ("cord factors") produits par *Nocardia asteroides* et *Nocardia rhodochrous*. *Chem. Phys. Lipids*, 4:375-392, 1970.
- IONEDA, T.; LENZ, M. & PUDLES, J. — Chemical constitution of a glycolipid from *C. diphtheriae* PW8. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 13:110-114, 1963.
- KATES, M. — Techniques of Lipidology. Amsterdam. North-Holland Publishing Company, 1972.
- LANÉELLE, M.A.; ASSELINEAU, J. & CASTEL NUOVO, G. — Études sur les mycobactéries et les nocardiae. IV. Composition des lipides de *Mycobacterium rhodochrous*, *M. pellegrino* sp., et de quelques souches de Nocardiae. *Ann. Inst. Pasteur*, 108:69-82, 1965.
- SCHOLES, P.K. & KING, H.K. — Isolation of a naphthoquinone with partly hydrogenated side chain from *Corynebacterium diphtheriae*. *Biochem. J.*, 97:766-768, 1965.
- TREVELYAN, W.E.; PROCTER, D.P. & HARRISSON, J.S. — Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature*, 166:444-445, 1950.
- VASKOVSKY, V.E. & KOSTESKY, E.Y. — Modified spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms. *J. Lipid Res.*, 9:396-396, 1968.
- YANO, I.; FURUKAWA, Y. & KUSUNOSE, M. — Phospholipids of *Nocardia coeliaca*. *J. Bacteriol.*, 98:124-130, 1969.

Dupla redutase na determinação da verdadeira qualidade do leite de consumo*

Alexandre Mello Filho, Jair Agostineti Gentilin, Antonio José Xavier & Luiz Celso de Castro**

Resumo

Nas provas de redutases, dentro de valores determinados, o menor ou maior tempo de redução vem sendo utilizado como padrão de pior ou melhor qualidade para o leite de consumo. Entretanto, leite com excessiva contaminação, porém veiculando inibidores bacterianos, terão um longo tempo de redutase, comportando-se como um produto de elevada qualidade higiênica e falseando o resultado obtido. A pesquisa concomitante de inibidores bacterianos deverá então ser tornada obrigatória. No exame de 4.000 amostras do leite de consumo, a exigência foi observada, pelo emprego de dupla prova de redutase, tendo sido constatada a presença atuante de inibidores.

Summary

Double reductase in the determination of the real milk quality

According to certain grades in the reductase tests, the longer or shorter reduction time has been usually used to indicate the index for milk quality for consumption. Nevertheless milk heavily contaminated may carry bacterial inhibitors and will show a long dye reduction standard. Such a milk will show a false quality standard and will mislead the examination tests. Therefore the search for bacterial inhibitors becomes an obligatory procedure simultaneously to the reductase tests. By examining 4,000 milk samples such a procedure was observed, with the use of double reductase test, which indicated the presence of bacterial inhibitors.

Introdução

Na última década, a automação e a eletrônica vêm invadindo os laboratórios de análises e pesquisas.

É natural, pois que, em laticínios, surgissem as unidades autotécnicas, capazes de realizar, com perfeição, rapidez e alta precisão, grande número de dosagens como a verificação, em série, do ponto de congelação ou o teor graxo do leite e as contagens de células, afastando a sempre presente possibilidade do erro de apreciação individual.

Entretanto, a par desses avanços, defronta-se o técnico em laticínios com o emprego de processos clássicos, como o das provas de redutase, quer utilizando o azul de metíleno ou a resazurina, para a avaliação da qualidade higiênico-bacteriológica do leite cru e mesmo do leite pasteurizado ou esterilizado, servindo, no caso do leite cru, para classificá-lo.

Todas essas provas, sendo métodos indiretos para estimar o conteúdo bacteriano total em germes vivos do leite, consumindo oxigênio e reduzindo os seus corantes, sofrem influências marcantes dos inibidores do crescimento bacteriano, eventualmente presentes e cuja existência é capaz de determinar um tipo fictício de leite, devendo pois a sua presença ser considerada uma fraude e ser exigida liminarmente a sua ausência.

A dupla redutase, utilizada nesta pesquisa, serviu para evidenciar, em caráter liminar, a presença desses inibidores bacterianos.

Os inibidores podem se originar dos resíduos químicos da higienização de equipamentos em laticínios, de antibióticos, sulfamídicos e outros produtos utilizados na terapêutica veterinária, principalmente nas mastites, ou do adicionaramento fraudulento de conservadores. E

* Trabalho realizado na Divisão de Controle de Qualidade e Pesquisa da Cooperativa Central de Laticínios do Estado de São Paulo. Apresentado na Quarta Conferência Internacional Sobre os Impactos Globais da Microbiologia Aplicada (GIAM IV), 23-28 de julho de 1973, São Paulo, Brasil.

** Divisão de Controle de Qualidade e Pesquisa da Cooperativa Central de Laticínios do Estado de São Paulo; Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas da Santa Casa de São Paulo; e Hospital do Servidor Público Municipal de São Paulo.

este último é o ponto fundamental a ser analisado.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (10), muitos problemas que envolvem a manipulação do leite fresco, nos países da zona tropical e sub-tropical, se devem simplesmente ao fato de que elevadas temperaturas reinantes só permitem conservar o leite em boas condições durante pouco tempo. Ao que acrescentaremos a distância das fontes de transportes, o rudimentarismo da coleta do leite e a pequena capacidade de refrigeração.

De tal maneira que um grupo de especialistas, reunidos em Interlaken, na Suíça, em 1957, sob os auspícios da Organização das Nações Unidas para a alimentação e Agricultura (10) chegou à conclusão que, em tais condições, o uso de um preservante no leite, como um mal necessário, será tolerado excepcionalmente, para não originar graves perdas do referido produto. E que de todos os produtos preservativos existentes o único permitível para o leite destinado ao consumo humano é o peróxido de hidrogênio de grande pureza. Mas que, entre outros inconvenientes, o emprego de peróxido de hidrogênio, se aplicado sistematicamente, incitará quase que certamente os produtores a abandonar os notáveis esforços para melhorar as condições higiênicas na produção (6).

O atual Regulamento Brasileiro a respeito (2), não obstante seu artigo 514 advertir taxativamente que é proibido o emprego de substâncias químicas na conservação do leite, não cuida de exigir liminarmente a pesquisa da presença de inibidores, para julgar válidos os resultados das provas de rotina, inclusive a da redutase, que sofrem absoluta interferência daquelas substâncias.

Este trabalho vem complementar os demais por nós realizados (3-8), a respeito da presença de antibióticos e outros inibidores no leite de consumo na cidade de São Paulo.

Material e Métodos

Prova da redutase pelo azul de metíleno e resazurina — Realizadas de acordo com o "Standard Methods" (1) e "Bacteriological Techniques for Dairy Purposes" (9), sendo que para a resazurina foi escolhido o teste de uma hora.

Prova de redutase do C.T.T. — Cloreto de Trifenil Tetrazólio — Realizada conforme o "Standard Methods", mas com emprego de inóculo constituído por *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*, provenientes do laboratório Moseley, Indianapolis, Indiana, E.U.A., na proporção de 1:1 e com a sua atividade periodicamente testada (3).

As amostras do leite, do tipo B e C, sempre que possível em estado de cru, eram aquecidas a 80°C durante 5 minutos e, após arrefecidas, adicionadas a 0,5 ml

do inóculo acima mencionado, perfazendo no total 10 ml. Eram a seguir levadas a estufa a 46°C durante 2 horas, após acrescentadas com 0,3 ml de solução aquosa do C.T.T. a 1:25, retornando à incubação por mais 30 minutos ao fim do que era feita a leitura (3).

Paralelamente a esse tipo de prova de redutase, era feita a redutase rotineira já referida, pelo azul de metíleno ou resazurina, e com amostras do mesmo leite, porém sem o prévio tratamento térmico a 80°C ou adicionaramento de inóculo. A redução desses corantes efetuou-se pela ação da flora banal de contaminação do leite.

Foram examinadas 3.000 amostras do leite tipo C e 1.000 amostras do leite tipo B, coletadas quer diretamente dos latões nas plataformas das usinas de recepção das zonas produtoras, dos carros tanques nas usinas da Capital ou obtidas dos pacotes acondicionadores do leite já beneficiado e entregue no mercado varejista.

Resultados e Conclusões

Com o emprego dessas duas provas de redutase, realizadas conjuntamente, conseguimos evidenciar alterações compatíveis com a presença de inibidores. Quando presentes, atuando sobre a flora do leite, retardaram a redução do azul de metíleno ou resazurina, fazendo crer se tratar de produto de boa qualidade higiênica. Entretanto, a segunda prova, realizada em conjunto, demonstrou, pela não redução do C.T.T. que permaneceu na leucoforma, alteração no desenvolvimento do inóculo e compatível com a presença dos inibidores.

Em nossas observações, sempre que houve indícios da presença de inibidor, submetemos a amostra do leite problema a outras provas como as que pesquisam antibióticos, amônio quaternário, sulfamídicos, formaldeído, pióctitos e peróxido de hidrogênio e utilizando técnica por nós já descritas em trabalhos anteriores (3, 4, 6).

A presença de inibidores bacterianos, com grande prevalência no verão, foi de 8% para o leite tipo C e 6% para o tipo B, com respectivamente 1% e 1,5% de positividade para antibiótico.

Nos demais, as amostras problema mostraram presença de inibidor compatível com o peróxido de hidrogênio em atividade decrescente (6-8).

Como informação adicional, declaramos que, pelo Regulamento Brasileiro, o leite cru do tipo B e C não deve descorar na prova de redutase, o azul de metíleno, respectivamente antes de 3,30 e 2,30 horas.

Mais do que os métodos nesta apresentação, bastantes conhecidos, o que desejamos realçar são os fatos denunciados em âmbito brasileiro e que podem também ser a verdade para outros países, pelos resultados obtidos, mostrando distorsão das respostas de conhecida prova de rotina, subvertendo, com resultados falseados, a capacidade julgadora dos laboratórios bromatológicos.

Os problemas analisados nesta apresentação, embora bem pouco possam afetar os países de grande evolução sócio-econômica, clima frio ou avançada indústria de laticínios, são peculiares aos países com grande extensão territorial ou menor capacidade de refrigeração e de clima quente.

Este trabalho tem como finalidade alertar os países desta esfera, que não incluem no seu código alimentar,

como o espanhol, português e muitos outros, a exigência liminar da obrigatoriedade da ausência de inibidores bacterianos, para aceitar como válidos os resultados obtidos pelas provas rotineiras.

Em âmbito brasileiro, pôr de sobreaviso a Comissão de Reestruturação das Normas e Padrões para Alimentos, cujos trabalhos estão se processando.

Referências Bibliográficas

1. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION — Standard methods for the examination of dairy products. 12 ed. New York, A.P.H.A. 1972.
2. BRASIL. — Divisão de Inspecção de Produtos de Origem Animal. Decreto nº 1255 de 25 de junho de 1962. Altera o Decreto 30.691, de 29 de março de 1952, que aprovou o Regulamento da Inspecção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, 1962.
3. MELLO FILHO, A.; SANDOVAL, L.A.; RODRIGUES, N.R. & XIMENES, J. — Inibidores bacterianos no leite de consumo da Capital. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 25/27:66-94, 1965.
4. MELLO FILHO, A.; SANDOVAL, L.A.; RODRIGUES, N.R.; XIMENES, J. & MATOS, D.B. — Inibidores bacterianos, em especial a penicilina, no leite em pó de consumo da Capital. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 28:27-42, 1968.
5. MELLO FILHO, A. — Penicilina no leite de consumo da Capital e risco de sensibilização, *Rev. Paul. Med.*, 75:21-24, 1969.
6. MELLO FILHO, A. & CASTRO, L.C. — Conservação do leite "in natura" por meios físicos, químicos e bioquímicos. Peróxido de hidrogênio como conservador. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 29/30:85-103, 1969.
7. MELLO FILHO, A. — Utilização da água oxigenada no tratamento do leite cru destinado ao consumo. *Rev. Inst. Cândido Tostes*, 160:20-23, 1972.
8. MELLO FILHO, A. & CASTRO, L.C. — Pesquisa rápida e específica da presença do peróxido de hidrogênio no leite "in natura" pela utilização de tiras reagentes. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 31:77-81, 1971.
9. MINISTRY OF AGRICULTURE FISHERIES AND FOOD — Bacteriological technique for dairy purposes. London, Her Majesty Stationery Office, 1968.
10. ORGANISATION MONDIALE DE LA SALUD — Higiéne de la leche. Sér. Monogr. 48. FAO/OMS, Genebra, 1966.
11. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ — Comité de experts de l'hygiène du lait. Sér. Rap. Tech. 197. FAO/OMS, Genève, 1960.

Relacionamento antigênico entre *Yersinia pestis* e outras enterobactérias*

Marly Paiva Nunes, Ítalo Suassuna & Ivone Rocco Suassuna*

Resumo

Estudo de reações sorológicas cruzadas, entre *Yersinia pestis* e outros representantes da família *Enterobacteriaceae* envolvendo representantes de *Shigella*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Providencia* e *Proteus*, no total de 335 amostras. Com dois antissoros, de diferentes origens, para *Y. pestis*, observaram-se relações sorológicas unilaterais com algumas das amostras representativas de *Shigella* e *Escherichia*. As amostras que reagiram com os soro anti - pestosos corresponderam a *Shigella flexneri* sorotipos 3a, 3c, 4a e 6 e *E. coli* sorogrupo 0 28ab, 0 62, 0 70, 0 73, 0 114, 0 124, 0 126 e 0 135. Além do ocorrido com as estirpes referidas, não foram verificadas outras reações, no total das 335 amostras.

Summary

Non-reciprocal relationships between Yersinia pestis and other enterobacteria

Cross-serological tests involving *Yersinia pestis* and 335 samples of enterobacteriaceae representing the genera *Shigella*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Providencia* and *Proteus*. A non-reciprocal relationship was found between *Y. pestis* and some representative strains of *Shigella* and *Escherichia* with two different antisera for the serological recognition of *Y. pestis*. The reactive strains corresponded to *Shigella flexneri* serotypes 3a, 3c, 4a, and 6, and *E. coli* serogroups 0 28ab, 0 36, 0 62, 0 70, 0 73, 0 114, 0 124, 0 126, and 0 135. No other in addition to those reactions was observed involving the remaining strains used.

Introdução

A criação do novo gênero *Yersinia*, há alguns anos, havia sido proposta por van Loghem (18), para incluir o agente da peste e o da pseudotuberculose. Contudo, somente em 1974, de acordo com a 8^a edição do Manual Bergey (6), isso se tornou realidade, tendo o gênero sido incluído em *Enterobacteriaceae*, em função da existência de algumas características comuns aos membros da família citada.

De acordo com Schutze (22), o bacilo pestoso é constituído por dois抗ígenos, um correspondendo à cápsula, também denominado抗ígeno de envoltório ("envelope") ou fração I (FI), e o outro à substância somática ou抗ígeno V/W.

Além dos抗ígenos capsular e somático, devemos ressaltar, também, a presença da toxina, que sem dúvida contribui para a morte, na peste bubônica. Englesberg & col. (11) demonstraram que a diferença entre cepas virulentas e avirulentas está na quantidade de抗ígeno capsular e na produção de toxina, e que, como muitas cepas avirulentas sintetizam o抗ígeno capsular, em quantidades apreciáveis, a virulência requer a presença de outro determinante.

Chen & Meyer (7) foram além e provaram, pela primeira vez, a complexidade antigênica do bacilo pestoso, com a técnica de Ouchterlony. Identificaram quatro抗ígenos difusíveis, de uma cepa virulenta 195/P de *Y. pestis*, obtendo dois抗ígenos comuns à amostra avirulenta TRU de *Y. pestis*, e à amostra 19, de *Y. pseudotuberculosis*.

No relativo a reações cruzadas com enterobactérias, Góes (12), usando o soro anti-peste, testou-o contra *S. typhi*, *S. paratyphi* A e *S. paratyphi* B, e obteve aglutinação flagelar com *S. typhi* (1:20) e *S. paratyphi* A (1:80), sem evidências de aglutinação somática.

O trabalho de Lazarus & Gunnison (17) relata o antissoro preparado em coelhos, por injeções da estirpe viva A1122 de *Y. pestis*, aglutinando tanto *Y. pestis* quanto *Y. pseudotuberculosis* (cepas Saranac e Spokane) em torno do mesmo título. Foi observada, também, a aglutinação de *Salmonella schottmuelleri* (*S. paratyphi* B) e *S. hirschfeldii* (*S. paratyphi* C), em título baixo. Paralelamente, o antissoro preparado contra *S. schottmuelleri* aglutinou o抗ígeno somático de *Y. pestis* A1122, num título de 1:640. Consequentemente,

* Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia, UFRJ, Ilha do Fundão, 20000 Rio de Janeiro RJ.

os autores supõem a presença de um antígeno comum em *Y. pestis* e *Salmonella*.

Lazarus & Gunnison (17) realizaram reações cruzadas com antissoro de *Shigella dysenteriae*, *S. ambigua* e os tipos W, X, Y e Z de *S. paradyENTERIAE* (*Shigella flexneri*), cujos títulos aglutinantes, com a estirpe A1122 de *Y. pestis*, variaram de 1:40 a 1:320. Esses soros aglutinaram com a cepa homóloga de *Shigella* em título de 1:2560. Em adição, antissoro para *Y. pestis* aglutinou a maioria das 37 estirpes de *Shigella* testadas, em títulos de 1:20 a 1:80, sendo que 12, dentre essas, responderam com título de 1:160 a 1:320. Com a cepa de *Y. pestis*, esse antissoro deu um título de 1:1280. Em função das reações cruzadas, Lazarus & Gunnison (17) sugeriram a presença de um mesmo fator antigênico, em *Y. pestis* e *Shigella*.

Winter & Moody (24) obtiveram antissoro cujo título em aglutininas era de 1:1280, aproximadamente, a partir de células totais da estirpe virulenta 16/P de *Y. pestis*. Relatam a especificidade do antissoro para culturas de peste, produtoras de fração I, não ocorrendo reações com estirpes de *Y. pseudotuberculosis*.

O trabalho de Barber & Eylan (3) dá ênfase ao fato de que, quando *Y. pestis* é cultivada a 37°C, em agar triptose, sintetiza proteínas específicas, em adição às que haviam sido sintetizadas pela bactéria quando cultivada a 27°C, no citado meio. As diferenças foram demonstradas por difusão em agar, contra soro preparado em coelhos, para proteínas isoladas da bactéria cultivada em caldo a 27°C ou a 37°C. As proteínas comuns de *Y. pestis* cepa EV 76 (avirulenta), sintetizadas a 27°C e a 37°C, apresentaram determinantes comuns, com diferentes espécies de *Enterobacteriaceae*. Por sua vez, proteínas isoladas de *E. coli* 055, *E. coli* B, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae* 3, *S. typhimurium*, *S. paratyphi* B e *S. enteritidis* se precipitaram, com soro preparado com as proteínas de *Y. pestis* EV 76. Milhomem, Suassuna & Naine (20) demonstraram a presença do antígeno comum de enterobactérias, descrito por Kunin, Beard & Halmagyi (16), em amostra de *Y. pestis* e em quantidade equivalente à encontrada em *Salmonella typhi*.

Yersinia pestis pertence à família *Enterobacteriaceae* e as maiores dificuldades para seu isolamento e identificação parecem provir da existência de características comuns a outros microrganismos, na referida família.

Nesse trabalho são analisadas as reações sorológicas cruzadas entre *Y. pestis* e diferentes amostras de *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Providencia* e *Escherichia coli*.

Material e Métodos

Além da amostra padrão, avirulenta, A1122 de *Y. pestis*, foram usadas 335 outras de diversas enterobactérias, representando os seguintes gêneros: *Escherichia coli*-64 sorogrupos; *Salmonella* spp.-53 sorogrupos; *Shigella*-38 tipos (*Sh. dysenteriae*, 10 sorotipos; *Sh. flexneri*, 12 sorotipos ou subtipos; *Sh. boydii*, 15 sorotipos; *Sh. sonnei*, 1 sorotipo); *Proteus*-119 sorogrupos (*P. mirabilis*, 32; *P. morganii*, 30; *P. rettgeri*, 36; *P. vulgaris*, 21).

1. Preparo de antígenos para inoculações

1.1 Preparar massa de células, semeando-se 2ml de cultivo de *Y. pestis* A1122 em B.H.I. líquido a 37°C, em garrafas de Roux contendo o mesmo meio; incubar as garrafas a 37°C, durante 72hs, após o que suspender o crescimento obtido em 20ml de salina a 0,85%; lavar as suspensões vivas duas vezes, com mesma salina isotônica, padronizando para aproximadamente 10⁹ células (turvação intermediária aos tubos 3 a 4 da escala de MacFarland).

1.2. Preparar, paralelamente, outro tipo de antígeno, que se distingue do descrito no item 1.1. apenas no tocante à temperatura de incubação que, neste caso, é de 28°C, tanto para a obtenção do inóculo, como para o crescimento da massa celular.

1.3. e 1.4. Preparar suspensões antigênicas, conforme os itens 1.1 e 1.2, diferindo-se apenas em relação à suspensão da massa de células que, ao invés de ser feita em solução salina isotônica, o é em mistura de 20ml de salina isotônica e 10ml de solução de formalina a 1,5%.

2. Preparo de antígenos para reações sorológicas

2.1. Preparar massa de células como descrito em 1.1, fazendo a suspensão em solução salina com 0,5% de formalina e 0,01% de "Tween 80", conforme MacDonald(19). Lavar as suspensões obtidas duas vezes, com o mesmo tipo de salina usada para a suspensão, padronizando para 60 U.K., em fotocolorímetro ("Klett Summerson"), em comprimento de onda de 540nm.

2.2. Cultivar, alternativamente, *Y. pestis* A1122 em B.H.I. líquido, a 37°C, durante 24hs, aquecendo-se as culturas a 100°C após o crescimento, durante 24hs sob vapor fluente, em autoclave e, em seguida, centrifugar, dividindo-se o sedimento em duas partes. Cada porção deve ser submetida a dois tratamentos:

2.2.1. suspensão do sedimento em pequeno volume de acetona, com a ajuda de grau e pistilo, aguardando-se a evaporação do solvente durante uma noite, a 37°C e obtendo-se um pó que, então, deverá ser ressuspenso em salina, até 60 U.K.; e

2.2.2. suspensão da outra porção em salina fisiológica e submissão ao agitador de Khan, para desagregação de grumos, seguindo-se por duas lavagens com salina fisiológica.

3. Preparo de antissoros para *Y. pestis*

3.1. Antissoros para imunizações: preparados de acordo com três esquemas de imunização descritos a seguir.

(a) Para cada antígeno 1.1 e 1.2 foram inoculados, por via endovenosa, dois coelhos, pesando entre 3 a 5 quilos. O esquema de imunização foi o adotado por Baker & col. (1) ou seja, as injeções endovenosas (no total de aproximadamente 6×10^9 células, distribuídas entre as várias inoculações) eram dadas em dias alternados, pelo período de três semanas, com descanso de uma semana entre a 3^a e a 4^a injeções. Nesse esquema, foi introduzida uma modificação: antes das quatro últimas injeções, ministrou-se, no dia anterior, 0,5ml do antígeno, por via subcutânea, como dose desensibilizante (23).

(b) Para cada antígeno 1.3 e 1.4, foram inoculados, por via endovenosa, dois coelhos. A inoculação da suspensão, morta pelo formol, era feita em dias alternados, durante três semanas, havendo intervalo de descanso de uma semana entre a 1^a e a 2^a semana de inoculação. A dose total de microrganismos administrados foi de 4×10^9 células(2). Da mesma maneira que no esquema (a), ministrou-se, antes das injeções endovenosas, no dia imediatamente anterior, 0,5ml do antígeno (1.3 ou 1.4) por via subcutânea.

(c) A preparação das suspensões a serem inoculadas em coelhos foi feita da mesma maneira daqueles usadas no esquema a (1.1 e 1.2) e b (1.3 e 1.4). Utilizou-se, para cada conjunto de antígeno ou seja: (1.1 e 1.2) e (1.3 e 1.4) dois coelhos que recebiam três injeções endovenosas (3×10^9 células), com o microrganismo morto (1.3 e 1.4) e, a seguir três injeções (3×10^9 células), também endovenosas, do germe vivo (1.1 ou 1.2). Ministrou-se, igualmente, antes das injeções endovenosas, injeções subcutâneas de 0,5ml do antígeno (1.1 ou 1.2), como descrito.

3.2. Controle dos抗ígenos e antissoros produzidos: as suspensões antigênicas, utilizadas nas reações de aglutinação foram controladas através de um antissoro específico obtido em coelhos, fornecido pelo "Lederle Laboratories, INC, New York, N.Y." (lote n.º 7-1038-1044). O mesmo antissoro serviu para estudo comparativo com os soros por nós obtidos.

3.3. Sangrias: em cada caso, colhia-se, sete dias após a última inoculação, aproximadamente 5,0ml de sangue de cada coelho, pela veia marginal da orelha. Após a coagulação, em temperatura ambiente, separava-se o soro, que era, a seguir, inativado, por 30 minutos em banho-maria a 56°C.

O maior volume possível de sangue era obtido através de punção cardíaca, dos coelhos que respondiam com títulos iguais ou superiores a 1:160, nas sangrias de prova.

Os antissoros obtidos contra *Y. pestis*, empregados durante o estudo, constituíram-se da mistura dos soros dos pares de coelhos imunizados.

3.4. Titulação: os soros eram diluídos, em duas séries, de 1:10 a 1:1280, em razão de ordem dois, em volume

final de 0,5ml de salina. Mesma quantidade da suspensão antigênica, homóloga, era adicionada. Incubava-se em banho-maria a 37°C, por duas horas e deixa-se na geladeira, a 4°C, até a leitura feita na manhã seguinte.

3.5. Antissoros para *Escherichia coli* e *Shigella*: os soros anti-*Shigella flexneri* (3a, 4a, 3c e 6) foram preparados de acordo com técnicas usuais para enterobactérias (10).

Os antissoros anti-*E. coli* 062 e *E. coli* 0135 foram preparados e cedidos por Dra. Elsa F. R. de Oliveira, do Serviço de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ (21). O soro anti-*E. coli* 028 foi obtido comercialmente, de fabricação Difco. Os títulos homólogos dos soros referidos estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1

Títulos homólogos de soros anti-*Sh. flexneri*
e anti-*E. coli* testados com *Y. pestis*

Antissoro	Título Homólogo
<i>Sh. flexneri</i> 3a	1/1600
<i>Sh. flexneri</i> 3c	1/6400
<i>Sh. flexneri</i> 4a	1/1600
<i>Sh. flexneri</i> 6	1/ 800
<i>E. coli</i> 028ab	1/ 200
<i>E. coli</i> 062	1/ 400
<i>E. coli</i> 0135	1/ 800

4. Reações de aglutinação lenta

4.1. Determinação dos títulos homólogos: realizada de acordo com o item 3.4 acima, com o emprego das suspensões antigênicas 2.1, 2.2.1 e 2.2.2.

4.2. Determinação dos títulos heterólogos: foram feitas séries de diluições, segundo a técnica descrita, e adicionadas, a cada uma delas, suspensões antigênicas formoladas (0,5% de formalina) obtidas das diferentes enterobactérias relacionadas, ou a partir de *Y. pestis*. Para os soros correspondentes a enterobactérias estendia-se até 20.480 a recíproca da mais alta diluição.

5. Absorção dos antissoros

O antissoro para *Y. pestis* foi absorvido com diferentes enterobactérias que, com o mesmo, reagiram.

A partir de culturas lisas, dos tipos e subtipos de *Shigella flexneri* 3a, 3c, 4a e 6 e dos grupos 028, 036 e 0135 de *E. coli*, obtinha-se o crescimento em caldo B.H.I., o qual, após incubação por 6 a 8 horas, a 37°C, era utilizado como inóculo. Para isto, 0,3 a 0,4ml eram semeados na superfície de placas, com B.H.I., solidificado com 2% de agar, e incubados por 24 horas a 37°C. O crescimento obtido era suspenso

em solução salina e centrifugado, desprezando-se o sobrenadante. O antissoro era absorvido com as massas celulares acima referidas. As absorções eram feitas em banho-maria, a 37°C, durante duas horas. Decorrido esse período, os tubos eram mantidos a 4°C, durante uma noite, obtendo-se o sobrenadante, correspondente ao antissoro absorvido, após centrifugação (10).

Da mesma maneira, foi feita a absorção dos antisoros correspondentes às estirpes de *E. coli* e de *Shigella*. Os antissoros absorvidos foram testados com o antígeno homólogo e com os antígenos heterólogos.

Resultados

Dos três esquemas de imunização utilizados, os resultados mais satisfatórios foram obtidos com o método *a*. Com este processo, foram obtidos soros de títulos correspondentes a 1/160 e idênticos em reatividade ao soro comercial, produzido pelo laboratório Lederle. Os métodos *b* e *c* resultaram menos eficazes, com títulos nunca superiores a 1/80.

A mortalidade dos animais de experimentação foi sempre elevada e, aparentemente, mais acentuada, quando as células de *Y. pestis* haviam sido cultivadas a 28°C. Essa mortalidade diminuiu quando adotada a prática das injeções subcutâneas prévias às inoculações endovenosas. Quanto aos títulos dos soros, não houve influência do fato de haverem as células sido cultivadas a 28 ou a 37°C.

A titulação dos soros obtidos foi feita empregando suspensões formoladas de *Y. pestis* A1122 em solução salina com 0,01% de "Tween 80", realizando-se a leitura final após centrifugação a 2000 r.p.m., por 5 minutos. A ausência do "Tween" não alterava a leitura dos títulos finais, mas propiciava, aparentemente, menor intensidade na formação dos agregados celulares. As suspensões antigênicas, preparadas com acetona, indicavam os mesmos títulos dos soros, mas com aparência de aglutinação parcial em todos os tubos, desde as mais forte diluições.

O emprego de recursos mecânicos, para desagregar os grumos derivados do tratamento pela acetona, foi inteiramente insatisfatório.

Reações sorológicas cruzadas de *Y. pestis* com outras enterobactérias — O antissoro para *Y. pestis*, obtido, foi testado contra 335 amostras de *Enterobactericeae*, correspondentes a variados padrões antigenicos.

Entre as 335 amostras testadas, foram obtidas 13 reações positivas, pela técnica de aglutinação lenta, em tubo (Tabela 2). Os títulos obtidos nas 13 reações estão expressos na Tabela 3. Pode se observar que os títulos mais altos (1:80) e próximos do título homólogo do soro anti-peste foram obtidos com as estirpes de *Sh. flexneri* 3c, *Sh. flexneri* 6, *E. coli* 028, *E. coli* 036 e *E. coli* 062. Outras reagiram ao título

de 1:40, como *Sh. flexneri* 4a, *E. coli* 0124 e *E. coli* 0135. As demais, ou seja *Sh. flexneri* 3a, *E. coli* 070, *E. coli* 073, *E. coli* 0114 e *E. coli* 0126, reagiram a 1:20.

Pela relação das amostras na Tabela 3, todas pertencem à tribo *Eschericheae*, sendo comum, particularmente para o gênero *Escherichia*, a presença de antígenos K, de envoltório. Controle parcial, sobre a reatividade desses antígenos com o soro anti-peste, foi realizado, empregando-se suspensões autoclavadas, a fim de eliminar a reatividade dos antígenos K (10). Utilizando-se as estirpes de *E. coli*, representativas dos grupos somáticos 028, 062 e 0135, observou-se que sua reatividade desaparecia após a autoclavação a 120°C, por duas horas, indicando que, nesses casos, as reações cruzadas parecem justificar-se mais pela presença de antígeno K que pelo antígeno somático 0. Esses dados, embora incompletos, orientaram para o emprego de suspensões formoladas, na avaliação da especificidade do soro anti-peste.

Para avaliar a natureza das reações cruzadas com outras enterobactérias, obtidas de acordo com a Tabela 2, o soro anti-peste foi absorvido com as amostras reativas de *Shigella flexneri* 3a, 3c, 4a e 6 com as amostras de *E. coli* dos grupos somáticos 028, 062 e 0135.

Em todos os casos essas amostras removeram completamente suas respectivas aglutininas, sem haver, contudo, diminuição do título homólogo (1/160) para *Y. pestis*.

Foi estudado, a seguir, o comportamento de *Y. pestis* frente aos soros para cada uma das amostras de *Shigella flexneri* e de *E. coli* acima mencionadas. Os títulos homólogos desses soros são referidos na Tabela 1. A possível relação cruzada, recíproca, com o antígeno de *Y. pestis*, não foi observada em nenhum caso, isto é, não houve reatividade desses soros com os antígenos formolados ou acetônicos de *Y. pestis*. A reação das enterobactérias mencionadas, como o soro anti-peste, mostrou-se inteiramente unilateral. Cumpre mencionar, no entanto, que investiga-

Tabela 2

Reações cruzadas de amostras tipo de *Enterobacteriaceae* com soro para *Yersinia pestis*

Gênero ou Espécie	Nº de Amostras Testadas	Nº de Amostras Reagentes
<i>Providencia</i>	61	—
<i>Proteus mirabilis</i>	32	—
<i>Proteus morganii</i>	30	—
<i>Proteus rettgeri</i>	36	—
<i>Proteus vulgaris</i>	21	—
<i>Salmonella</i>	53	—
<i>Shigella</i>	38	4
<i>Escherichia coli</i>	64	9

ção adicional foi realizada sobre a reatividade das treze amostras, com o soro comercial, de diferente origem. Recorde-se que esse soro mostrava o mesmo título que o soro experimental, produzido pelo autor. Reações idênticas e ao mesmo título foram observadas com as treze enterobactérias citadas, em confronto com os dois soros anti-*Y. pestis*.

Tabela 3

Títulos das reações cruzadas de
Enterobacteriaceae com soro anti-*Y. pestis*

Antígenos	Diluição do Soro				
	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
<i>Yersinia pestis</i> A1122*	+	+	+	+	-
<i>Shigella flexneri</i> 3a	+	-	-	-	-
<i>Shigella flexneri</i> 3c	+	+	+	-	-
<i>Shigella flexneri</i> 6	+	+	+	-	-
<i>Shigella flexneri</i> 4a	+	+	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> 028ab	+	+	+	-	-
<i>Escherichia coli</i> 036	+	+	+	-	-
<i>Escherichia coli</i> 062	+	+	±	-	-
<i>Escherichia coli</i> 070	+	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> 073	+	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> 0114: H 32	+	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> 0124	+	±	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> 0126: B16	+	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> 0135	+	±	-	-	-

* Título homólogo.

+ = aglutinação total; ± = aglutinação parcial; - = ausência de aglutinação.

Discussão

Em 1947, Costa (8) focalizou três pontos essenciais, em torno dos quais se encontram todas as dificuldades nas provas de aglutinação com o bacilo da peste: a) a obtenção de soros aglutinantes de título elevado; b) a obtenção de suspensões uniformes, homogêneas e estáveis do bacilo; e c) a obtenção de boa especificidade antigênica.

Além dessas dificuldades, Devignat (9) assinalou o problema da pouca resistência dos animais (coelhos) submetidos à prolongada imunização, com esses抗ígenos.

Os mesmos problemas foram defrontados neste trabalho. Em relação à obtenção de soro específico anti-*Y. pestis*, os melhores resultados foram obtidos com a inoculação, em coelhos, de células vivas de *Y. pestis* A1122, lavadas em solução salina, adotando-se o esquema de Baker & col. (1). No entanto, deve-se salientar a taxa elevada de perda de animais durante a

preparação de antissoros, principalmente a partir de células cultivadas a 28°C. Adotando-se injeções subcutâneas, antes das inoculações endovenosas (23), conseguimos obter soros de títulos correspondentes a 1:160. Quanto ao título, não foi observada a influência da temperatura de incubação das células (28 ou 37°C), ou das injeções subcutâneas prévias. Esse título é relativamente baixo, em comparação com os obtidos por Batchelder (4), Bhatnagar (5) e Baltazard & col. (2). No entanto, corresponde ao título considerado satisfatório por Goldenberg, Hudson & Kartman (13).

Apesar de Batchelder (4) achar que o uso de culturas atenuadas ou vivas é muito perigoso, recomendando um antígeno morto pela formalina, a partir de *Y. pestis* cultivada a 28°C, ao trabalhar com culturas cultivadas nessas condições ou a 37°C, não conseguimos obter antissoros com títulos satisfatórios. Da mesma maneira, o esquema utilizando a associação de injeções de células mortas e de células vivas também resultou em menos eficaz.

Apesar de Jawetz & Meyer (14) afirmarem que apenas três injeções fornecem soro de maior especificidade e título relativamente elevado, em nosso trabalho, quando utilizamos o esquema b de imunização, cujo número de injeções totalizava quatro, com o microrganismo morto, o título obtido foi inferior aquele do esquema a, no qual utilizamos seis injeções endovenosas.

Sempre preocupou, a vários pesquisadores, a estabilização das suspensões de *Y. pestis* para as provas de aglutinação. Tentou-se por diversos artifícios de cultura ou pela junção de substâncias químicas, estabilizar as suspensões do bacilo (8). Em função da tendência à produção de suspensões auto-aglutináveis, conseguimos obtê-la homogêneas e estáveis, a partir de *Y. pestis* A1122 formolada, com o emprego de solução salina com 0,01% de "Tween 80" (19). O tratamento da suspensão, pela acetona, forneceu resultados menos satisfatórios, e o emprego de recursos mecânicos, para desagregar os grumos derivados do tratamento pela acetona, foi ineficaz.

Jawetz & Meyer (14) adotaram, para o teste de aglutinação em tubo, o uso de salina a 0,45%. Não observamos vantagens no emprego desse recurso.

Com o antissoro obtido, encontramos 13 reações positivas cruzadas para distintas estirpes de enterobactérias pela técnica de aglutinação lenta, em tubo (Tabela 2). Os títulos mais altos (1:80) estão expressos na Tabela 3, e foram obtidos em relação a *S. flexneri* e *E. coli*. Assim, todas as amostras que reagiram cruzadamente com o antissoro da peste pertencem à tribo *Eschericheae*.

O gênero *Escherichia* apresenta抗ígenos de envoltório (K). A exclusão desse抗ígeno de envoltório, pelo emprego de suspensões autoclavadas, permite sugerir que o mesmo tivesse sido responsável pelas reações cruzadas em relação a alguns subgrupos de

E. coli, uma vez que não se observou reação com o antígeno autoclavado (somático).

As amostras reativas de *Shigella* e *E. coli*, em todos os casos, removem completamente as suas aglutininas respectivas, sem promover diminuição do título para *Y. pestis* (1:10). No entanto, não houve reciprocidade de reação de *Y. pestis* frente aos soros de *Shigella flexneri* (3a, 3c, 4a e 6) e *E. coli* (028, 062 e 0135).

A natureza desse relacionamento poderia justificarse por dois aspectos. Primeiro, admitir-se a presença de anticorpos naturais, não estimulados pelo bacilo da peste, no soro experimentalmente obtido. Isto não foi possível controlar, por serem desconhecidas essas reações cruzadas, quando inicialmente testadas as 335 amostras de enterobactérias. É curioso, no entanto, que só enterobactérias, de gêneros mais intimamente relacionados quanto a características bioquímicas, produzem essas reações. Os mesmos gêneros são os mais intimamente relacionados, no plano genético, com *Yersinia*, como revisto por Johnson & col. (15). Em relação a *Salmonella*, há grande freqüência de anticorpos naturais, como observado em coelhos por I. Suassuna & R. D. Machado (1963, dados não publicados). Todavia, nenhuma amostra desse gênero acusou reação cruzada com o soro obtido.

Também é circunstancialmente contra a participação de anticorpos naturais, nas reações cruzadas obtidas, o fato de que as mesmas amostras reagiram, no mesmo título, com o soro anti-peste, comercialmente distribuído por laboratório comercial (Lederle).

A outra justificativa poderia relacionar-se com a presença de imunógenos abaixo da superfície, em células de *Y. pestis* e, portanto, ocultos nas reações de aglutinação, mas presentes como grupos ou grupos determinantes nos抗ígenos superficiais das amostras reagentes de *Shigella* ou *E. coli*. De qualquer forma, pareceu recomendável o emprego de outros recursos diagnósticos, ao lado da reatividade com anti-*Y. pestis*, para a identificação desta espécie.

Com relação à reações cruzadas com enterobactérias, relatam Lazarus & Gunnison (17) que o antisoro para *Y. pestis* aglutina tanto *Y. pestis* quanto *Y. pseudotuberculosis*, mas que são observadas também reações com *Salmonella* e *Shigella*.

A demonstração da possível existência de抗ígenos comuns, entre *Y. pestis* e amostras de *E. coli* e *Shigella*, fica assim em aberto. Devemos ressaltar, não obstante, o achado recente de Milhomem, Suassuna & Naine (20), da presença do抗ígeno de Kunin, comum às enterobactérias, em amostras de *Y. pestis* e, em quantidade equivalente, à encontrada em *Salmonella typhi*.

Referências Bibliográficas

- BAKER, E.E.; SOMMER, H.; FOSTER, L.E.; MEYER, E. & MEYER, K. F. — Studies on immunization against plague. I. The isolation and characterization of the soluble antigen of *Pasteurella pestis*. *J. Immunol.*, 68: 131-145, 1952.
- BALTAZARD, M.; DAVIS, D.H.S.; DEVIGNAT, R.; GIRARD, G.; COHAR, M.A.; KARTMAN, L.; MEYER, K.F.; PARKER, M.T.; POLLITZER, R.; PRINCE, F.M.; QUAN, S.F. & WAGLE, P. — Recommended laboratory methods for the diagnosis of plague. *Bull. W.H.O.*, 14:457-509, 1956.
- BARBER, C. & EYLAN, E. — Immunochimie de *Pasteurella pestis*. I. Les déterminants communs à *P. pestis* EV. 76 et aux Enterobacteriaceae. *Rev. Immunol.*, 35: 49-60, 1971.
- BATCHELDER, A. — Preparations of specific serums and technic of agglutination test with *Pasteurella pestis* detoxified with formaldehyde. *J. Infect. Dis.*, 44: 403-407, 1929.
- BHATNAGAR, S.S. — Bacteriological studies on *Pasteurella pestis* and *Pasteurella pseudotuberculosis*. III. The serology of *Pasteurella pestis* and *Pasteurella pseudotuberculosis*. *Indian J. Med. Res.*, 28: 17-24, 1940.
- BUCHANAN, R.E. & GIBBONS, N.E. (Eds.). — Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed. Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1974.
- CHEN, T.H. & MEYER, K.F. — Studies on immunization against plague X. Specific precipitation of *Pasteurella pestis* antigens and antibodies in gels. *J. Immunol.*, 74: 501-507, 1955.
- COSTA, G.A. — Contribuição ao diagnóstico nos ratos. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, 1947.
- DEVIGNAT, R. — Comportement biologique et biochimique de *P. pestis* et de *P. pseudotuberculosis*. *Bull. W.H.O.*, 10: 463-494, 1954.
- EDWARDS, P.R. & EWING, W.H. — Identification of Enterobacteriaceae. 2nd ed., Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minnesota, 1962.
- ENGLESBERG, E.; CHEN, T.H.; LEVY, J.B.; FOSTER, L.E. & MEYER, K. F. — Virulence in *Pasteurella pestis*. *Science*, 119: 413-414, 1954.
- GÓES, P. de — Estudos sobre a imunidade cruzada. Tese. Faculdade de Medicina da Universidade do Brasil, Rio de Janeiro, 1947.
- GOLDENBERG, M.I.; HUDSON, B.W. & KARTMAN, L. — *Pasteurella* infections. I. *Pasteurella pestis*, p. 422-439. In Bodily, H. L., Updyke, E.L. & Mason, J.O. (Eds.). Diagnostic procedures for bacterial, mycotic and parasitic infections. 5th ed., American Public Health Association, New York, 1970.
- JAWETZ, E. & MEYER, K.F. — Studies on plague immunity in experimental animals. II. Some factors of the immunity mechanism in budonic plague. *J. Immunol.*, 49: 15-30, 1944.
- JOHNSON, R.; COLWELL, R.R.; SAKAZAKI, R. & TAMURA, K. — Numerical taxonomy study of the Enterobacteriaceae. *Inst. J. Syst. Bacteriol.*, 25: 12-37, 1975.
- KUNIN, C.M.; BEARD, M.V. & HALMAGYI, N.E. — Evidence for a common hapten associated with endotoxin fractions of *E. coli* and other Enterobacteriaceae. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.*, 111: 160-166, 1962.
- LAZARUS, A.S. & GUNNISON, J.B. — The action of *Pasteurella pestis* bacteriophage on strains of *Pasteurella*, *Salmonella* and *Shigella*. *J. Bacteriol.*, 53: 705-714, 1947.

18. LOGHEM, L.L. van — La classification du bacille pesteux. *Ann. Inst. Pasteur*, 72: 975, 1946.
19. MAC DONALD, J.B. — The motile non-sporulating anaerobic rods of the oral cavity. Tese, University of Toronto, Toronto, 1953.
20. MILHOMEM, A.M.; SUASSUNA, I. & NAINE, V. — Presença do antígeno comum de enterobactérias em *Yersinia pestis*, *Ci. & Cult.*, 27 (Supl.): 526, 1975.
21. OLIVEIRA, Elsa. F.R. de — Associação de grupos sorológicos de *Escherichia coli* com infecções urinárias. Tese de Mestrado. Instituto de Microbiologia, U.F.R.J. Rio de Janeiro, 1976.
22. SCHUTZE, H. — Studies in *B. pestis*: I. The antigens and immunity reactions of *B. pestis*. *Brit. J. Exp. Pathol.*, 13: 284-284, 1932.
23. SUASSUNA, I. — Estudos sobre o gênero *Proteus*. Tese. Instituto de Microbiologia, Rio de Janeiro, 1963.
24. WINTER, C.C. & MOODY, M.D. — Rapid identification of *Pasteurella pestis* with fluorescent antibody. I. Production of specific antiserum with whole cell *Pasteurella pestis* antigen. *J. Infect. Dis.*, 104: 274-280, 1959.

Nota breve**Fixação e coloração de flagelados do gênero *Tritrichomonas****

G.A. De Carli**, J. Guerrero***, Zilma Freire** & E. Nunes**

Resumo

Modificação de técnica combinando a de APV-fixador, sublimado alcoólico de Schaudinn, emulsificação em uma gota de soro de cavalo ou em fixador de Mayer, e coloração segundo Leishman, Giemsa e a técnica de hematoxilina férrea segundo Heidenhain — facilitou a leitura de esfregaços, sem que os microrganismos ficasse obscurecidos pelas partículas suspen-sas no meio de montagem.

Summary*Fixation and staining of flagellate cells of Tritrichomonas*

Technique modification — with combination of PVA-fixation, alcoholic sublimate after Schaudinn, followed by emulsification in a drop of horse serum or in Mayer's albumin medium, and staining according to Leishman, Giemsa and Heidenhain's iron hematoxylin — makes observation of smears easier, by preventing the darkening of the microorganism by particles in the mounting media.

Diversas técnicas têm sido usadas para a fixação e coloração de tricomonas de origem animal, com o obje-tivo de estudar a morfologia e evidenciar as estruturas do organismo, como as de Kirby (*J. Parasit.*, 31:163-175, 1945); Honigberg (*Univ. Calif. Publ. Zool.*, 53:227-236 1947); Moskowitz (*Stain Tech.*, 25:17-20, 1950); Honig-berg (*Univ. Calif. Publ. Zool.*, 55:337-94, 1951); Honig-berg & Davemport (*Stain Tech.*, 29:241-246, 1954); Buttery (*J. Protozool.*, 3:8-13, 1956) e Hilber & col. (*J. Protozool.*, 7:159-71, 1960). A técnica do álcool-polivinílico (APV) fixador de Brooke & Goldman (*J. Lab. Clin. Med.*, 34:1554-60, 1949) e o sublimado alcóolico de Schaudinn com 2% de ácido acético, modificado por Wenrich & Geiman (*Stain Tech.*, 8:158, 1933) usados na preparação de esfregaços fecais, para o diagnóstico de infecções por protozoários, foi adaptada ao estudo de tricomonas cultivados em meios axênicos. Os pro-cedimentos para a preparação destes fixadores estão descritos em todos os compêndios de parasitologia médica, enquanto que as modificações do APV foram apresentadas por Burrows (*Stain Tech.*, 42:93-95, 1967). As colorações segundo Leishman, Giemsa e a técnica de hematoxilina férrea, segundo Heidenhain, apresen-tada por Burrows em seu livro "Microscopic Diagnosis

of the Parasites of Man, 1965", foram os métodos usa-dos neste estudo. As culturas foram concentradas pela centrifugação e partes iguais de sedimento (células) e de APV fixador foram colocados em uma lâmina de microscopia e, com um aplicador de madeira, o esfre-gaço foi estirado, permanecendo, no mínimo três horas,

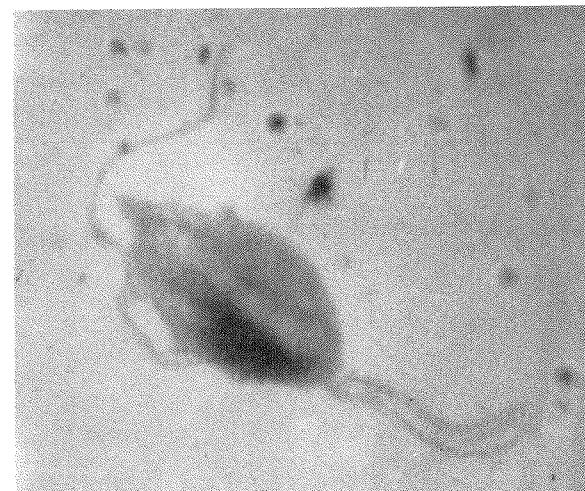


Fig. 1. Flagelado de *Tritrichomonas*, tratado pela modificação de téc-nicas combinadas.

* Projeto VET. 40/74, FAPERGS, RS, Brasil.

** UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

*** USP, São Paulo & Instituto de Pesquisa Johnson & Johnson de Doenças Endêmicas. Endereço atual: Pitman Moore Inc., P.O. Box 344, Washington Crossing, New Jersey 08564, EUA.

à temperatura de 37°C, para secar. Partes iguais de células obtidas por centrifugação e sublimado alcóolico de Schaudinn foram misturados. *Os espécimes assim conservados foram emulsionados a uma gota de soro de cavalo inativado ou ao fixador de Mayer* (partes iguais de clara de ovo e glicerina), sendo os esfregaços feitos

em lâminas de microscopia ou em lamínulas (18 × 24). Estas modificações facilitaram a preparação e a leitura dos esfregaços, e os organismos não foram obscurecidos pelas partículas suspensas no meio de montagem (Harleco Synthetic Resin), nem se apresentaram deformados pelos processos de fixação e coloração (Fig. 1).